UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

TABATA MARIZ BOHLEN

INFLUÊNCIA DA SENSIBILIDADE À LEPTINA NA MATURAÇÃO SEXUAL DE CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

Tabata Mariz Bohlen

Influência da sensibilidade à leptina na maturação sexual de camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

Tabata Mariz Bohlen

Influência da sensibilidade à leptina na maturação sexual de camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências
Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais
Orientador: Profª. Dra. Renata Frazão
Coorientador: Prof. Dr. José Donato Jr
Versão original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mariz Bohlen, Tabata
Influência da sensibilidade à leptina na maturação sexual de camundongos / Tabata Mariz Bohlen; orientadora Renata Frazão; coorientador José Donato Jr.. -- São Paulo, 2019.
94 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Citocinas. 2. Hormônios do tecido adiposo. 3. Hipotálamo. 4. Puberdade. 5. Reprodução animal. I. Frazão, Renata, orientador. II. Donato Jr., José, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):
Tabata Mariz Bohlen

Titulo da Dissertação/Tese:
Influência da sensibilidade à leptina na maturação sexual de camundongos

Orientador: Profa. Dra. Renata Frazão

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Protocolo de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **012** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Donato Junior**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar"* do qual participam o(s) aluno(s), **Thais Tessari Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Laís Iatauro Cardinali, Vanessa Sayuri Nagaishi, Aline Coelho Macedo, Marina Silveira, Regina Silva** os pesquisadores **Martin Andreas Metzger, Sara Joyce Shammah Lagnado, Renata Frazão,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.03.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 20 de março de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Protocolo de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

SOLICITAÇÃO PARA INCLUSÃO DE ALUNO EM PROTOCOLO APROVADO - CEUA

Ilmo Sr.
Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
DD. Coordenador da Comissão de Ética no Uso Animais
ICB/USP

Prezado(a) Senhor(a)

Solicito as medidas necessárias à Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP para que seja incluído o estagiário Tabata M Bohlen ao protocolo de experimentação animal nº12/fls. 03 do livro 03, referente ao projeto intitulado "Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar" aprovado em 19/03/2013, sob minha responsabilidade.

Declaro que não houve alteração de metodologia experimental nem das técnicas descritas inicialmente quando da aprovação do referido protocolo de experimentação animal. Estamos cientes e de acordo com as regras adotadas pela CEUA. Consultamos os "links" indicados no protocolo e comprometemo-nos a proceder conforme as informações aqui fornecidas. Estamos cientes de que as regras adotadas pela CEUA estão de acordo com a legislação nacional e internacional vigente.

São Paulo, 08/05/2015

Tabata M Bohlen

Prof. Dr José Donato Junior

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Renata Frazão e ao Prof. Dr. José Donato Junior, pela oportunidade de continuar desempenhando um trabalho o qual me apaixonei, e pela orientação, ensinamentos e o apoio dado durante todo este tempo.

Também gostaria de agradecer à Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi e à Profa. Dra Maria Luiza Morais Barreto de Chaves pela colaboração e por permitirem utilizar os equipamentos que tornaram este trabalho possível de ser realizado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Igor Tomáz, Fernanda Machado, Naira Mansano. E especialmente, agradeço à Thaís Zampieri e à Larissa Campista. Meninas, obrigada pela convivência, pelo carinho e por toda cumplicidade que temos, sem vocês teria sido mais difícil fazer tudo que fiz. E agradeço também à Ana Maria Peracoli Campos, sempre paciente, carinhosa e cheia de risadas para compartilhar, muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas de Departamento, ao pessoal do Laboratório de Neuroanatomia, aos meus amigos e parentes por todo apoio, companheirismo e compreensão pelas constantes ausências. Pela amizade inestimável e eterno companheirismo, agradeço aos colegas do grupo Dragões de Garagem, que mesmo longe fisicamente, me ajudaram todos os dias.

Agradeço aos meus pais, Nelson Bohlen e Regiane C. M. M. Bohlen, pela vida que me deram e por servirem de base para minha formação pessoal, e juntamente à minha irmã, Barbara M. Bohlen, por todo amor e paciência.

E principalmente agradeço à CAPES e à FAPESP (Processo nº 2015/14588-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP) pelas bolsas concedidas, que permitiram que eu me dedicasse à pesquisa.

"You should never view your challenges as a disadvantage. Instead, it's important for you to understand that your experience facing and overcoming adversity is actually one of your biggest advantages."

Michelle Obama

RESUMO

Bohlen TM. Influência da sensibilidade à leptina na maturação sexual de camundongos. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Como a incidência de obesidade em crianças têm aumentado e a leptina é um fator permissivo para o início da puberdade, os níveis circulantes de leptina elevados se tornaram um fator comum que pode causar um adiantamento da puberdade. Entretanto, o aumento no acúmulo de gordura nos organismos está associado à resistência ao hormônio leptina. Atualmente existem poucas informações sobre como a sensibilidade a esse hormônio afeta o desenvolvimento sexual. Portanto, este projeto teve como objetivo investigar como diferentes modelos de sensibilidade ou resistência à leptina agem na puberdade de camundongos fêmeas. Técnicas como acompanhamento *in vivo* das diferentes fases da maturação sexual e da composição corporal, testes de sensibilidade à leptina, testes de tolerância à glucose e à insulina, e PCR em tempo real foram utilizadas. Animais com maior peso corporal desde a infância apresentaram adiantamento da maturação sexual, maior acúmulo de gordura corporal e alterações na expressão de genes metabólicos. Já animais que sofreram inativação do gene *Socs3* no sistema nervoso central ou em células que expressam o receptor de leptina, apresentaram um atraso na maturação sexual e alterações na expressão de genes relacionados ao consumo alimentar, porém nos casos de inativação em células Kiss1, os animais não apresentaram nenhum tipo de alteração. Dessa forma, concluímos que o peso corporal é mais importante para o desencadear da maturação sexual do que a sensibilidade do organismo ao hormônio leptina, sugerindo que a leptina atua na maturação sexual de forma indireta sobre o eixo hipotálamo – hipófise – gonadal. Além disso, na análise da expressão de genes ao longo do desenvolvimento traçamos um perfil de genes associados à reprodução e metabolismo, que servirão de base para comparação para outros estudos.

Palavras-chave: obesidade; SOCS3, resistência à leptina; puberdade precoce; reprodução.

ABSTRACT

Bohlen TM. Leptin sensibility influences on mouse sexual maturation. [Ph. D. thesis (Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

As the incidence of obesity in children has increased and leptin is a permissive factor for the onset of puberty, elevated circulating leptin levels have become a common factor that may cause puberty to progress. However, the increase in fat accumulation in organisms is associated with resistance to the hormone leptin. There is currently little information on how sensitivity to this hormone affects sexual development. Therefore, this project aimed to investigate how different models of leptin sensitivity or resistance act in the puberty of female mice. Techniques such as *in vivo* monitoring of the different stages of sexual maturation and body composition, leptin sensitivity tests, glucose and insulin tolerance tests, and real-time PCR were used. Animals with higher body weight since childhood presented an advance of sexual maturation, greater accumulation of body fat and alterations in the expression of metabolic genes. On the other hand, animals that underwent inactivation of the *Socs3* gene in the central nervous system or cells expressing the leptin receptor showed a delay in sexual maturation and alterations in the expression of genes related to food consumption, but in cases of inactivation in Kiss1 cells, animals did not present any type of change. Thus, we conclude that body weight is more important for the onset of sexual maturation than the body's sensitivity to the hormone leptin, suggesting that leptin acts indirectly on sexual maturation on the hypothalamus - pituitary - gonadal axis. In addition, in the analysis of gene expression along the development we have traced a profile of genes associated with reproduction and metabolism, which will serve as a basis for comparison to other studies.

Key - words: obesity; SOCS3, resistance to leptin; early puberty; reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES/ FIGURAS

Figura 1. 19

Figura 2. Esquema do eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal sob o controle dos neurônios GnRH da área pré-óptica medial (MPA). 20

Figura 3. Esquema do eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal (HPG) reorganizado após a descoberta dos neurônios Kiss1 22

Figura 4. Vias de sinalização recrutadas pelo receptor de leptina 27

Figura 5. Representação gráfica das temperaturas durante termociclador 32

Figura 6. Ciclo de temperaturas utilizadas para a realização da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) 38

Figura 7. Fêmeas criadas em ninhadas reduzidas se tornaram obesas 43

Figura 8. Animais do grupo NR apresentam adiantamento da maturação sexual 44

Figura 9. Variações decorrentes do aumento de peso na infância 45

Figura 10. Avaliação corporal dos grupos NR e controle, com 32 dias de vida ... 46

Figura 11. Fêmeas adultas do grupo NR não apresentam resistência à leptina .. 47

Figura 12. Deleção neuronal do gene SOCS3 causa redução do peso corporal ... 47

Figura 13. Deficiência neuronal de SOCS3 afeta o desenvolvimento sexual 48

Figura 14. Inativação neural global do SOCS3 aumenta a sensibilidade à leptina 49

Figura 15. Deleção global do gene *SOCS3* de células com receptor LepR causa redução de peso corporal 49

Figura 16. Deleção específica de SOCS3 causa atraso na maturação sexual 50

Figura 17. Inativação do SOCS3 em células que expressam LepR causa redução de peso corporal durante a puberdade, atrasa o desenvolvimento sexual e aumenta a sensibilidade à leptina 51

Figura 18. Avaliação corporal dos grupos LepR SOCS3 KO e controle, com 32 dias de vida 52

Figura 19. Expressão gênica hipotalâmica no dia da abertura vaginal 54

Figura 20. Expressão gênica hipotalâmica aos 32 dias de vida 55

Figura 21. Validação do animal Kiss1 SOCS3 KO 56

Figura 22. Peso corporal não é afetado pela deleção de Socs3 nas células que expressam o gene *Kiss1* 57

Figura 23. Expressão de *Socs3* em células que expressam o gene *Kiss1* não é necessária para a maturação sexual de fêmeas 58

Figura 24. Inativação de Socs3 em células que expressam o gene *Kiss1* não afetam a fertilidade 59

Figura 25. Inativação do SOCS3 de células que expressam o gene *Kiss1* não interfere no metabolismo glicêmico 60

Figura 26. Sensibilidade à leptina entre grupos experimentais é semelhante e a inativação do SOCS3 não afeta a composição corporal 61

Figura 27. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com reprodução na área pré-óptica medial 63

Figura 28. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com reprodução na área médio basal 63

Figura 29. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com reprodução na área pré-mamilar ventral 64

Figura 30. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com o controle metabólico 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências genômicas dos primers utilizados para genotipagem dos animais dos diferentes grupos experimentais 32

Tabela 2. Lista de genes analisados via RT-PCR ..... 39 e 40

Tabela 3. Resumo dos resultados dos grupos acompanhados 62

LISTA DE ABREVIATURAS

Actb **–** gene codificante da proteína beta-actina

Agrp **–** gene codificante da proteína relacionada ao gene agouti

AgRP – proteína relacionada ao gene agouti

Ar **–** gene codificante do receptor de andrógeno

ARH – núcleo arqueado

ASC – área sob a curva

AV – abertura vaginal

AVPV – núcleo periventricular anteroventral

Cart **–** gene codificante do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

CART – transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

cDNA – DNA constitutivo

Dio2 **–** gene codificante da iodotironinas deiodinases tipo 2

Dio3 **-** gene codificante da iodotironinas deiodinases tipo 3

Dlk1 **–** "protein delta homolog 1"

DNA – ácido desoxirribonucleico (ADN em português)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Esr1 **–** gene codificante do receptor de estrógeno do tipo α

Esr2 **–** gene codificante do receptor de estrógeno do tipo β

FSH – hormônio folículo-estimulante

Gal **–** gene codificante do peptídeo galanina

Gapdh **–** gene codificante da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GHr – receptor do hormônio de crescimento

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

Gnrh1 **–** gene codificante do hormônio liberador de gonadotrofinas

GTT – "Glucose Tolerance Test"

hGH – hormônio de crescimento humano

HPG – eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal

IL-2 – interleucina-2

IRS – substrato de receptor de insulina

JAK2 – janus cinases 2

ITT – "Insulin Tolerance Test"

Kiss1 **–** gene codificante de kisspeptina

Kiss1r **–** gene codificante do receptor de kisspeptina

KO – "Knockout"

KPBS – tampão fosfato de potássio

LH – hormônio luteinizante

LepR – receptor de leptina

MAPK – proteíno-quinases ativadas por mitógenos

Mkrn3 **–** "makorin ring finger protein 3"

MPA – área pré-óptica medial

MPO – núcleo pré-óptico medial

Nos1 **-** gene codificante da proteína óxido nítrico sintase 1

Npy **-** gene codificante do neuropeptídeo Y

NPY – neuropeptídeo Y

NR – ninhada reduzida

Ob-rb **–** gene codificante do receptor de leptina

Ob-Rb – isoforma b do receptor de leptina

Pb – pares de bases

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – "Polimerase Chain Reaction"

PeN – núcleo periventricular anterior

Pgr **–** gene codificante do receptor de progesterona

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

PMv – Núcleo pré-mamilar ventral

Pomc **–** gene codificante da pró-opiomelanocortina

POMC – pró-ópiomelanocortina

Ppia **–** gene codificante da ciclofilina A

RNA – ácido ribonucleico (ARN em português)

RNAm – RNA mensageiro

RP – Retroperitoneal

RT-PCR – "Real Time Polimerase Chain Reaction"

STATs – proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição

SNC – sistema nervoso central

Tac2 **-** gene codificante da neurocinina b

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
1.1 Puberdade e Reprodução 17
1.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal 18
1.2 Reprodução e Obesidade 22
1.3 A Leptina 23
1.3.1 Sinalização celular da leptina 25
2. JUSTIFICATIVA 28
3. OBJETIVOS 29
3.1 Objetivos específicos 29
4. MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1 Maturação sexual 30
4.1.1 Animais utilizados 30
4.2 Validação do modelo animal 33
4.2.1 Extração de DNA 33
4.2.2 PCR e gel de eletroforese 34
4.3 Desenho experimental 34
4.3.1 Acompanhamento da maturação sexual 34
4.3.2 Coleta dos tecidos 35
4.3.3 Extração de RNA de hipotálamo total 35
4.3.4 Preparação de cDNA 36
4.3.5 RT-PCR 36
4.4 Caracterização gênica de núcleos hipotalâmicos durante a maturação sexual 38
4.5 Teste de Tolerância à Glicose e à Insulina 40
4.6 Dosagem hormonal 41
4.7 Teste de sensibilidade à leptina 41
4.8 Análises estatísticas 42
5. RESULTADOS 43
5.1 Fêmeas criadas em ninhada reduzida se tornaram obesas e apresentaram alterações no desenvolvimento sexual 43
5.2 Deficiência neuronal de *SOCS3* reduz o peso corporal, afeta o desenvolvimento sexual e aumenta a sensibilidade à leptina 47

5.3 Deleção do gene SOCS3 em células que possuem o receptor de leptina promove atraso na maturação sexual 49
5.4 Diferentes níveis de sensibilidade à leptina promovem alterações na expressão gênica de genes metabólicos 52
5.5 Acasalamento de animais Kiss1-Cre com animais SOCS3-flox promovem a inativação do Socs3 em células que expressam o gene Kiss1 56
5.6 Deleção global do gene *SOCS3* de células que expressam o gene *Kiss1* não interfere no desenvolvimento e na maturação sexual de camundongos 56
5.7 Metabolismo glicêmico não sofre alterações com a inativação de Socs3 em células Kiss1 60
5.8 Resposta à leptina e composição corporal não são afetados pela deleção de SOCS3 em células Kiss1 61
5.9 O desenvolvimento da maturação sexual de camundongos fêmeas é acompanho por mudanças na expressão de genes hipotalâmicos 62
6. DISCUSSÃO 66
6.1 Caracterização gênica ao longo do desenvolvimento 71
7. CONCLUSÕES 75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76
ANEXOS 91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Puberdade e Reprodução

Os organismos que encontramos na Terra têm ao menos uma coisa em comum: a capacidade de se reproduzir. Seja essa reprodução do tipo assexual ou sexual. Sem essa característica, os organismos não transferem sua carga genética a nenhum descendente e, portanto, deixam de existir. Dessa forma, os processos reprodutivos são de suma importância para a perpetuação das espécies (Darwin, 1859). No caso de animais de reprodução sexuada, é necessário que os gametas de dois sexos diferentes se encontrem, e se fusionem, para que um novo organismo seja gerado. E todo o processo reprodutivo envolve diferentes, e complexos, sistemas fisiológicos. Dentre esses diversos sistemas, o controle exercido pelo eixo hipotálamo – hipófise – gonadal (HPG) na reprodução de vertebrados pode ser considerado um dos mais importantes (Neill et al., 2006).

A puberdade é a fase de transição entre a infância e a fase adulta, sendo que em mulheres, a primeira menstruação é considerado um dos marcos finais para a entrada na fase adulta (Day et al., 2015; Parent et al., 2003; Teles et al., 2008). Em roedores três fases são importantes para a determinação da puberdade: abertura vagina, primeira cornificação das células no lavado vaginal (ou 1º estro), ambos eventos dependentes do aumento dos níveis circulantes de estrógenos, e início da ciclicidade estral (Bakker et al., 1977; Caligioni, 2009; Marcondes et al., 2002; Navarro et al., 2004; Nelson et al., 1990, 1982; Yener et al., 2007; Yoon, 1955). O ciclo estral de roedores é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metestro e o diestro. As mudanças de fase ocorrem pelas variações no padrão de secreção dos hormônios sexuais, dentre eles o estradiol (Caligioni, 2009; Nelson et al., 1982, 1981; Parkening et al., 1982; Walmer et al., 1992). Uma fêmea que tenha passado por todas as fases pode ser considerada apta à reprodução (Nelson et al., 1990).

Diferentes fatores podem interferir na puberdade. Diversos estudos já mostraram que tanto em humanos, quanto em modelos experimentais, fatores genéticos, como mutações em genes que codificam receptores e ou peptídeos, podem causar adiantamento ou atraso da puberdade (Abreu et al., 2013; Funes et al., 2003; Ojeda et al., 2010; Ojeda and Lomniczi, 2014; Parent et al., 2003; de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003; Teles et al., 2008); assim como fatores ambientais, étnicos, nutricionais, bem como, atividade física realizada (Bohlen et al., 2018, 2016; Parent et al., 2003; Welt et al., 2005). Um importante elo entre puberdade e estado nutricional são os níveis circulantes de leptina, uma vez que é necessário que os organismos

disponham de um mínimo de gordura corporal para iniciar a puberdade (Ahima et al., 1996; Frederich et al., 1995; Frisch and McArthur, 1974; Maffei et al., 1995).

1.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

Há 60 anos, Geoffrey Harris foi um dos primeiros a formar a hipótese de que uma porção do hipotálamo era responsável por controlar a função da hipófise (ou pituitária) anterior, controlando sua produção e secreção, através de uma substância humoral (Figura 1) (Plant, 2015; Watts, 2015). Em 1971, dois laboratórios relataram que uma molécula produzida no hipotálamo e liberada no sistema porta-hipofisário, controladora da síntese e da secreção do hormônio luteinizante (LH), poderia ser a reguladora das gonadotrofinas hipofisárias (Amoss et al., 1971; Matsuo et al., 1971). No mesmo ano, após o isolamento e descrição como um decapeptídeo, essa molécula foi sintetizada em laboratório, e experimentos provaram sua ação no controle da síntese tanto de LH como do hormônio folículo-estimulante (FSH), passando a ser chamada como a conhecemos hoje: hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Schally et al., 1971).

Com a descoberta do GnRH, os estudos que buscavam compreender sua estrutura, onde era sintetizado, sua ação, foram se multiplicando. Pouco tempo depois, um anticorpo para marcação de GnRH foi desenvolvido (Barry et al., 1973), e desde 1989 sabe-se que os neurônios que sintetizam esse hormônio são fruto de divisões celulares na placa olfativa que migram para o hipotálamo durante o desenvolvimento embrionário, se alojando na área pré-óptica medial (MPA) e no hipotálamo médio-basal (Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Wray et al., 1989).

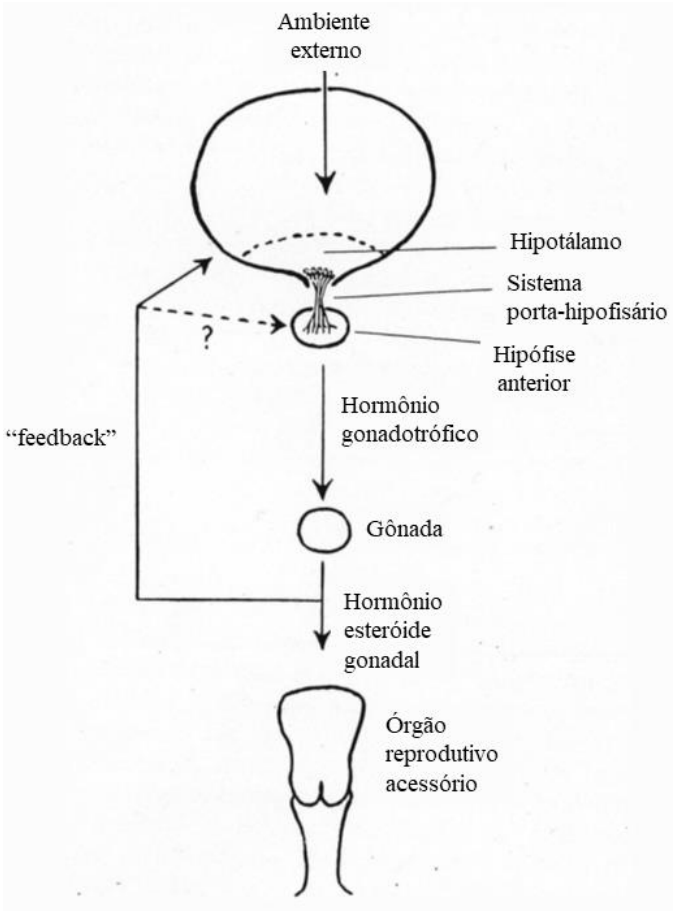

Figura 1. Esquema do controle hipotalâmico na reprodução proposto por Geoffrey Harris, modificado de Plant, 2015.

Devido ao seu papel na influência da síntese do LH e FSH na hipófise, o GnRH foi descrito como principal hormônio regulador do eixo HPG. Esse eixo, como seu nome já deixa claro, é composto por três estruturas (hipotálamo, hipófise e gônadas). Os cientistas já sabiam que a secreção de LH ocorria de forma pulsátil desde o final da década de 60 (Dierschke et al., 1970) e, com a posterior descoberta da regulação exercida pelo GnRH, descobriu-se que a sua secreção também ocorre de forma pulsátil (Clarke and Cummins, 1982). E como funciona o eixo HPG? O GnRH sintetizado no hipotálamo, é liberado na eminência mediana, sendo captado pelo sistema porta-hipofisário, e direcionado à hipófise anterior, onde estimulará a síntese e liberação dos hormônios LH e FSH. Estes hormônios são liberados na corrente sanguínea e atuarão nas gônadas. Nas fêmeas adultas, o pico de LH promove a ovulação e a formação do corpo lúteo (que produzirá progesterona). Em machos, a secreção pulsátil de LH atua nas células de Leydig e promove a síntese e secreção de testosterona. O FSH atua na maturação das células germinativas, ou seja, nas fêmeas impede o processo de apoptose programada dos folículos ovarianos, e nos machos estimula a divisão celular dos espermatócitos primários e capacita as células de Sertoli para continuar a formação dos espermatozoides. Os

hormônios sexuais produzidos pelas gônadas funcionam como alças de retroalimentação, atuando diretamente tanto no hipotálamo como na hipófise (Figura 2) (Neill et al., 2006).

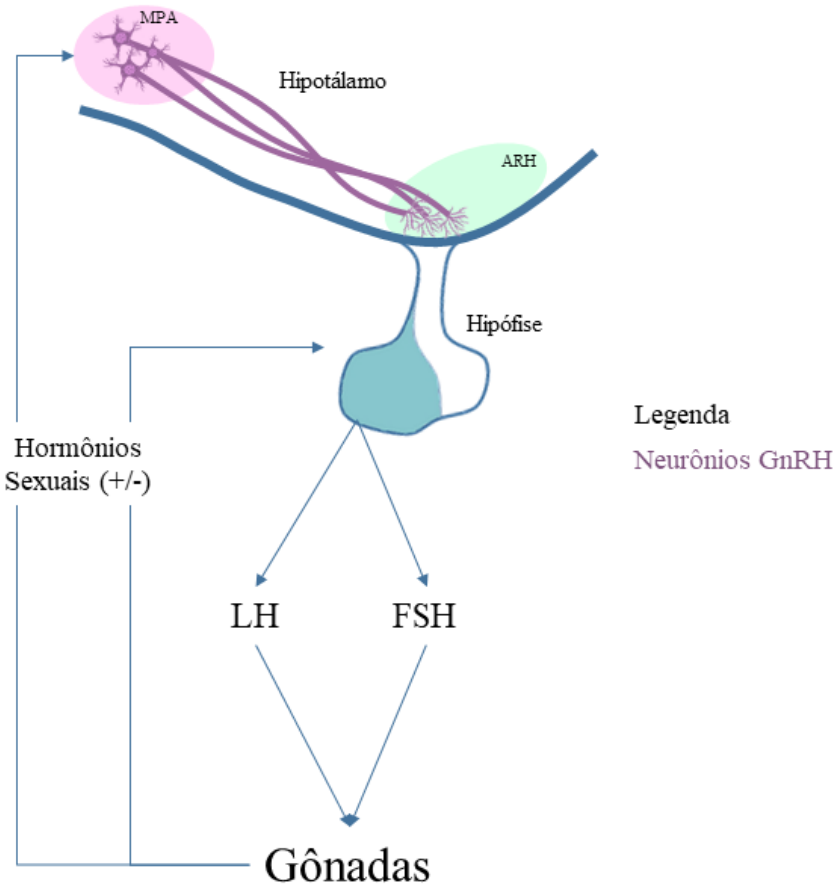

Figura 2. Esquema do eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal sob o controle dos neurônios GnRH da área pré-óptica medial (MPA). Neurônios na região MPA sintetizam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que é liberado na eminência mediana. O hormônio GnRH atua na adenohipófise, influenciando a síntese dos hormônios luteinizante e folículo-estimulante (LH e FSH, respectivamente), que são liberados na corrente sanguínea e agem nas gônadas, estimulando a síntese de hormônios sexuais que realizam o mecanismo de retroalimentação no eixo HPG. ARH: núcleo arqueado; MPA: área pré-óptica medial.

Em 2003, três laboratórios associaram o hipogonadismo hipogonadotrófico, uma deficiência reprodutiva de origem neural que provoca redução do tamanho gonadal e consequente infertilidade tanto em humanos quanto em modelos experimentais, à mutações na expressão do gene *Kiss1* ou de seu receptor, o Kiss1r (anteriormente denominado de GPR54) (Funes et al., 2003; de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). O gene *Kiss1*, descrito inicialmente como um supressor de metástase que se liga à um tipo de receptor de membrana da família dos receptores acoplados à proteína-G, passou então a ser estudado com um enfoque no sistema reprodutivo (Kotani et al., 2001; Lee et al., 1996; Ohtaki et al., 2001). A partir dessa descoberta, foi demonstrado que neurônios que expressam o gene *Kiss1* (denominados como

neurônios Kiss1 no presente projeto) estão distribuídos em três áreas hipotalâmicas: núcleo periventricular anteroventral e periventricular anterior (AVPV/PeN) e núcleo arqueado (ARH), dentre outras áreas cuja importância estão sendo desvendadas (Cravo et al., 2011; Jeremy T. Smith et al., 2006; Smith et al., 2005a). Conforme relatado por Han e outros pesquisadores, no caso de roedores, os núcleos AVPV/PeN apresentam expressão dimórfica do *Kiss1*, além de ser maior em fêmeas, característica não observada em relação ao ARH (Clarkson and Herbison, 2006; Han et al., 2005). Além disto, sabe-se que neurônios GnRH expressam receptores Kiss1r (Irwig et al., 2004; Messager et al., 2005) e que neurônios do núcleo AVPV/PeN e ARH possuem projeções para a MPA (Canteras et al., 1994; Simonian et al., 1999). Dessa forma, houve uma mudança significativa na descrição do eixo HPG. Atualmente, sabe-se que alterações nos níveis circulantes de estrógenos são percebidas pelos neurônios Kiss1, que sintetizam as kisspeptinas (nome do peptídeo sintetizado pelo gene *Kiss1*) e informam os neurônios GnRH, visto que, estes não expressam receptores de estrógeno do tipo α (Erα) (Frazão et al., 2013; Hrabovszky et al., 2000; Smith et al., 2005a).

Desde a descoberta dos neurônios Kiss1, busca-se compreender qual a diferença nas funções das duas principais subpopulações hipotalâmicas. Atualmente sabe-se que neurônios Kiss1 da região AVPV/PeN sinalizam aos neurônios GnRH se eles devem sintetizar o respectivo hormônio, e esse controle possivelmente ocorre pois, como alguns estudos tem demonstrado, os neurônios da região AVPV/PeN atuam respondendo ao controle positivo aos estímulos de hormônios sexuais produzidos pelas gônadas. Outros estudos têm demonstrado que os neurônios do ARH respondem ao controle negativo dos hormônios sexuais gonadais, dessa forma, sendo os responsáveis por controlar a liberação do hormônio GnRH na eminência mediana (Figura 3) (Glidewell-Kenney et al., 2007; Lehman et al., 2018; Navarro and Tena-Sempere, 2012; Jeremy T. Smith et al., 2006; Smith et al., 2005b, 2005a).

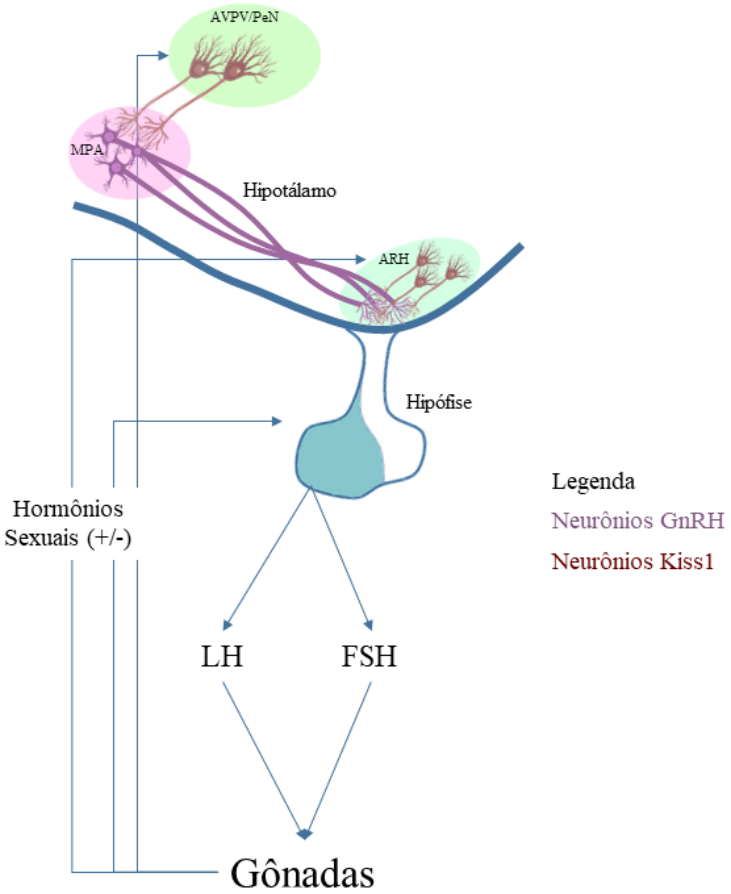

Figura 3. Esquema do eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal (HPG) reorganizado após a descoberta dos neurônios Kiss1. Neurônios Kiss1 localizados nos núcleos periventricular anteroventral e periventricular anterior (AVPV/PeN) e no núcleo arqueado (ARH) regulam o eixo HPG, sendo considerados os principais moduladores da atividade de neurônios GnRH. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) atua na adenohipófise, influenciando a síntese dos hormônios luteinizante e folículo-estimulante (LH e FSH, respectivamente), que são liberados na corrente sanguínea e agem nas gônadas, estimulando a síntese de hormônios sexuais que, por sua vez, realizam um mecanismo de retroalimentação no eixo HPG. MPA: área pré-óptica medial.

1.2 Reprodução e Obesidade

Durante as últimas décadas, diversos países estão passando por uma epidemia de obesidade, fato que afeta não apenas adultos, mas crianças e adolescentes também (World Health Organization, n.d.). A obesidade, além de estar associada a doenças cardíacas (Cali and Caprio, 2008), pode desencadear outras doenças e falhas metabólicas, e atrapalhar a convivência social (Griffiths et al., 2006; Janssen et al., 2004).

Sabe-se que a obesidade infantil está relacionada ao estado nutricional da mãe e também ao aporte nutricional pós-natal. No caso de modelos animais, diferentes estudos com diferentes roedores (ratos e camundongos) mostram que animais provenientes de ninhadas pequenas (após manipulação para redução do tamanho da ninhada) se tornam mais pesados que os pares de ninhadas de tamanho normal, e esse peso corporal maior se mantém até a fase adulta, podendo

ser acompanhada por diferenças no acúmulo de gordura corporal ou não (Habbout et al., 2013; Kennedy, 1957; Zhang et al., 2011). O excesso de consumo alimentar pós-natal, que causa o aumento de peso dos animais, também gera outras condições fisiológicas preocupantes que podem promover diversas doenças na vida adulta (Chabod et al., 2011; Dorner and Plagemann, 1994; Habbout et al., 2013). Dentre as disfunções induzidas pela obesidade, é importante destacar que o excesso de peso causa o adiantamento da maturação sexual em humanos e em roedores (Bohlen et al., 2018, 2016; Burt Solorzano and McCartney, 2010; Frisch and McArthur, 1974; Hillman et al., 2013; Kaplowitz et al., 2001; Kennedy, 1957). Diferentes estudos comprovaram que tanto em humanos como em animais experimentais a puberdade é antecipada devido ao maior ganho de peso (Biro et al., 2012, 2010; Bohlen et al., 2016; Chabod et al., 2011; Habbout et al., 2013; Wattigney et al., 1999). O fato de atualmente a puberdade em meninas estar adiantada deve ser considerado um fator de risco na população, pois já está descrito que o adiantamento no amadurecimento sexual aumenta as chances de desenvolvimento de diabetes e câncer de mama na fase adulta, causa alterações de comportamento durante a adolescência e, devido ao desenvolvimento precoce de características sexuais secundárias, adianta experiências sexuais (Golub et al., 2008; Lakshman et al., 2008; Petridou et al., 1996; Walvoord, 2010).

1.3 A Leptina

Desde o início da década de 90, já se supunha que alguma molécula relacionada ao tecido adiposo atuava no hipotálamo e tinha uma função importante no controle metabólico (Friedman and Leibel, 1992). Uma linhagem de animais que apresentavam peso corporal elevado foi tratada com um hormônio sintetizado em laboratório sendo que, o tratamento induziu a redução de peso corporal, o desencadear da puberdade e o estabelecimento das funções reprodutivas. Essa linhagem em questão era a *ob/ob*, em que os animais não expressavam o gene que codificava o hormônio leptina em homozigose. A partir de então foi reconhecida a atividade e a função do gene *obese*, sendo o nome atual do produto gerado por este gene proposto por Halaas et al., cuja inspiração foi a palavra grega leptós (λεπτός), que para organismos, significa magro (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Zhang et al., 1994). Sendo assim, sabe-se que a leptina, uma molécula de 16-kDa, é um hormônio secretado de forma proporcional a quantidade de tecido adiposo que atua como sinalizador de saciedade para o organismo (Frederich et al., 1995). Maffei e colaboradores propuseram ainda que a resistência à leptina pode ser o fator que promove a obesidade e um

consequente aumento no níveis circulantes de leptina no plasma (Coppari and Bjørbæk, 2012; Maffei et al., 1995).

A partir de sua descoberta diferentes estudos demonstraram que a leptina é responsável por informar o estado nutricional do indivíduo, integrando as respostas neuroendócrinas, comportamentais e autonômicas, por estar envolvida em diversas vias de sinalização entre muitos núcleos hipotalâmicos (Elias et al., 2000; Pelleymounter et al., 1995; Zhang et al., 1994). Sabe-se que o receptor de leptina (LepR) está distribuído em diversos tecidos, sendo que no sistema nervoso central (SNC), este receptor tem distribuição ampla, sendo encontrado em abundância em núcleos hipotalâmicos cuja função está relacionada ao balanço energético, como o ARH, o núcleo hipotalâmico ventromedial, o núcleo paraventricular e o núcleo pré-mamilar ventral (PMv), além de outras regiões como córtex, hipocampo, tálamo (Elias et al., 2000; Elmquist et al., 1997; J. K. Elmquist et al., 1998; Mercer et al., 1996b). Sendo a mesma distribuição evidenciada em animais geneticamente modificados (Scott et al., 2009). Dentre as funções da leptina estão o aumento da termogênese e gasto energético, controle da pressão sanguínea por mediar as respostas homeostáticas, modulação do sistema nervoso simpático e parassimpático e regulação do consumo alimentar (Haynes et al., 1997; Hwa et al., 2008; Scarpace et al., 2017). No ARH, sabe-se que neurônios que expressam o neuropeptídeo Y e a proteína relacionada ao gene agouti (NPY e AgRP, respectivamente, que possuem atividade orexigênica) e neurônios que expressam a pró-opiomelanocortina e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (POMC e CART, respectivamente, que possuem atividade anorexigênica) coexpressam o LepR. Dessa forma, a leptina atua no controle no balanço energético inibindo a atividade de neurônios NPY/AgRP e promovendo a atividade de neurônios POMC e CART (Baskin et al., 1999; Broberger et al., 2002; Cheung et al., 1997; Elias et al., 2000; Håkansson et al., 1996; Malcher-Lopes et al., 2006; Mercer et al., 1996a; Mizuno et al., 1998; Schwartz et al., 1996; Stephens et al., 1995; Thornton et al., 1997). No que se refere a reprodução sabe-se que os níveis circulantes de leptina no soro são inversamente proporcional à idade de primeira menstruação em humanos (Matkovic et al., 1997). Em camundongos, fêmeas saudáveis, o tratamento com leptina em idade pré-púbere induz a antecipação da puberdade (Ahima et al., 1997; Chehab et al., 1997). Além disto, tanto em humanos como em roedores a deficiência da sinalização da leptina no hipotálamo pode ser relacionado à casos de hipogonadismo hipogonadotrófico, sendo esse quadro revertido com o tratamento com leptina, como mencionado anteriormente (Ahima et al., 1996; Chan et al., 2003; Montague et al., 1997).

Apesar de neurônios do MPA possuírem o LepR, ainda se discute na literatura se os neurônios GnRH possuem esse receptor, sendo em quantidades muito baixa (José Donato et al.,

2011). Um estudo de 2009 mostrou que, em ratos de ambos os sexos, a deleção do LepR do prosencéfalo desses animais fez com que eles não fossem férteis, e que quando essa deleção ocorreu apenas em neurônios GnRH, os animais não eram inférteis. Além disso, análises de PCR de neurônios GnRH de ratas mostrou que essas células não expressavam o RNAm do gene do LepR (Quennell et al., 2009). Portanto, o que fica explícito é que se neurônios GnRH possuem o LepR, eles não são os responsáveis por ativar as funções reprodutivas desses neurônios.

Em camundongos machos *ob/ob* castrados, os neurônios Kiss1 são diretamente afetados pelo efeito da leptina, a quantidade de RNAm do *Kiss1 é* quase re-estabelecido aos mesmos níveis encontrados em animais controle, e por dupla marcação de hibridização *in situ* foi demonstrado que aproximadamente 40% dos neurônios Kiss1 expressam o LepR (J. T. Smith et al., 2006). Porém em camundongos fêmeas foi mostrado que os neurônios Kiss1 apresentam aumento da sinalização da leptina apenas após a puberdade (Cravo et al., 2013) e que a deleção do LepR de células que expressam o gene *Kiss1* não interfere na puberdade (Jose Donato et al., 2011). Esse mesmo estudo de Donato e colaboradores em 2011 demonstrou que lesões bilaterais do PMv de animais *ob/ob* impediu a ação da leptina endógena em induzir a maturação sexual, e que a re-expressão do LepR unilateral no PMv de fêmeas LepR-null (ou seja, que não expressavam o LepR) foi o suficiente para reestabelecer a maturação sexual desses animais (Jose Donato et al., 2011). O PMv possui alta densidade de neurônios que expressam o LepR (Joel K. Elmquist et al., 1998), e como uma subpopulação deles faz sinapse com neurônios GnRH no MPA, esses neurônios do PMv são potenciais responsáveis em responder à leptina e a informar o estado metabólico aos neurônios GnRH, dessa forma, afetando a maturação sexual (Leshan et al., 2009).

1.3.1 Sinalização celular da leptina

A forma tridimensional da leptina se assemelha à da família das citocinas helicoidas, das quais a molécula interleucina-2 (IL-2) e o hormônio de crescimento fazem parte, sugerindo que a sinalização com seu receptor ativa a cascata de resposta celular via janus cinases 2 (JAK2) e proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STATs) (cascata JAK-STAT) (Madej et al., 1995).

A leptina possui seis isoformas de receptores transmembrana, porém apenas a sua forma longa (Ob-Rb) possui todos os sítios para ativar a cascata de resposta promovida pela ligação da molécula ao seu receptor. A isoforma b do LepR é de cadeia única e pertence à família de

receptores de citocinas de classe I (Chen et al., 1996; Ramos-Lobo and Donato, 2017; Tartaglia et al., 1995). Uma das vias de resposta celular quando a leptina se liga ao seu receptor, promove a dimerização do mesmo, aproximando as JAK2 associadas ao receptor e induzindo sua fosforilação com resíduos de tirosina, virando sítios de ligação para proteínas com domínios SH2 aos quais as STATs se ligam. Após essa ligação, as STATs se auto fosforilam, se dimerizam e se separam do receptor. Uma vez desconectadas do receptor, esse dímero se desloca para o núcleo e promove a transcrição de genes alvo, como por exemplo, da proteína supressora de sinalização de citocina tipo 3 (SOCS3), dentre outros. A SOCS3 vai atuar como bloqueadora da atividade da JAK2, inibindo a resposta celular quando a leptina se liga ao seu receptor (Figura 4) (Babon and Nicola, 2012; Banks et al., 2000; Baumann et al., 1996; Devos et al., 1997; Ghilardi et al., 1996; Nakashima et al., 1997; Ramos-Lobo and Donato, 2017; Tartaglia, 1997). Outra via de sinalização celular que pode ser recrutada pela leptina é a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Neste caso, a resposta celular pode ser imediata, pois a fosforilação da JAK2 promove a fosforilação do substrato de receptor de insulina (IRS), que então ativa a PI3K, que induz mudanças em canais de íons na membrana celular. A via da PI3K também pode induzir alterações na expressão gênica. A PI3K fosforilada vai promover a fosforilação de substratos lipídicos, as proteínas dependentes de fosfoinositídeo, que por sua vez, promovem a fosforilação de proteínas quinases. Essas proteínas quinases fosforilam fatores de transcrição, que migram para o interior do núcleo e promovem a trasncrição dos genes alvo. Além disto, a ativação do receptor de leptina também pode recrutar a via da proteíno - quinases ativadas por mitógenos, que também poderão induzir alterações na expressão de genes alvo (Figura 5) (Donato et al., 2010a; Niswender et al., 2003; Ramos-Lobo and Donato, 2017).

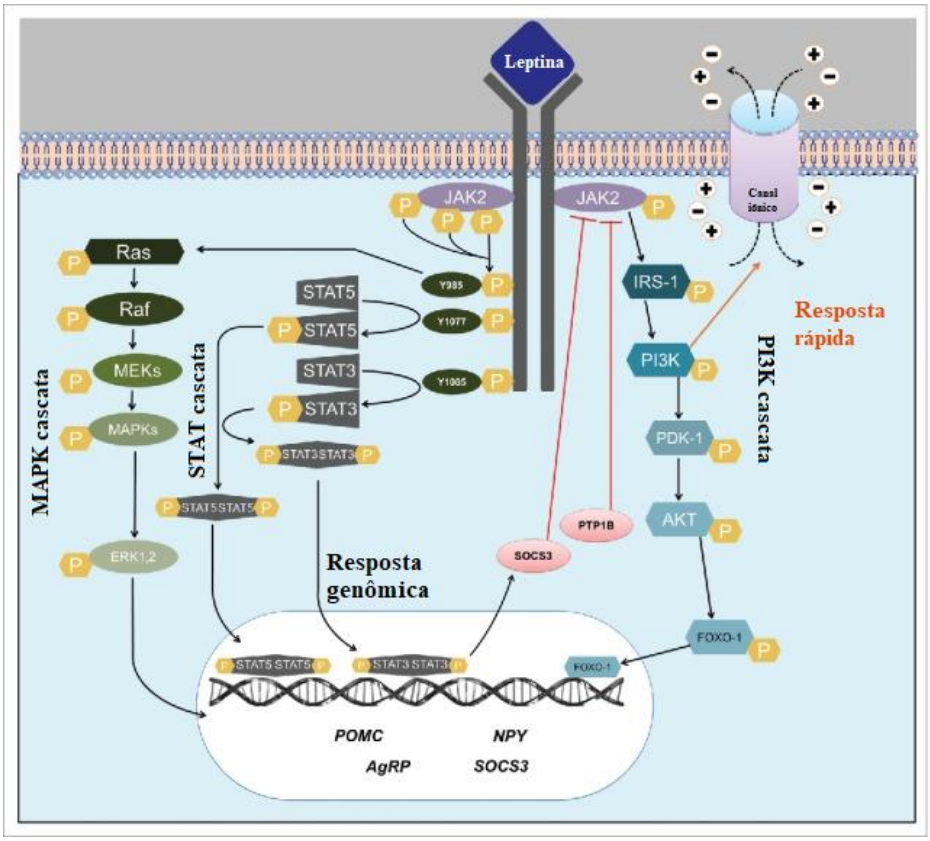

Figura 4. Vias de sinalização recrutadas pelo receptor de leptina. Representações das diferentes vias de sinalização que podem ser recrutadas após a ativação do receptor de leptina, dentre estas a via janus cinases 2 e proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (JAK/STATs), via que recruta a fosfatidilinositol-3-Quinase (PI3K) e a via proteíno - quinases ativadas por mitógenos (MAPK) Modificada de Ramos-Lobo & Donato, 2017.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade e o sobrepeso se tornaram uns dos maiores males da sociedade moderna, sendo que em alguns países, mais da metade da população se encontra em uma das duas categorias. Sabe-se que sobrepeso/obesidade influencia o aparecimento precoce de doenças cardiovasculares, distúrbios mentais e problemas ortopédicos, dentre outras patologias. Além disto, outro fator que tem chamado bastante atenção é o desenvolvimento precoce da puberdade, em humanos ou animais experimentais, devido ao sobrepeso/obesidade. Por outro lado, em casos de atletas e bailarinas (atividades de alto desempenho) que apresentam uma porcentagem de gordura corporal baixa, evidências demonstram o atraso na idade da menarca, sendo que, camundongos fêmeas com baixo peso corporal também apresentam alterações no desencadear da maturação sexual (Bohlen et al., 2018; Welt et al., 2005). Apesar de toda literatura que existe a respeito de como a sensibilidade à leptina interfere na maturação sexual, os mecanismos moleculares envolvidos no adiantamento ou atraso do desenvolvimento puberal devido a variação de peso corporal ainda não são compreendidos.

3. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo averiguar os mecanismos responsáveis pela indução da puberdade, com ênfase no possível papel desempenhado pelo hormônio leptina, em modelos de hipersensibilidade ou de resistência à leptina.

3.1 Objetivos específicos:

a) Avaliar o início e a progressão da puberdade em camundongos hipersensíveis à leptina;

b) Investigar o início e a progressão da puberdade em um modelo de camundongos que apresenta obesidade infantil induzida pelo excesso de oferta de alimento ao se reduzir o número de animais por ninhada;

c) Determinar a expressão hipotalâmica de transcritos envolvidos com o controle da puberdade nos modelos descritos anteriormente;

d) Avaliação da expressão gênica de núcleos hipotalâmicos relacionados à maturação sexual e ao controle metabólico em três momentos da vida do animal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Maturação sexual

4.1.1 Animais utilizados

Para a realização deste projeto, foram utilizados camundongos fêmeas. Em todos os experimentos, os camundongos tiveram acesso *ad libitum* à dieta regular de roedores (2.99 kcal/g; 9.4% calorias de gordura; Quimtia, Brazil), mantidos em ciclo de luz normal de biotério (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e à temperatura 22 ºC. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (n.12/fls. 03 do livro 03, aprovado em 19/03/2013).

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

1) Ninhada Reduzida (NR): composto por camundongos C57BL/6 cuja ninhada foi reduzida 5 dias após o nascimento, sendo a ninhada reduizda mantida com apenas 3 animais. Enquanto o grupo controle foi composto por 7-8 animais por ninhada. Nesse grupo foram avaliados os efeitos do aumento de peso na infância na maturação sexual.

Para determinarmos a importância da expressão do gene *Socs3* na maturação sexual os animais foram divididos em três subgrupos:

2) Nestin SOCS3 KO: Linhagem composta por camundongos geneticamente modificados com deleção do gene *Socs3* no encéfalo, desenvolvidos através do acasalamento da linhagem Nestin-Cre (B6.Cg-Tg(Nes-cre)1Kln/J, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, EUA) com camundongos que carregam os alelos *Socs3* flanqueados por sítios loxP (camundongos SOCS3-floxed, B6;129S4-Socs3tm1Ayos/J, Jackson Laboratories). Camundongos que carregavam a deleção encéfalo-específica do SOCS3 eram homozigotos para o alelo *Socs3* e hemizogotos para o transgene Nestin-Cre, enquanto seu grupo controle era composto por animais que continham apenas o alelo *Socs3* em homozigose;
3) LepR SOCS3 KO: composto por camundongos geneticamente modificados com deleção do gene *Socs3* apenas em células que expressavam o gene *LepR*. Essa linhagem foi obtida através do cruzamento de camundongos da linhagem LepR-IRES-Cre (B6.129-Leprtm2(cre)Rck/J, Jackson Laboratories) com camundongos SOCS3-floxed. Neste caso, animais que possuíam a deleção eram homozigotos para

o alelo *Socs3* e para o alelo LepR-Cre, e o seu respectivo grupo controle era composto por animais homozigotos do alelo LepR-Cre.

4) Kiss1 SOCS3 KO: composto por camundongos geneticamente modificados com deleção do gene *Socs3* apenas em células que expressavam o gene *Kiss1*. Essa linhagem foi obtida através do cruzamento de camundongos da linhagem Kiss1-Cre (Cravo et al. 2011) com camundongos SOCS3-floxed. Neste grupo, os animais que possuíam a deleção eram homozigotos para o alelo *Socs3* e heterozigoto para o alelo Kiss1-Cre, sendo o seu respectivo grupo controle composto por animais que continham apenas o alelo *Socs3* em homozigose.

Os modelos animais geneticamente modificados foram gerados pelo acasalamento de animais que possuem a tecnologia Cre/LoxP. Nesse caso, um dos animais do acasalamento expressava um gene associado à expressão da enzima *Cre-recombinase*, uma enzima que reconhece sequências de nucleotídeos específicos chamados de sítios LoxP. O outro animal do acasalamento expressa outro gene flanqueado por sítios *LoxP*, que são pares de sequencias de nucleotídeos que conferem direcionamento quando reconhecidos pela enzima *Cre-recombinase*. A re-combinação promovida pela *Cre-recombinase* com sítios *LoxP* resultou na deleção de um segmento de DNA ou na inversão de um segmento de DNA para que ele pudesse ser expresso (Kos, 2004). Em todos os grupos experimentais, as fêmeas com deleção e controle eram selecionadas dentro das mesmas ninhadas. Os filhotes foram separados das mães com três semanas de idade, e foram selecionados apenas os animais com a genotipagem adequada.

Os animais foram genotipados via PCR. Em média, um pedaço de 2 mm de cauda foi coletado para cada animal no dia de sua identificação. Esse tecido então passou pelo processo de extração de DNA, seguindo as instruções do fabricante (REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, *Sigma*, St. Louis, Missouri, EUA). Em seguida, um mix de soluções para PCR foi preparado para cada primer específico dos genes de interesse (definidos na tabela 1). O volume final por amostra foi de 10 μl, sendo 9 μl do mix do primer e 1 μl da amostra de DNA. As amostras então foram colocadas no termociclador, cada primer seguindo o protocolo próprio para sua PCR. Ao final, essas amostras foram pipetadas em um gel de agarose à 3%, para avaliação em eletroforese, dos pares de bases (pb) de cada amostra. Para cada primer avaliado, obteve-se uma resposta diferente em quantidades de pb.

Tabela 1. Sequências genômicas dos primers utilizados para genotipagem dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Gene	Sequências dos primers
SOCS3-flox	5'-CGGGCAGGGGAAGAGACTGT-3'
	5'-GGAGCCAGCGTGGATCTGC-3'
Nestin-Cre	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'
	5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'
	5'-TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT-3'
	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCAC-3'
LepR-Cre	5'-ACCTGTTCCACGCACAGTCACA-3'
	5'-AGCTGGCCAAATCTCAGAGCTGC-3'
	5'-TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT-3'
	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCAC-3'
Kiss1-Cre	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'
	5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'
	5'-TGCGAACCTCATCACTCGTTGCAT-3'
	5'-GCTCTGGTGAAGTACGAACTCTGA-3'

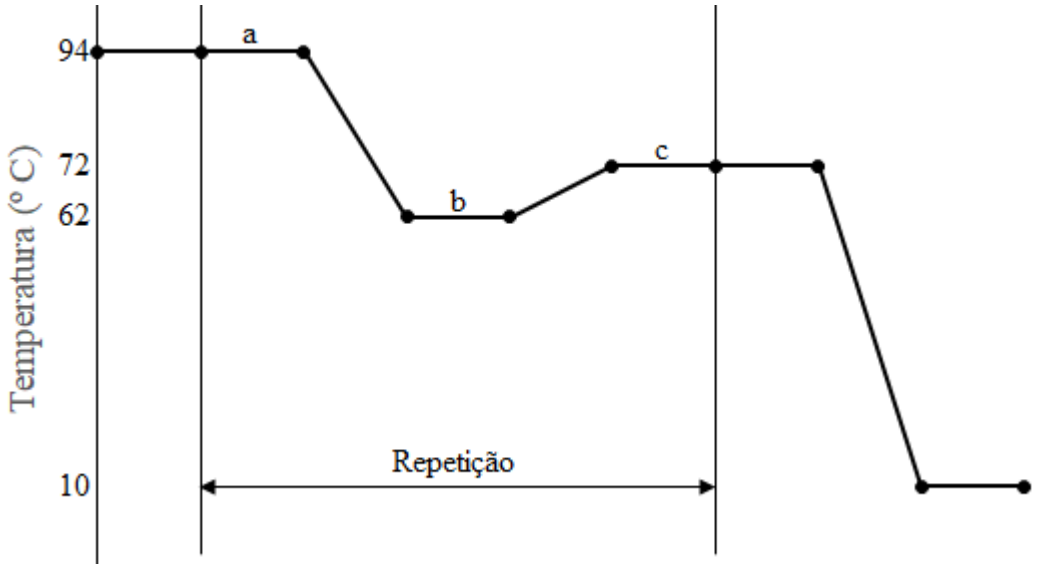

Figura 5. Representação gráfica das temperaturas durante termociclador. O gráfico representa as etapas e temperaturas utilizadas no termociclador para extrair o DNA utilizado para a genotipagem dos animais. a) fase de denaturação do DNA, em que a dupla-hélice do DNA se afrouxa. b) fase de anelamento, em que o primer agregado ao mix se anelará à parte específica de interesse do DNA. c) fase de extensão, em que novas cópias da região de interesse determinada pelo primer serão produzidas.

4.2 Validação do modelo animal

Os modelos Nestin SOCS3 KO e LepR SOCS3 KO foram utilizados e validados anteriormente em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Pedroso et al., 2014; Ramos-Lobo et al., 2017; Zampieri et al., 2015). Para a validação do modelo do Kiss SOCS3 KO, foi realizada a extração de DNA obtido do hipotálamo e gônadas de camundongos machos Kiss SOCS3 KO e controle, bem como, PCR e análise em gel de eletroforese.

4.2.1 Extração de DNA

Pequenos pedaços dos tecidos foram coletados e armazenados em tubo do tipo eppendorf no gelo seco. Após a coleta de todos os tecidos, foi adicionado 0,5 ml de proteinase K. Com as amostras submersas, os tecidos foram incubados overnight em banho seco à temperatura de 55º C, sendo as mostradas agitadas eventualmente. No dia seguinte, as amostras foram tiradas do banho seco, e foi adicionado 2 µl de RNAse A aos tubos. Com essa nova solução adicionada, as amostras foram incubadas durante 1 hora em banho seco à 37º C, sendo agitadas ao longo do tempo. Terminando essa etapa, foi adicionado 0,5 ml de clorofórmio aos tubos. Os tubos então foram agitados durante 5 minutos e centrifugados por 10 minutos, à 14.000 rpm, em temperatura ambiente. A solução dentro dos tubos se dividiu em fases, sendo a parte superior (a aquosa) coletada e colocada num novo tubo, onde foi adicionado 0,5 ml de clorofórmio. Foi repetida então a etapa de agitar durante 5 minutos e a centrifugação por 10 minutos, nas mesmas condições. Ao final dessa repetição, novamente a solução encontrava-se dividida em fases, e novamente foi coletada e acondicionada em novo tubo a porção superior aquosa. Desta vez, foi adicionado 1 ml de etanol, e os tubos foram invertidos gentilmente para homogeneizar o conteúdo. Após essa etapa, o DNA precipitou, e para poder descartar o excesso de etanol, os tubos foram centrifugados por 5 minutos. Na sequência, o etanol foi descartado e o tubo ficou aberto para que o DNA secasse parcialmente. Esse DNA obtido foi re-suspenso com 100 ml de uma solução tampão contendo Tris, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e água pH 8. Após ter sido re-suspenso, foi armazenado em geladeira (4º C, aproximadamente) por 2 horas, agitando ocasionalmente durante esse período. Terminado o procedimento, o DNA foi quantificado com o uso do equipamento *Epoch Microplate Spectophotometer* (*BioTek Instruments Inc*, Winooski, Vermont, EUA) para avaliação da qualidade da extração.

4.2.2 PCR e gel de eletroforese

Para realização do protocolo de PCR e preparo do gel de eletroforese, foram seguidos os mesmos passos descritos na seção 4.1.1 que trata sobre a genotipagem dos animais. Para a realização deste PCR, utilizamos primers que marcaram a recombinação da enzima *Cre-recombinase* com os sítios *LoxP*, representando a marcação de bandas com peso molecular menor devido à ausência do trecho do gene deletado, no caso dos animais com a deleção, e a marcação de bandas com peso molecular maior para os animais controle. As sequências dos primers foram: 5'-AGTCCGCTTGTCAAAGGTATTGTCCCAC-3' (Delta SOCS3-flox) e 5'-CGGGCAGGGGAAGAGACTGT-3'. O período em termociclador foi o mesmo utilizado para a genotipagem, assim como o procedimento de preparo do gel de eletroforese. A deleção do *Socs3* deve ser representada pela marcação no gel das bandas na altura de 250 pb, enquanto que, em animais controle, a marcação da banda é de aproximadamente 1000 pb.

4.3 Desenho experimental

4.3.1 Acompanhamento da maturação sexual

A maturação sexual de fêmeas foi acompanhada através da determinação da idade e peso desses animais em três fases específicas:

- Abertura vaginal;
- Primeira ocorrência de cornificação (1º estro);
- Primeira ocorrência de um ciclo estral de duração normal (4 a 7 dias em camundongos) (Bohlen et al., 2016; Nelson et al., 1990; Silveira et al., 2017);

O acompanhamento da maturação sexual e do ganho de peso semanal do grupo NR ocorreu desde o 7º dia de vida até, aproximadamente, o 70º dia de vida, com o acompanhamento de ganho de peso sendo realizado uma vez por semana. Já o acompanhamento da maturação sexual e do ganho de peso semanal dos animais dos grupos Nestin SOCS3 KO, LepR SOCS3 KO e Kiss1 SOCS3 KO ocorreu a partir do 25º dia de vida até, aproximadamente, o 70º dia de vida, com o acompanhamento de ganho de peso semanal sendo realizado três vezes por semana. Antes do início da puberdade, o óstio externo da vagina dos camundongos está colabado, assim é possível determinar a idade da abertura vaginal. Dois dias após esse evento, com uma pipeta de plástico e ponteira preenchida com salina 0,9%, foi realizado a lavagem da vagina desses animais, para obtenção do conteúdo epitelial para determinação do ciclo estral (Caligioni,

2009). O ciclo estral foi acompanhado diariamente para determinação da primeira cornificação, do início da ciclicidade estral e da regularidade da ciclicidade estral.

4.3.2 Coleta dos tecidos

Os animais foram anestesiados, e após confirmação da anestesia, foram decapitados. Todas as coletas foram realizadas entre 15h e 17h. Fêmeas adultas, quando selecionadas para experimento, se encontravam em diestro, entretanto, os tecidos também foram coletados em idades determinadas durante a maturação sexual. Após decapitação, o sangue foi imediatamente coletado em tubo "RNAse free". Depois da coleta do sangue, o encéfalo foi dissecado para coleta do hipotálamo e armazenados em tubo "RNAse free" mantidos em gelo seco, e posteriormente transferidos para freezer -80 ºC.

Os seguintes tecidos foram coletados:

- Hipotálamo total, seguindo os seguintes parâmetros: rostro-caudal, 1 mm antes do quiasma óptico e imediatamente posterior aos corpos mamilares; lateral, definido pelo trato óptico; e superior, pelo limite dorsal do terceiro ventrículo.
- Tecido adiposo: subcutâneo abdominal, periuterino, periovariano e retroperitoneal, para avaliação da composição corporal;
- Útero, para determinação de seu peso;
- Sangue, para dosagem de leptina no soro.

O sangue foi centrifugado (4˚C e 4000 rpm, por 10 minutos) para obtenção e posterior armazenamento do soro sanguíneo. O útero foi coletado em paraformaldeído 4% e pesado 15-20 dias após a coleta, após serem lavados com KPBS 0,02 molar.

4.3.3 Extração de RNA de hipotálamo total

As amostras de hipotálamo obtidas foram processadas através do protocolo de extração de RNA. As amostras foram retiradas do freezer -80 ºC, e em cada amostra foi adicionado 1 ml de TRIzol® reagent (*Life technologies*, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras então foram processadas com um politron para triturar o hipotálamo. Assim que as amostras foram homogeneizadas, elas ficaram em temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, foi acrescentado 200 µl de clorofórmio (*Synth*, Diadema, Brasil), que ajuda a separar o RNA, do DNA e da parte lipídica. Depois de 5 minutos em temperatura ambiente, as amostras

foram centrifugadas para separar as três fases. Separadas as fases, coletou-se apenas o sobrenadante (aproximadamente 400 µl), que corresponde ao RNA, que foi depositado em um novo tubo, juntamente com 500 µl de isopropanol (*Sigma*). Depois de acrescentar o isopropanol a amostra foi centrifugada, e o isopropanol descartado. O mesmo processo foi repetido duas vezes, porém com etanol 75%. Na sequência esperou-se o pellet secar e na sequencia o mesmo foi reidratado com 50 µl de H_2O Depc. O RNA obtido foi quantificado com o uso do equipamento *Epoch Microplate Spectophotometer* (*BioTek Instruments Inc*) e analisado com o software *Gen5 Data Analysis* (*BioTek Instruments Inc*).

4.3.4 Preparação de cDNA

O RNA extraído passou por um pré-tratamento em que, em cada amostra, foi acrescentado 3,36 µl de $MgCl_2$ [cloreto de magnésio, *Roche* (*Roche Applied Science,* Penzberg, Alemanha)], 0,32 µl de DNAse e um volume específico de H_2O Depc, para que o volume final fosse de 20 µl. As amostras foram incubadas em termociclador, 30 minutos à 37 ºC, 10 minutos à 75 ºC e alguns minutos à 4 ºC. Esse procedimento foi realizado para "eliminar" qualquer resquício de DNA que poderia estar na amostra. Em seguida, um mix de soluções (em que para cada amostra houvesse: 20 µl de 5x Buffer [*Invitrogen* (*Life technologies*)], 10 µl de DTT (*Invitrogen*), 20 µl de dNTP (10mM) (*Takara Bio Inc*., Otsu, Shiga, Japão), 10 µl de Random primer (pdN6) (*Roche*), 20 µl de H_2O Depc e 1 µl de SuperScript II Reverse Transcriptase (*Invitrogen*) foi preparado, e do qual em cada amostra foi pipetado 80 µl do mesmo, gerando um volume final de 100 µl para cada amostra. Novamente as amostras foram incubadas no termociclador, desta vez por 10 minutos à 25 ºC, 50 minutos à 42 ºC, 10 minutos à 72 ºC e alguns minutos à 4 ºC. Ao final, as amostras de cDNA geradas foram armazenadas em freezer -20 ºC.

4.3.5 RT-PCR

Para a preparação das reações, as amostras foram preparadas em duplicatas e o protocolo variou de acordo com a enzima que deveria ser usada. Para as reações que utilizaram a enzima SYBR® Green (*Applied biosystems*, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) o protocolo usado por amostra foi: 3,25 µl de H_2O Depc; 1,5 µl de primer do gene de interesse; 6,25 µl de enzima SYBR® Green, sendo que era acrescentado 1,5 µl de amostra de cDNA, produzindo um volume final de 12,5 µl. Para as reações que utilizaram a enzima TaqMan®, o

protocolo utilizado por amostra foi: 4,4 µl de H_2O Depc; 0,35 µl de primer do gene; 6,25 µl de enzima TaqMan® (*Applied biosystems*), acrescentando 1,5 µl de amostra de cDNA, com volume final de 12,5 µl. Na tabela 2 estão descritas as sequências de primers utilizadas, bem como, a referência ao protocolo. As placas foram analisadas na máquina 7500 Real Time PCR System (*Applied biosystems*) e a quantidade relativa de RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Biosystems, 1997; Livak and Schmittgen, 2001; Rao et al., 2013; Schmittgen et al., 2000; Winer et al., 1999).

Dependendo da enzima utilizada (SYBR® Green ou TaqMan®) o ciclo de temperaturas ao qual as amostras foram submetidas variou. Para os genes que utilizaram a enzima SYBR® Green, o protocolo de leitura da máquina se inicia em dois estágios de aquecimento, no primeiro a temperatura se eleva de 25 ºC para 50 ºC durante dois minutos, e no seguinte estágio a temperatura foi elevada à 95 ºC por dez minutos. Em seguida inicia-se a fase de ciclos, que se repete por quarenta vezes. Durante a repetição dos ciclos, a temperatura que já estava em 95 ºC se manteve por 15 segundos, que caracteriza a fase de denaturação, quando ocorre separação da dupla cadeia de DNA, e então a temperatura é diminuída para 60 ºC, em que ocorre de forma combinada as fases de anelamento e extensão, ou seja, os primers se pareiam com a fita molde de DNA e uma nova fita é produzida, respectivamente. Após os ciclos terminarem foi realizada uma avaliação de dissociação utilizando a produção de uma curva de *melting*, uma sequência de aumento e diminuição da temperatura entre 95 ºC e 60 ºC (aumento da temperatura de 60 ºC para 95 ºC, em que permanece por 15 segundos, seguida pelo retorno da temperatura em 60 ºC por um minuto, novamente um aumento da temperatura para 95 ºC por trinta segundos e finalizando em 60 ºC por quinze segundos; Figura 1). Já o protocolo de leitura dos genes que utilizaram a enzima TaqMan® consiste no mesmo protocolo da enzima SYBR® Green, porém sem a parte da curva de *melting* (Figura 7).

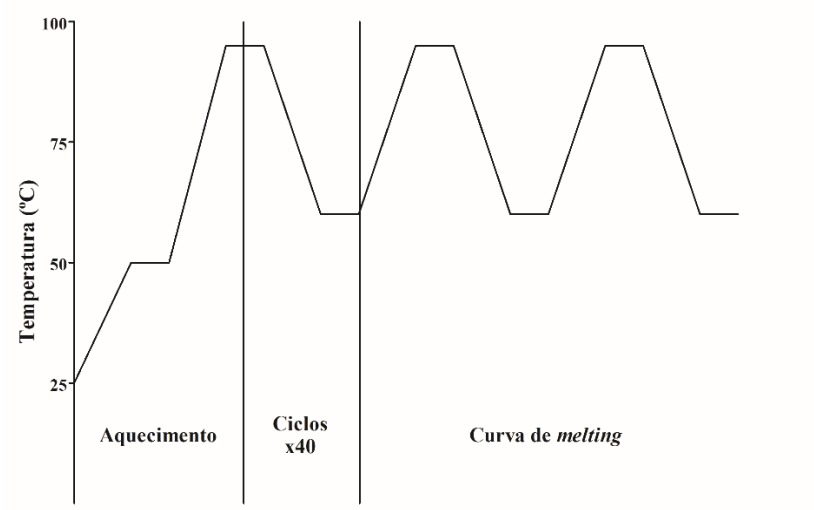

Figura 6. Ciclo de temperaturas utilizadas para a realização da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). Gráfico demonstrativo da sequência de temperaturas para leitura das placas de RT-PCR. Placas que utilizam a enzima SYBR® Green passam pelo ciclo completo. As placas que utilizam a enzima TaqMan® não passam pela parte do gráfico descrita como curva de *melting*.

4.4 Caracterização gênica de núcleos hipotalâmicos durante a maturação sexual

Fêmeas de linhagem C57Bl/6 foram acompanhadas diariamente a partir do 21º ao 70º dia de vida, para acompanhamento da maturação sexual conforme descrito no item 4.2.1. As fêmeas selecionadas para os experimentos estavam em 3 idades diferentes do desenvolvimento sexual, nas fases: pré-púbere (entre 12 e 16 dias de vida), púbere (entre 38 e 42 dias de vida) e adulta (com 10 semanas de vida, sendo selecionadas para experimento na fase de diestro). No momento da eutanásia os encéfalos foram dissecados e submetidos à técnica de microtomia em vibrátomo, seguindo as coordenadas definidas no atlas "The mouse brain sterotaxic coordinates" (Paxinos and Franklin, 2007). As seguintes áreas hipotalâmicas foram coletadas: área hipotalâmica pré-mamilar ventral (250 μm de espessura, bregma de referência entre: -2,46 a -2,54 mm); área hipotalâmica médio basal, (500 μm de espessura, bregma de referência entre -1,70 mm a -2,30) e, área pré-óptica medial (250 μm de espessura, bregma de referência entre 0,62 a 0,38 mm).

Após a obtenção dos cortes, as áreas específicas foram removidas bilateralmente com uma agulha estéril de 18G x 1". Ao final da microdissecção dos núcleos de interesse, esses foram colocados em tubos do tipo eppendorf e armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA e preparo do cDNA. O RNA total das amostras coletadas foi extraído com o kit de isolamento PicoPure RNA, seguindo as instruções do fabricante (Thermofisher Scientific) e o cDNA foi preparado conforme descrito no item 4.3.4, entretanto, estas amostras não foram

submetidas a pré-tratamento com DNAse. As reações de RT-PCR seguiram a descrição do item 4.3.5, sendo que os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

Os Cts dos genes constitutivos *β-actina* (componente do citoesqueleto), *Ppia* (componente do citoesqueleto) e *Gapdh* (componente citoplasmático), foram usados para normalizar, por meio da análise $2^{-\Delta\Delta Ct}$, os Cts dos demais genes avaliados. Para as áreas pré-óptica medial e hipotalâmica médio basal, foi utilizada a média geométrica dos três genes constitutivos, enquanto que para a área pré-mamilar ventral foi usada para normalização a média geométrica dos genes constitutivos *Gapdh* e *Ppia*. Em todas as áreas analisadas, o grupo Adulto foi usado como grupo controle para comparação dos valores obtidos.

Tabela 2. Lista de genes analisados via RT-PCR. Lista dos genes, suas sequências e o tamanho do *amplicon* que foram usados na análise dos hipotálamos totais coletados.

Gene	Direção da sequência	Sequência do primer	Comprimento do *amplicon* (pb)
Ppia (constitutivo)	Sq	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGT	128
	ASq	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	
Actb (constitutivo)	Sq	CCTCTGAACCCTAAGGCCAA	90
	ASq	AGCCTGGATGGCTACGTACA	
Gapdh (constitutivo)	Sq	GGCAGCCCAGAACATCAT	110
	ASq	CCGTTCAGCTCTGGGATGAC	
Pomc	Sq	GAGGCCACTGAACATCTTTGTC	253
	ASq	GCAGAGGCAAAACAAGATTGG	
Agrp	Sq	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	75
	ASq	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC	
Npy	Sq	CAGATACTACTCCGCTCTGCG	72
	ASq	GGGCTGGATCTCTTGCCATA	
Cart	Sq	CCGAGCCCTGGACATCTACT	64
	ASq	CCGCCTTGGCAGCTCCTT	
Gnrh1	Sq	GGCTTCTGCCATTTGATCCAC	197
	ASq	CCCTTTGACTTTCACATCC	
Kiss1	Sq	GGCAAAAGTGAAGCCTGGAT	75
	ASq	GATTCCTTTTCCCAGGCATT	
Esr1	Sq	GCAGATTGGGAGCAGCTGGTTCA	129
	ASq	TGGAGATTCAAGTCCCCAAA	

Tabela 2. Continuação

Gene	Direção da sequência	Sequência do primer	Comprimento do *amplicon* (pb)
Esr2	Sq	GCCAACCTCCTGATGCTTCTTT	146
	ASq	TTGTACCCTCGAAGCGTGTGA	
Ar	Sq	GAGTACCCTATCCCAGTCCCA	106
	ASq	TGGTCCCTGGTACTGTCCAA	
Pgr	Sq	GTGCTTACCTGTGGGAGCTG	88
	ASq	TGCAGTCATTTCTTCCAGCACA	
Tac2	Sq	CCGCTCCATCTCTCTGGAAG	93
	ASq	TGCATGTCACGTTTCTGTGG	
Gal	Sq	TGTCGCTAAATGATCTGTGGTTGTC	121
	ASq	TGCAACCCTGTCAGCCACTC	
Ob-rb	Sq	ACTTAATTTCCAAAAGCCTGAAACA	83
	ASq	CCAGAAGAAGAGGACCAAATATCAC	
Nos1	Sq	CGGACCTTGTAGCTCTTCCTC	179
	ASq	TTCGGCTGTGTCTTTGATGGA	
Mkrn3	Sq	AGCTGGACGAAGCAAATCCT	63
	ASq	GTTATCGCCCTCCTTGCACT	
Dlk1	Sq	AGGAACCATGGCAGTGCATC	103
	ASq	CAAGTTCCATTGTTGGCGCA	
Dio2	Sq	TGCTGACCTCAGAAGGGCT	86
	ASq	GGGAGCATCTTCACCCAGTTT	
Dio3	Sq	TTGTCCGACCTGATGGCTTC	77
	ASq	AAAATTGAGCACCAACGGGC	

4.5 Teste de Tolerância à Glicose e à Insulina

Nos animais Kiss1 SOCS3 KO e controle, foi realizado o teste de tolerância à glicose (Glucose Tolerance Test – GTT). Para a realização do GTT fêmeas adultas (10 – 12 semanas de vida) foram individualizadas 3 dias antes do teste para se adaptarem ao isolamento e terem seu peso e consumo alimentar monitorado. No dia do teste, os animais foram colocados em restrição alimentar 4 horas antes (por volta das 10h da manhã). Amostras de sangue caudal desses animais foi coletado antes da injeção (tempo 0, basal) e, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos depois da injeção intraperitoneal de glicose (2g de glicose/Kg). A glicemia foi avaliada por

glicosímetro portátil (One Touch Ultra® - Johnson & Johnson), para obtenção das concentrações de glicose para o cálculo da área sob a curva de glicose sérica.

Essas mesmas fêmeas foram submetidas ao teste de tolerância à insulina (Insulin Tolerance Test – ITT). Esse teste foi realizado a partir do terceiro dia após o GTT, período em que a ração e o peso corporal continuou sendo monitorado. No dia do teste, o preparo dos animais é o mesmo para o GTT, as fêmeas foram colocadas em restrição alimentar 4 horas antes do teste. Amostras de sangue caudal foi coletado no tempo 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a injeção intraperitoneal de insulina (0,75 UI/g). A glicemia foi avaliada por glicosímetro portátil como mencionado, para obtenção das concentrações de glicose para o cálculo da área sob a curva relativa ao momento inicial (tempo 0).

4.6 Dosagem hormonal

O soro sanguíneo obtido na coleta do sangue no momento do sacrifício dos animais foi utilizado para determinação das concentrações de leptina e estradiol circulante por teste ELISA de acordo com especificações do fabricante (estradiol: Mouse/Rat Estradiol ELISA – Calbiotech El Cajon, California, EUA; leptina: Mouse Leptin ELISA kit, #90030 – Crystal Chem, Illinois, EUA).

4.7 Teste de sensibilidade à leptina

Para avaliar a sensibilidade à leptina nos modelos propostos, fêmeas adultas (12 - 14 semanas de vida) dos grupos NR, LepR SOCS3 KO, Nestin SOCS3 KO e Kiss1 SOCS3 KO, bem como, respectivos controles, foram isoladas, alimentadas *ad libitum* e no primeiro dia de teste, receberam uma injeção intraperitoneal de tampão fosfato salina (PBS) às 18 h (2 horas antes do ciclo escuro começar). O consumo alimentar e o peso corporal foram mensurados após 4, 12 e 24 horas após a aplicação do PBS. O consumo alimentar foi avaliado medindo o peso da ração que estava na gaiola do animal e o peso do animal no momento da injeção e nos horários definidos. Assim foi possível comparar a média de alimento ingerido entre os grupos experimentais e seus controles, e também quanto o animal reteve de alimento no organismo ao avaliar o ganho/perda de peso durante esse período. No segundo dia após a primeira injeção, as fêmeas receberam outra injeção intraperitoneal, desta vez de leptina (2,5 μg/g – Dr. A. F. Parlow – National Homrmone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney), e tiveram o peso e consumo alimentar mensurados nos mesmos períodos já estabelecidos. Com os dados obtidos foi determinada a porcentagem da redução no consumo

alimentar com a comparação da ingestão alimentar após a injeção de leptina em relação ao dia de injeção de veículo.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizada utilizando o software GraphPad Prism. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram comparadas usando o teste *t* de Student não pareado bicaudal, para comparações entre dois grupos, e teste ANOVA ONE-WAY, com pós-teste de Tukey, para comparação de todos os pares nas colunas, nas comparações entre três grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Fêmeas criadas em ninhada reduzida apresentaram sobrepeso e antecipação da maturação sexual

Ao acompanharmos o ganho de peso dos animais do grupo experimental NR, observamos que estes não apresentavam diferença no peso corporal aos 7 dias de vida em relação ao grupo controle (2 dias após a reorganização da ninhada; Figura 7 A). Entretanto, os animais do grupo NR apresentaram maior peso corporal em relação ao grupo controle a partir dos 14 dias de vida (Figura 7 A). Além disso, esses mesmos animais apresentaram maior peso corporal com relação ao grupo controle nas três fases averiguadas que caracterizam a maturação sexual: abertura vaginal, 1º estro e início da ciclicidade estral (Figura 7 B).

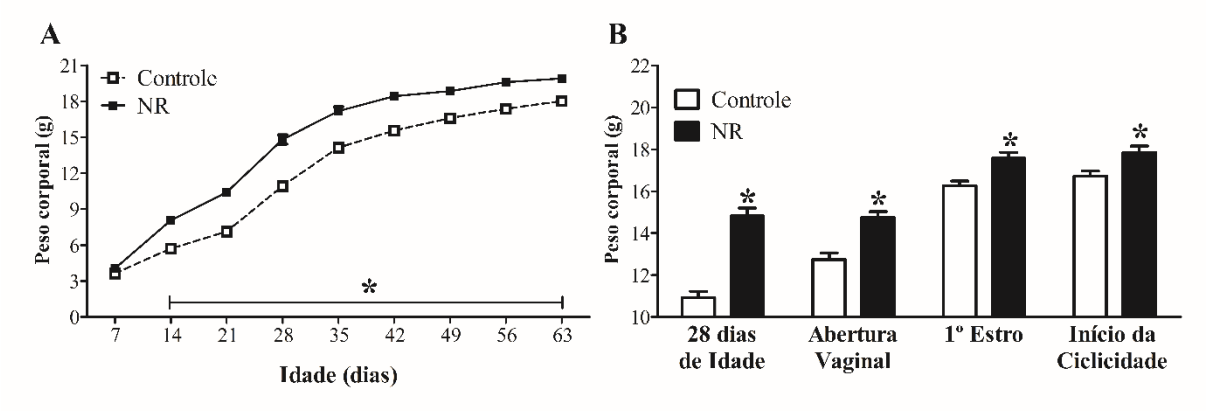

Figura 7. Fêmeas criadas em ninhadas reduzidas se tornaram obesas. A. Peso corporal de fêmeas nos grupos controle (n=17) e NR (n=13). **B.** Peso corporal dos animais em diferentes fases da maturação sexual. Média ± erro padrão. *P<0,05.

Ao avaliarmos a maturação sexual dos animais do grupo NR observamos que os mesmos apresentaram antecipação na idade de abertura vaginal (Figura 8 A-B), 1º estro (Figura 8 C-D) e início da ciclicidade estral (Figura 8 E-F). Por exemplo, enquanto mais de 50% das fêmeas no grupo NR apresentaram abertura vaginal aos 28 dias de vida, nenhuma fêmea controle apresentou este fenômeno aos 28 dias de vida (Figura 8 A). Além disto, enquanto cerca de 80% das fêmeas do grupo NR já havia apresentado 1º estro aos 38 dias de vida, apenas 10% das fêmeas do grupo controle haviam atingido o mesmo estágio de maturação sexual (Figura 8 C). Com relação à idade em que detectamos o início da ciclicidade estral 60% dos animais do grupo NR já haviam apresentado pelo menos um ciclo estral regular antes dos 40 dias de vida, enquanto que, na mesma faixa de idade menos do que 20% dos animais do grupo controle haviam apresentado pelo menos um ciclo estral regular.

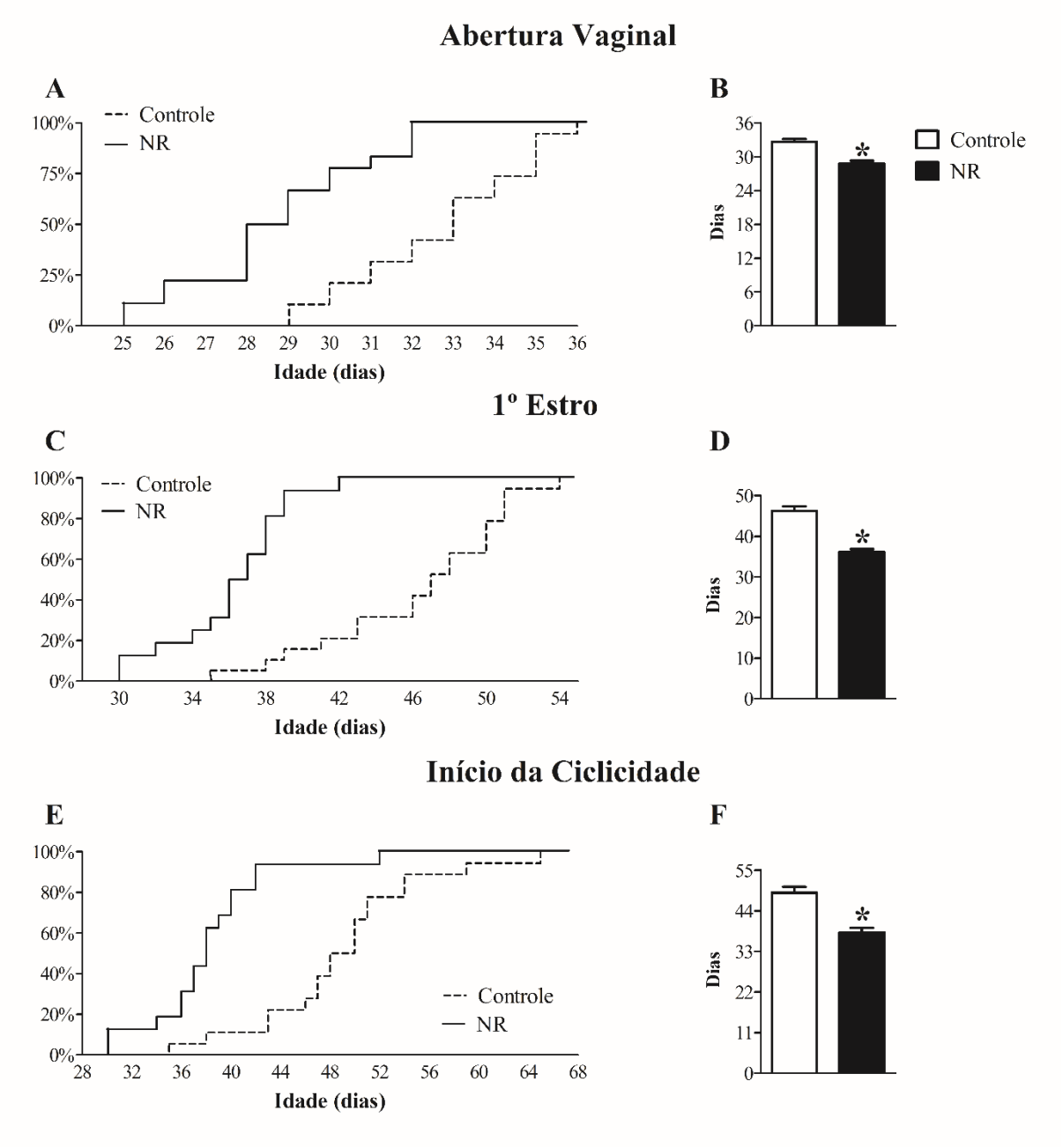

Figura 8. Animais do grupo NR apresentam adiantamento da maturação sexual. A, C, E. Gráficos mostrando a porcentagem de fêmeas dos grupos controle (n=19) e NR (n=16) que exibiram abertura vaginal (C), 1º estro (E) e início de regularidade no ciclo estral (G). **B, D, F.** Tempo médio para os grupos controle e NR para apresentarem abertura vaginal (D), 1º estro (F) e início da ciclicidade (H). Média ± erro padrão. *P<0,05.

Devido a diferença de peso corporal observada entre os grupos experimentais, o próximo passo foi avaliar os níveis circulantes de leptina. Um subgrupo de animais de ambos os grupos foi sacrificado no dia da abertura vaginal. Observamos que os animais do grupo NR apresentaram um aumento não significativo dos níveis circulantes de leptina (P=0,0791; Figura 9 A). Além disto, ao avaliarmos o peso uterino de ambos os grupos, observamos que em média

o peso uterino das fêmeas do grupo NR, era maior em relação ao das fêmeas do grupo controle (Figura 9 B).

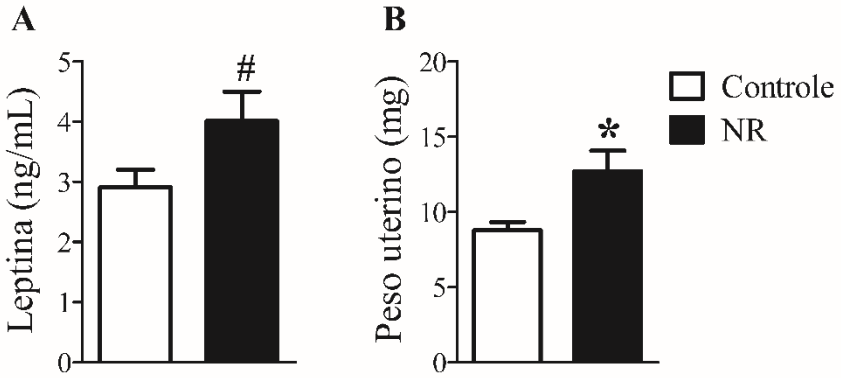

Figura 9. Variações decorrentes do aumento de peso na infância. A. Concentração de leptina no soro de fêmeas no dia da abertura vaginal nos grupos controle e NR (n=7/grupo). **B.** Peso uterino das fêmeas dos grupos controle (n=8) e NR (n=6) no dia da abertura vaginal. Média ± erro padrão. *P<0,05; #P=0,0791.

Para avaliarmos se em uma idade específica o adiantamento da maturação sexual observado no grupo NR era seguido por outras alterações, como variações da expressão de gene hipotalâmicos, coletamos tecidos de animais com 32 dias de vida (idade média em que os animais do controle apresentaram AV). Assim, nós constatamos que aos 32 dias de vida os animais do grupo NR apresentaram maior acúmulo de tecido adiposo nas regiões retroperitoneal, peri-uterina e subcutânea (Figura 10 A). O aumento significativo dos depósitos de tecido adiposo foi acompanhado por aumento significativo da leptina circulante (Figura 10 B). Além disto, observamos que o peso uterino das fêmeas do grupo NR foi maior em relação ao grupo controle aos 32 dias de vida (Figura 10 C). Entretanto, não foi constatada nenhuma variação significativa na concentração plasmática do estradiol circulante entre os grupos (Figura 10 D).

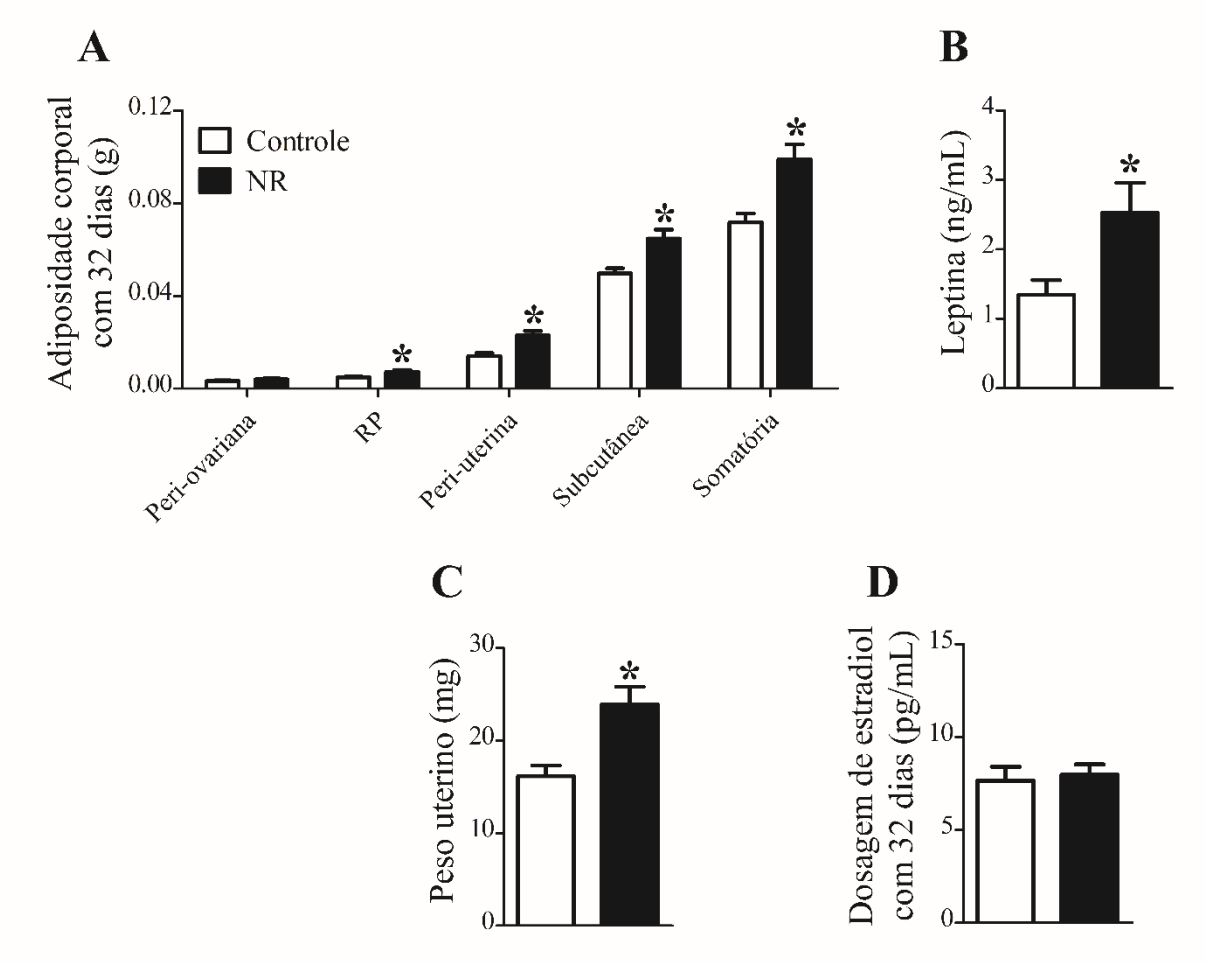

Figura 10. Avaliação corporal dos grupos NR e controle, com 32 dias de vida. A. Gráfico de barras mostrando os resultados da comparação da adiposidade corporal entre os animais do grupo NR e controle (n=12/grupo) em 4 regiões diferentes: peri-ovariana, retroperitoneal (RP), peri-uterina, subcutânea, e da somatória das quatro regiões. **B.** Concentração plasmática de leptina no soro das fêmeas dos grupos NR e controle com 32 dias de vida (n=12/ grupo). **C.** Peso uterino das fêmeas dos grupos NR e controle com 32 dias de vida (n=12/ grupo). **D.** Concentração plasmática de estradiol no soro das fêmeas dos grupos NR e controle com 32 dias de vida (n=12/ grupo). Média ± erro padrão. *P<0,05.

Ao avaliarmos o consumo alimentar de fêmeas adultas (10-12 semanas de vida) dos grupos NR e controle através do teste de sensibilidade à leptina (Figura 11), verificamos que as fêmeas do grupo NR apresentaram aumento no consumo alimentar após as primeiras quatro horas da injeção de leptina. Porém, 24 horas após a injeção de leptina, o consumo alimentar dos animais de ambos os grupos, sofreu uma redução significativa em relação ao período basal. Dessa forma, apesar de os animais do grupo NR ganharem maior peso, estes não apresentaram resistência à leptina, pelo menos na idade escolhida para a realização do teste.

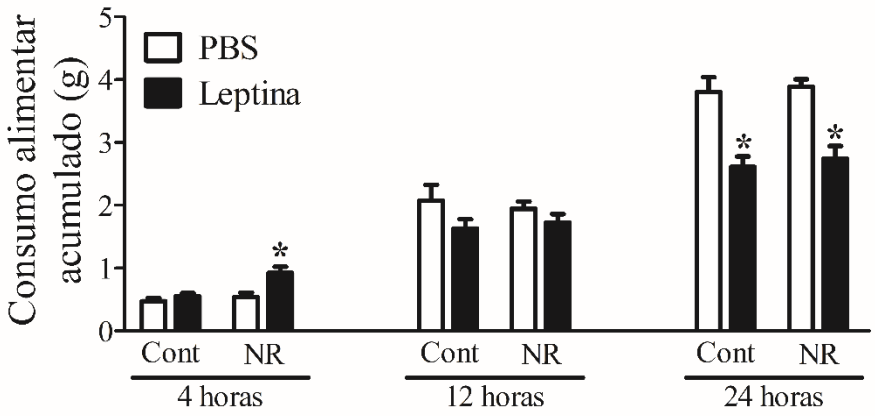

Figura 11. Fêmeas adultas do grupo NR não apresentam resistência à leptina. Teste de sensibilidade à leptina para determinar a capacidade de uma injeção intraperitoneal aguda de leptina (2,5 μg/g) para reduzir a ingestão de alimentos em comparação com o dia de injeção de veículo (n= 9-12/ grupo). Média ± erro padrão. *P<0,05.

5.2 Deficiência neuronal de *SOCS3* induz a menor ganho de peso corporal e inibe a maturação sexual

Como o SOCS3 é uma proteína que pertence à uma família de supressores de sinalização de citocinas e participa da cascata de resposta após a ativação de um receptor de citocina, como por exemplo, o receptor de leptina, sua inativação pressupõe uma maior sensibilidade à esse hormônio (Howard and Flier, 2006). Para determinarmos se a expressão neuronal do gene *Socs3* é necessária para a maturação sexual de camundongos animais com deleção global do gene *Soc3* foram utilizados conforme descrito. Observamos que os animais do grupo experimental Nestin SOCS3 KO apresentaram menor ganho de peso corporal ao longo do desenvolvimento em relação ao seu respectivo grupo controle (Figura 12).

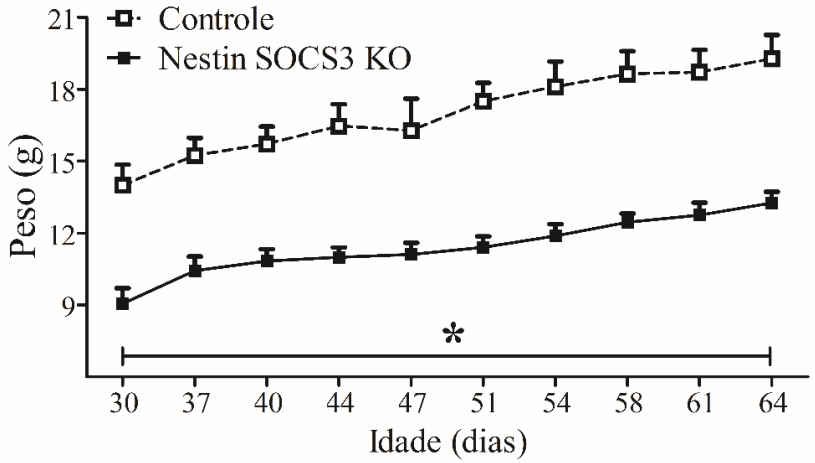

Figura 12. Deleção neuronal do gene SOCS3 induz menor ganho do peso corporal. Peso corporal das fêmeas dos grupos controle (n=7) e Nestin SOCS3 KO (n=5). Média ± erro padrão. *P<0,05.

No acompanhamento da maturação sexual as fêmeas Nestin SOCS3 KO exibiram um atraso significativo na idade em que apresentaram abertura vaginal em comparação ao grupo controle (Figura 13 A-B). Enquanto apenas 10% das fêmeas Nestin SOCS3 KO já haviam exibido abertura vaginal até os 35 dias de idade, a maioria das fêmeas controle (90%) já havia apresentado a mesma característica na mesma idade (Figura 13 A). Além disso, as fêmeas Nestin SOCS3 KO atrasaram, em média, em 10 dias a abertura vaginal em relação ao grupo controle (Figura 13 B). Surpreendentemente, apenas 16,66% das fêmeas Nestin SOCS3 KO avaliadas (1 fêmea dentre 6 analisadas) apresentou 1º estro antes dos 70 dias de vida, enquanto todos os animais controle já haviam atingido esse estágio de maturação sexual nessa idade (Figura 13 C).

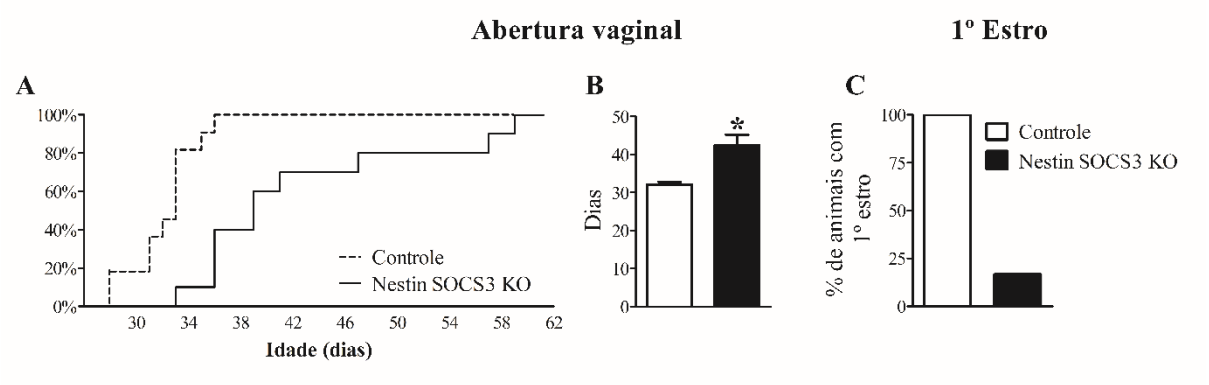

Figura 13. Deficiência neuronal de SOCS3 afeta o desenvolvimento sexual. A. Gráfico de percentual de fêmeas que apresentaram abertura vaginal ao longo dos dias nos grupos controle (n=11) e Nestin SOCS3 KO (n=10). **B.** Idade média em que as fêmeas dos grupos controle e Nestin SOCS3 KO levaram para apresentar abertura vaginal. **C.** Porcentagem de animais dos grupos controle (n=7) e Nestin SOCS3 KO (n=6) que apresentaram 1º estro. Média ± erro padrão. *P<0,05.

Na avaliação da sensibilidade à leptina, observamos que as fêmeas Nestin SOCS3 KO adultas apresentaram maior redução no consumo alimentar após a administração de leptina quando comparadas com o grupo controle, indicando um aumento na sensibilidade à mesma, conforme descrito na literatura (Mori et al., 2004; Pedroso et al., 2014) (Figura 14 A). Para determinarmos se as mudanças na maturação sexual podiam ser correlacionas a diferenças nos níveis circulantes de leptina, foram coletadas amostras de soro sanguíneo de um subgrupo de animais que foram sacrificados no dia da abertura vaginal. As fêmeas Nestin SOCS3 KO apresentaram redução significativa nos níveis circulantes de leptina (Figura 14 B) e, na mesma idade, menor peso uterino em relação as fêmeas controle (Figura 14 C).

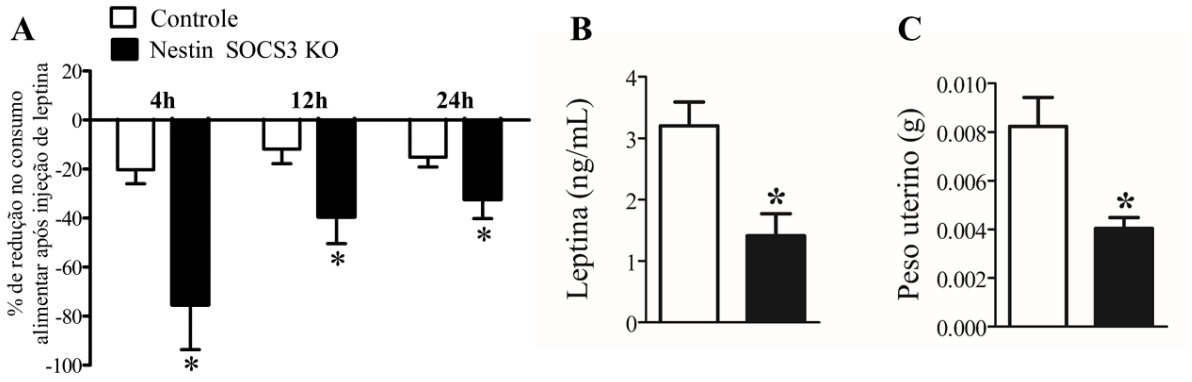

Figura 14. Inativação global de SOCS3 do sistema nervoso central induz aumento da sensibilidade à leptina. A. Teste de sensibilidade à leptina para determinar a capacidade de uma injeção intraperitoneal aguda de leptina (2,5 μg/g) em reduzir a ingestão de alimentos em comparação com o dia de injeção de veículo (n=4-10/ grupo). **B.** Concentração de leptina no soro dos grupos controle (n=4) e Nestin SOCS3 KO (n=5) no dia da abertura vaginal. **C.** Peso uterino de fêmeas dos grupos controle e Nestin SOCS3 KO (n=3/grupo) no dia da abertura vaginal. Média ± erro padrão. *P<0,05.

5.3 Deleção do gene *SOCS3* em células que possuem o receptor de leptina promove atraso na maturação sexual

Ao contemplarmos os resultados obtidos com o grupo Nestin SOCS3 KO, notamos que eles eram restritivos, uma vez que a maturação sexual se mostrou ausente. Devido à essas limitações, nós buscamos um modelo experimental mais específico, que nos permitisse avaliar o efeito da deleção do gene *Socs3* em uma população neuronal específica. Assim, geramos um modelo de camundongo em que o gene *Socs3* estava inativado exclusivamente nas células que expressam LepR. No acompanhamento dos animais observamos que as fêmeas LepR SOCS3 KO apresentaram menor ganho de peso corporal em relação às fêmeas controle durante o desenvolvimento (Figura 15 A). Entretanto, o peso corporal entre os grupos experimentais não variou nas datas de abertura vaginal e 1º estro (Figura 15 B).

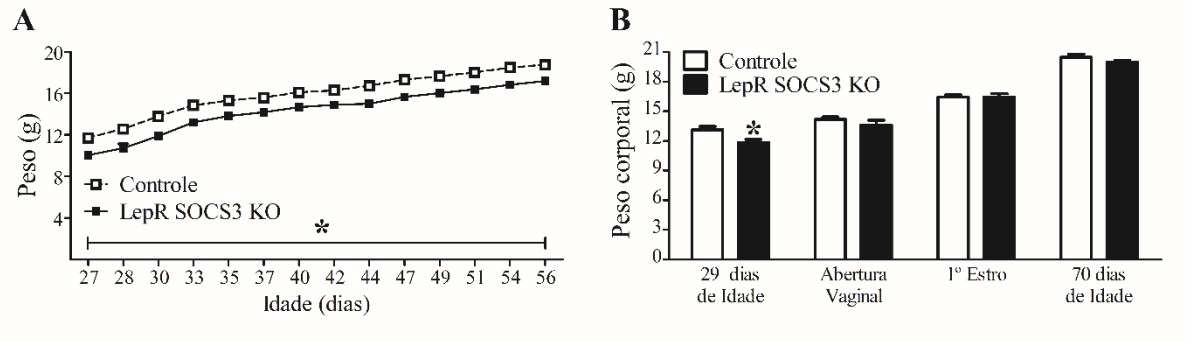

Figura 15. Deleção global do gene *SOCS3* de células com receptor LepR causa redução de peso corporal. A. Peso corporal das fêmeas dos grupos controle (n=15) e LepR SOCS3 KO (n=10). **B.** Peso corporal dos animais em diferentes fases do amadurecimento sexual. Média ± erro padrão. *P< 0,05.

Entretanto, as fêmeas LepR SOCS3 KO apresentaram atraso na idade de abertura vaginal (Figura 16 A-B) e idade de 1º estro (Figura 17 C-D). Enquanto, aproximadamente 80% dos animais controle apresentaram o 1º estro até 46 dias de vida, apenas 20% das fêmeas LepR SOCS3 KO haviam apresentando a mesma característica na mesma faixa de idade (Figura 16 C). Além disso, a idade média de início do ciclo estral em fêmeas LepR SOCS3 KO foi tardia em relação ao grupo controle (Figura 16 E-F). Apenas 1 entre 16 fêmeas LepR SOCS3 KO não apresentou regularidade no ciclo estral até os 70 dias de vida.

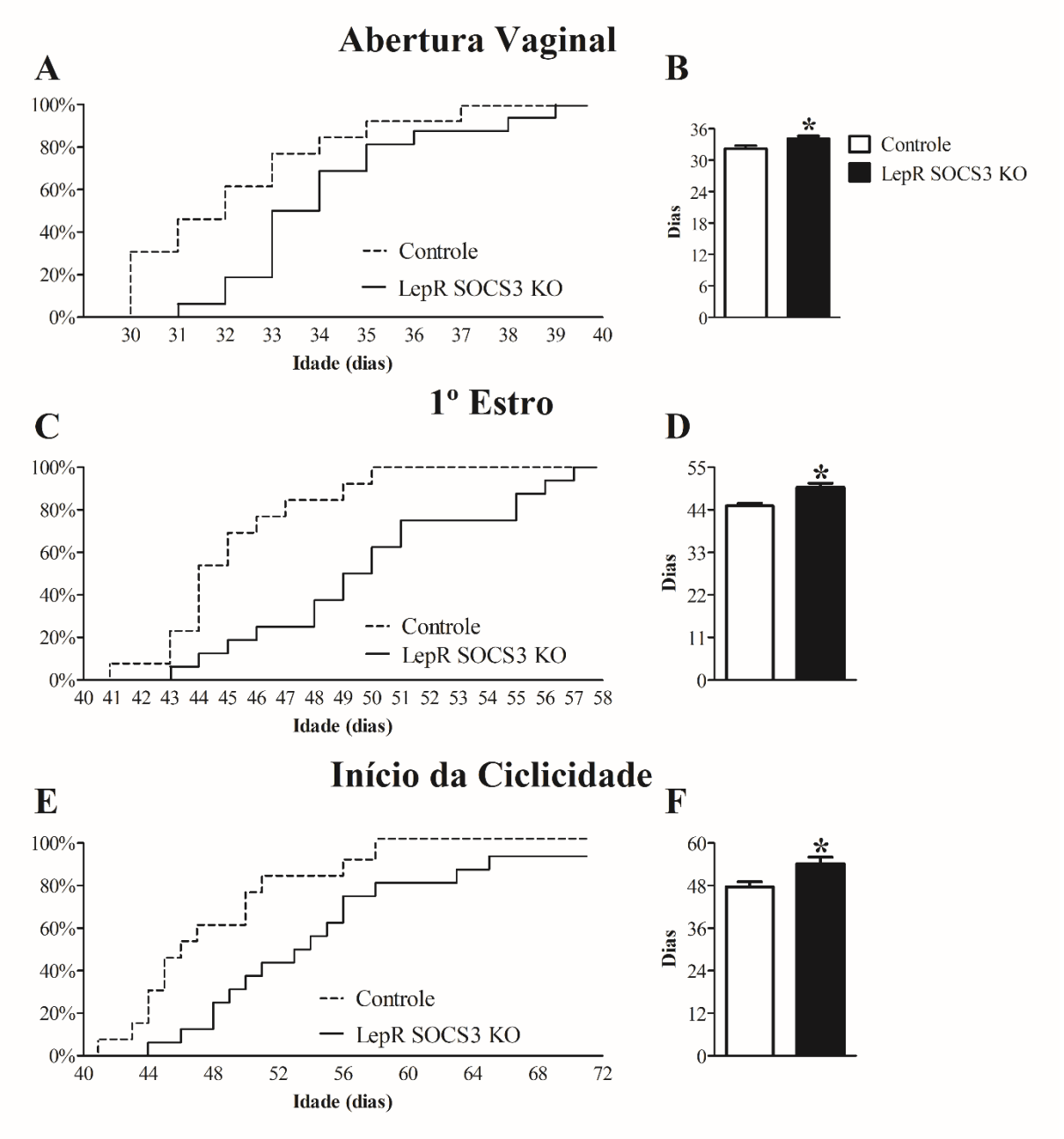

Figura 16. Deleção específica de SOCS3 causa atraso na maturação sexual. A, C, F. Gráficos mostrando a porcentagem de fêmeas dos grupos controle (n=13) e LepR SOCS3 KO (n=16) que apresentaram abertura vaginal (C), 1º estro (E) e ciclo estral normal (G). **B, D, F.** Tempo médio

necessário para que as fêmeas dos grupos controle e LepR SOCS3 KO apresentassem abertura vaginal (D), 1º estro (F) e início da ciclicidade estral (H). Média ± erro padrão. *P<0,05.

Na avaliação da sensibilidade à leptina, verificamos que as fêmeas LepR SOCS3 KO adultas apresentaram aumento na resposta ao efeito anorexigênico agudo da leptina, apenas 24h após a injeção com leptina comparadas com o grupo controle (Figura 17 A). Para determinarmos se as mudanças na maturação sexual podiam ser correlacionas a diferenças nos níveis circulantes de leptina, foram coletadas amostras de soro sanguíneo de um subgrupo de animais que foram sacrificados no dia da abertura vaginal. Fêmeas LepR SOCS3 KO apresentaram redução nos níveis de leptina no soro sanguíneo (Figura 17 B), e também redução no peso do útero, comparadas com as fêmeas controle (Figura 17 C).

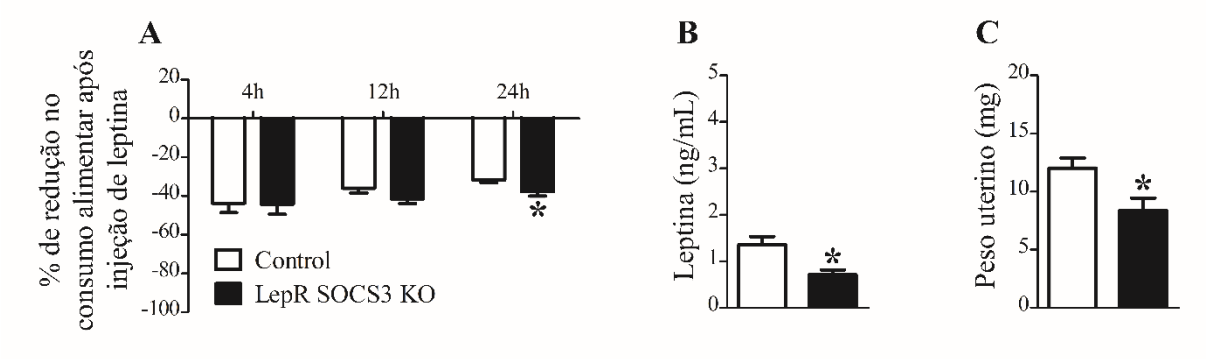

Figura 17. Inativação do SOCS3 em células que expressam LepR causa redução de peso corporal durante a puberdade, atrasa o desenvolvimento sexual e aumenta a sensibilidade à leptina. A. Teste de sensibilidade à leptina para determinar a capacidade de uma injeção intraperitoneal aguda de leptina (2,5 μg/g) para reduzir a ingestão de alimentos em comparação com o dia de injeção de veículo (n=10/ grupo). **B.** Concentração de leptina no soro das fêmeas dos grupos controle e LepR SOCS3 KO (n=8/grupo) no dia da abertura vaginal. **C.** Peso uterino das fêmeas dos grupos controle e LepR SOCS3 KO (n=7/grupo) no dia da abertura vaginal. Média ± erro padrão. *P<0,05.

Para avaliarmos se variações semelhantes nos níveis circulantes de leptina e no tamanho uterino ocorreriam em uma idade específica, animais LepR SOCS3 KO foram sacrificados com 32 dias de vida. Dentre os parâmetros analisados, foi constatado que fêmeas LepR SOCS3 KO possuíam menor acúmulo de gordura corporal em relação ao grupo controle (Figura 18 A), fato que foi acompanhado por menor concentração plasmática de leptina (Figura 18 B). Além disto, verificamos que o peso uterino era semelhante entre os animais LepR SOCS3 KO e respectivo controle (Figura 18 C), embora as concentrações plasmáticas de estradiol estivessem aumentadas no grupo LepR SOCS3 KO (Figura 18 D).

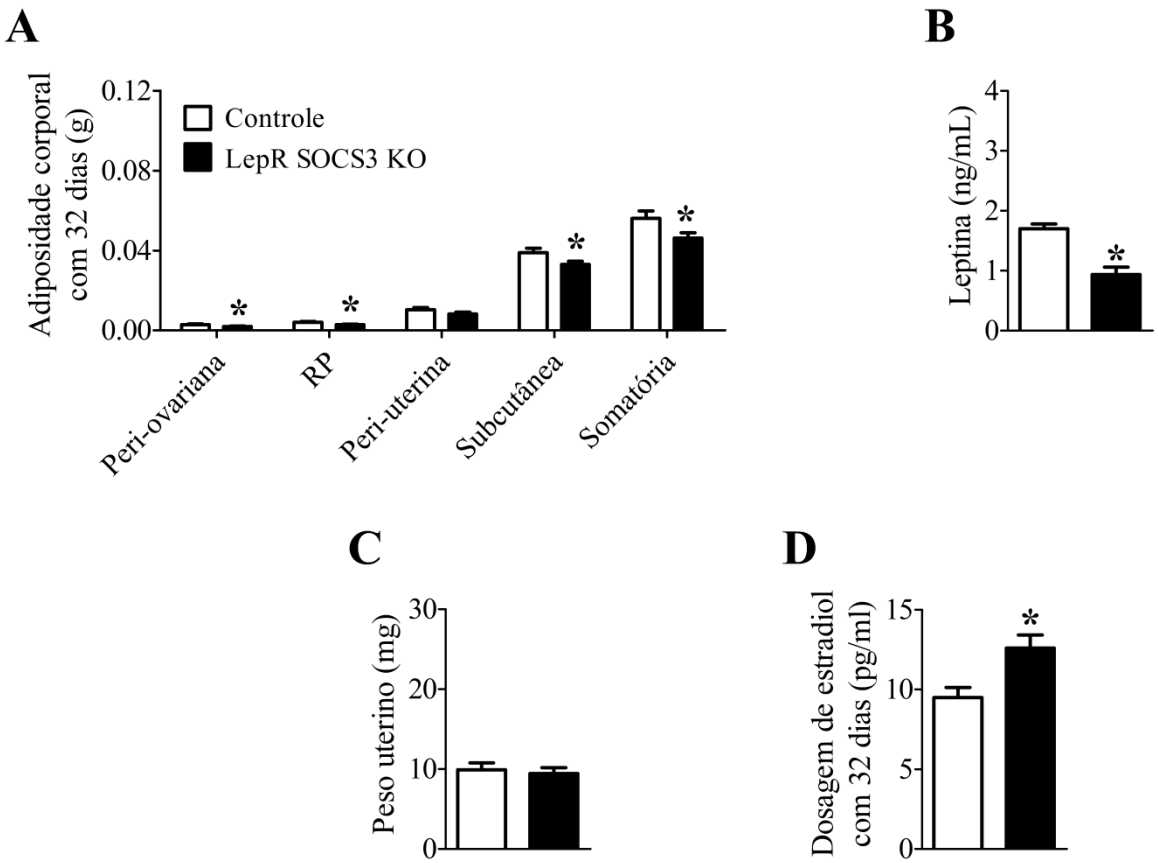

Figura 18. Avaliação corporal dos grupos LepR SOCS3 KO e controle, com 32 dias de vida. A. Gráfico de barras mostrando os resultados da comparação da adiposidade corporal entre os animais do grupo LepR SOCS3 KO e controle (n=10-11/ grupo) em 4 regiões diferentes: peri-ovariana, retroperitoneal (RP), peri-uterina, subcutânea, e da somatória das quatro regiões. **B.** Concentração de leptina no soro das fêmeas dos grupos LepR SOCS3 KO e controle com 32 dias de vida (n=9-11/ grupo). **C.** Peso uterino das fêmeas dos grupos LepR SOCS3 KO e controle com 32 dias de vida (n=10-11/ grupo). **D.** Concentração de estradiol no soro das fêmeas dos grupos LepR SOCS3 KO e controle com 32 dias de vida (n=9-11/ grupo). Média ± erro padrão. *P<0,05.

5.4 Diferentes níveis de sensibilidade à leptina promovem alterações na expressão gênica de genes metabólicos

Para determinarmos se os efeitos observados em relação a maturação sexual eram seguidos por modificações na expressão de genes relacionados ao controle metabólico ou a regulação do eixo HPG, avaliamos a expressão hipotalâmica de genes específicos em dois subgrupos experimentais: 1) animais que tiveram o hipotálamo coletado no dia de detecção da abertura vaginal, nos grupos NR, Nestin SOCS3 KO, LepR SOCS3 KO e respectivos controles e, 2) animais que foram sacrificados aos 32 dias de vida, nos grupos NR, LepR SOCS3 KO e respectivos controles. A expressão dos seguintes genes foi avaliada: pró-opiomelanocortina (*Pomc)*, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (*Cart)*, neuropeptídeo Y (*Npy)*, proteína relacionada ao gene agouti (*Agrp)*, receptor de leptina (*Ob-rb)* e galanina (*Gal)*, relacionados

com o controle metabólico, e os genes receptor de estrógeno do tipo α (*Esr1),* hormônio liberador de gonadotrofinas (*Gnrh1),* kisspeptina (*Kiss1),* neurocinina b (*Tac2)* e óxido nítrico sintase 1 (*Nos1),* relacionados com a regulação de aspectos reprodutivos.

Nos encéfalos coletados no dia da abertura vaginal observamos que no grupo NR não houve variação na expressão de *Cart*, porém houve aumento da expressão do RNAm de *Pomc* e redução na expressão do RNAm de *Npy* e *Agrp*, em relação ao seu respectivo grupo controle (Figura 19 A). Nos animais do grupo Nestin SOCS3 KO e controle, não foram observadas nenhuma alteração significativa na expressão dos genes mencionados (Figura 19 B). Enquanto que, na análise realizada nos hipotálamos coletados dos animais do grupo LepR SOCS3 KO, foi constatado um aumento na expressão apenas do *Npy*, já os demais genes metabólicos não apresentaram variação na expressão em relação ao respectivo controle, (Figura 19 C).

Além disto, em todos os grupos experimentais não observamos variações na expressão dos genes relacionados à reprodução, como *Kiss1*, *Esr1* e *Gnrh1* em relação aos seus respectivos grupos controle. Sugerindo que os resultados observados, pelo menos nos grupos NR e respectivo controle, bem como, LepR SOCS3 KO e respectivo grupo controle, ocorreram devido a diferença no peso corporal e não devido a alteração da modulação do eixo HPG.

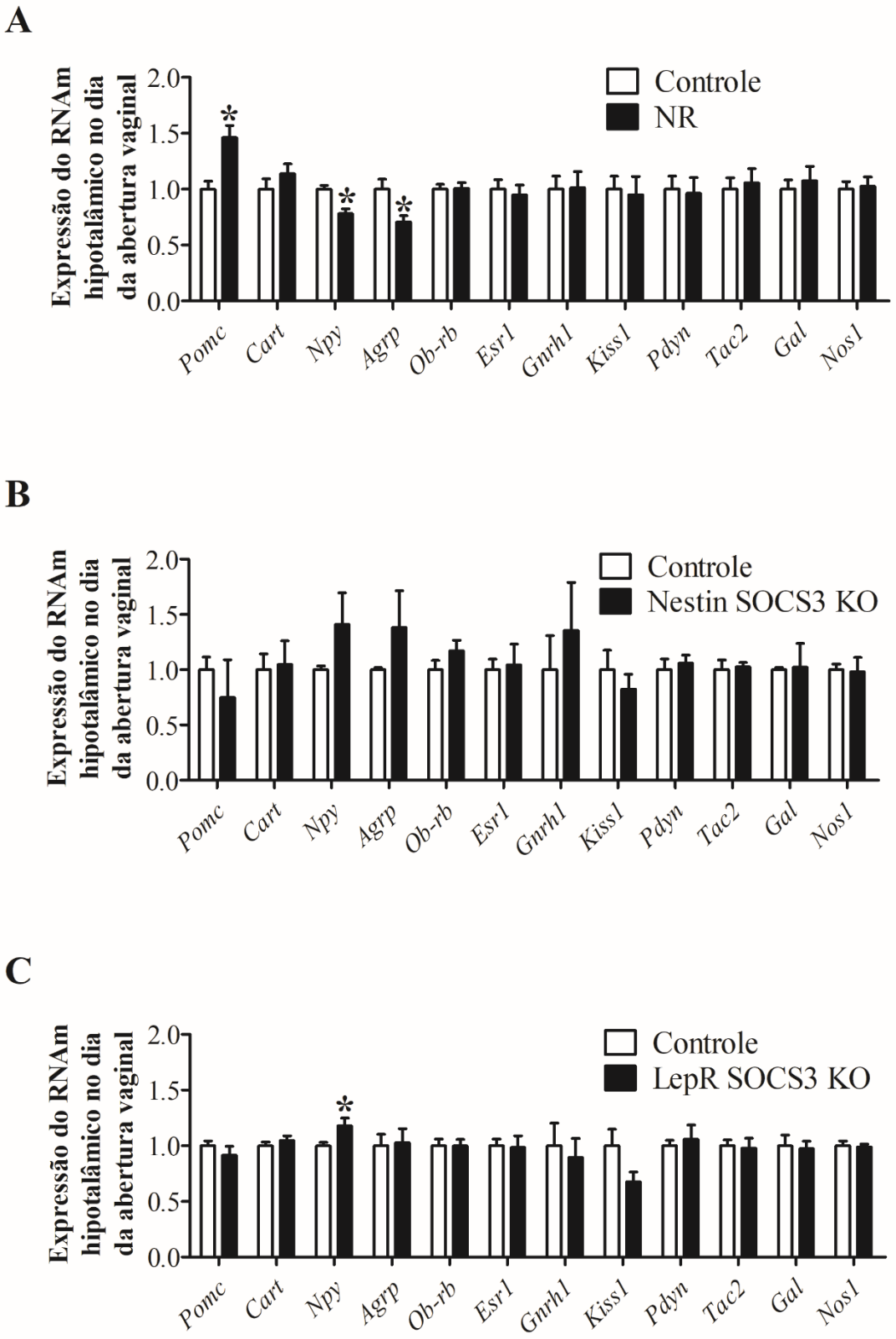

Figura 19. Expressão gênica hipotalâmica no dia da abertura vaginal. A, B e C. Resultados da análise da expressão gênica do hipotálamo total das fêmeas dos grupos (A) NR (n=7) e controle (n=8), (B) Nestin SOCS3 KO (n=5) e controle (n=8), (C) LepR SOCS3 KO (n=8) e controle (n=8). Média ± erro padrão. *P<0,05.

Ao avaliarmos a expressão de genes hipotalâmicos aos 32 dias observamos que o grupo NR apresentou um aumento significativo da expressão do RNAm que codifica o *Cart* e houve aumento não significativo da expressão de *Pomc* em relação ao grupo controle. Além disto, o grupo NR apresentou redução da expressão do *Npy*, enquanto a expressão de *Agrp* não variou. (Figura 20 A). No grupo LepR SOCS3 KO, não foram observadas variações significativas na expressão dos genes relacionados ao controle metabólico (Figura 20 B). Em relação aos genes analisado que se correlacionam com o eixo HPG, notamos que em ambos os grupos não houve variação na expressão de genes importantes para a reprodução como *Gnrh1*, *Esr1* e *Kiss1*. Curiosamente, tanto na análise do grupo NR em relação ao seu respectivo controle, como os animais LepR SOCS3 KO em relação ao seu respectivo controle, apresentaram aumento da expressão de *Tac2* (Figura 20 A e B).

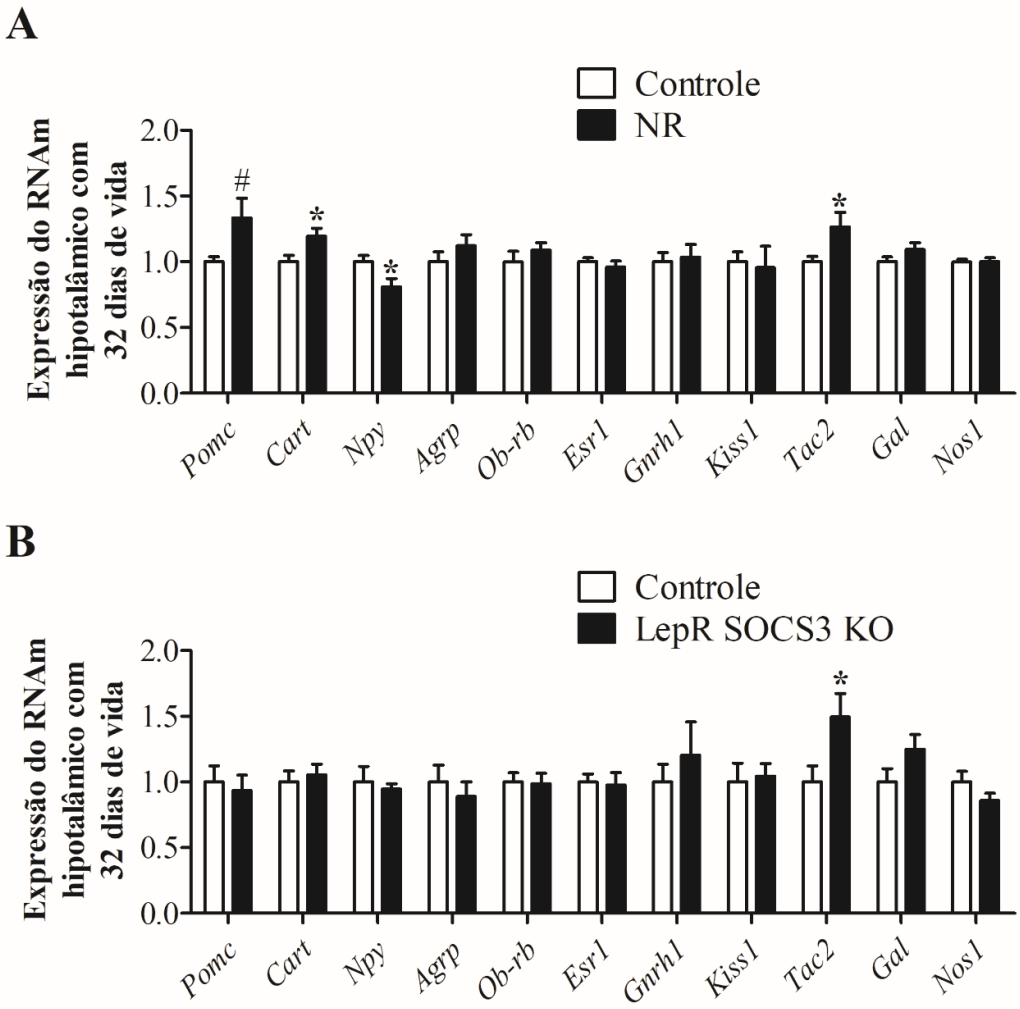

Figura 20. Expressão gênica hipotalâmica aos 32 dias de vida. A e B. Resultados da análise da expressão gênica do hipotálamo total de fêmeas com 32 dias de vida dos grupos (A) NR e controle (n=8/ grupo) e (B) LepR SOCS3 KO e controle (n=8/ grupo). Média ± erro padrão. *P<0,05. # P= 0,0650.

5.5 Acasalamento de animais Kiss1-Cre com animais SOCS3-flox promovem a inativação do *Socs3* em células que expressam o gene *Kiss1*

Ao acasalarmos animais Kiss1-Cre com animais Socs3-flox promovemos a recombinação da *Cre-recombinase* com os sítios *loxP* e assim, numa mesma ninhada, geramos animais com a inativação do *Socs3* de células que expressam *Kiss1* e animais sem a inativação, que foram usados como controle. A recombinação, como pode ser observado na Figura 21, ocorre quando há a deleção do trecho específico que fica entre os sítios *loxP*. Ao fazermos a análise do gel de eletroforese proveniente do PCR do DNA dos animais com a deleção, os animais Kiss1 SOCS3 KO apresentam a marcação das bandas na altura de 250 pares de bases (pb) (Pedroso et al., 2014; Yasukawa et al., 2003).

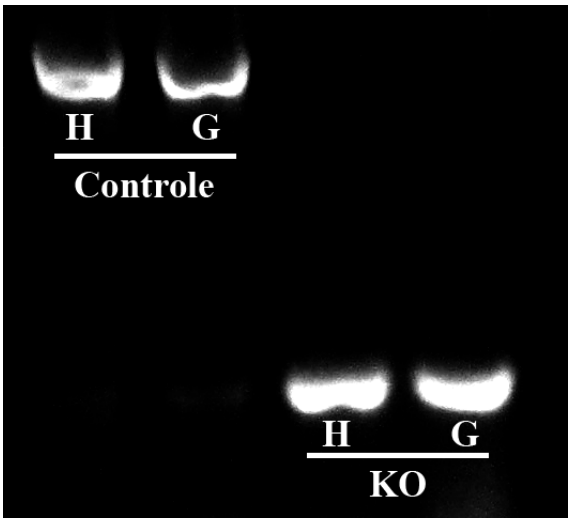

Figura 21. Validação do animal Kiss1 SOCS3 KO. Fotografia da marcação das bandas do gel de eletroforese do procedimento de validação do modelo Kiss1 SOCS3 KO. H: hipotálamo. G: gônadas.

5.6 Deleção global do gene *SOCS3* de células que expressam o gene *Kiss1* não interfere na maturação sexual de camundongos

Para determinarmos se a inativação do gene *Socs3* apenas das células que expressam o gene *Kiss1*, poderia interferir no desenvolvimento e maturação sexual de camundongos, fêmeas Kiss1 SOCS3 KO e respectivo controle foram avaliados. Na avaliação do peso corporal semanal notamos que não houve diferença no ganho de peso corporal quando comparamos as fêmeas Kiss1 SOCS3 KO às fêmeas controles (Figura 22 A). Além disto, a média do peso corporal no dia em que os eventos relacionados a maturação sexual ocorreram foi semelhante entre os grupos (Figura 22 B).

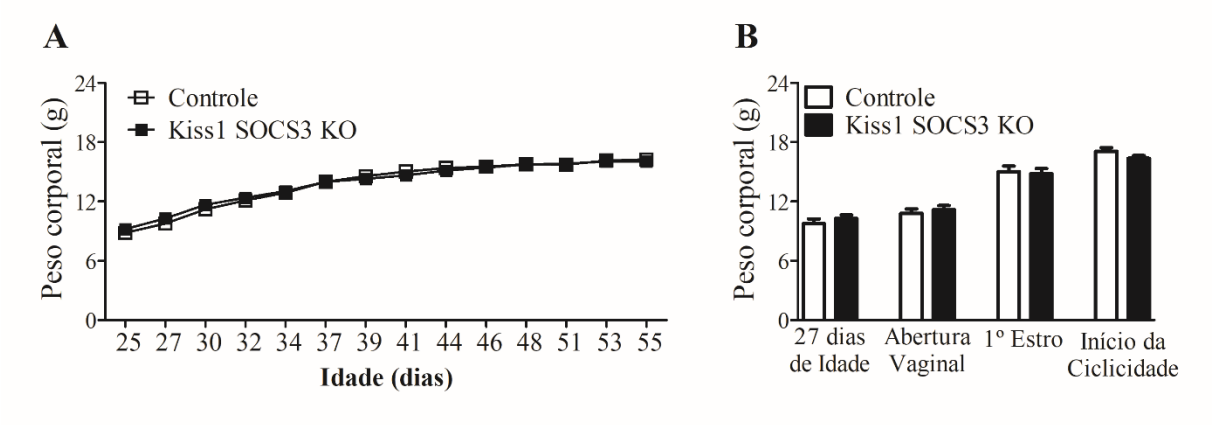

Figura 22. Peso corporal não é afetado pela deleção de Socs3 nas células que expressam o gene *Kiss1*. (A) Peso corporal das fêmeas dos grupos Controle (n=14) e Kiss1 SOCS3 KO (n=13). **(B)** Peso corporal dos animais em diferentes fases do amadurecimento sexual (Controle: n=20; Kiss1 SOCS3 KO: n=18). Média ± erro padrão. *P*>0,05.

Ao avaliarmos a maturação sexual das fêmeas Kiss1 SOCS3 KO constatamos que a deleção do gene *Socs3* em células que expressam o gene *Kiss1* não foi suficiente para alterar a idade da abertura vaginal ou 1º estro (Figura 23). Como podemos observar na Figura 23 A e B, a idade média de abertura vaginal entre os grupos foi semelhante, sendo que, 50% dos animais de ambos os grupos apresentaram abertura vaginal com 31 dias de vida. Em ambos os grupos, Kiss1 SOCS3 KO e controle, a ocorrência do 1º estro também ocorreu em idades semelhantes (Figura 23 C e D), sendo que, 75% dos animais apresentaram a primeira cornificação no lavado vaginal com 58 dias de vida. Na avaliação do início de ciclicidade estral, o mesmo padrão se repetiu, animais de ambos os grupos exibiram início do ciclo estral em idades semelhantes (Figura 23 E e F).

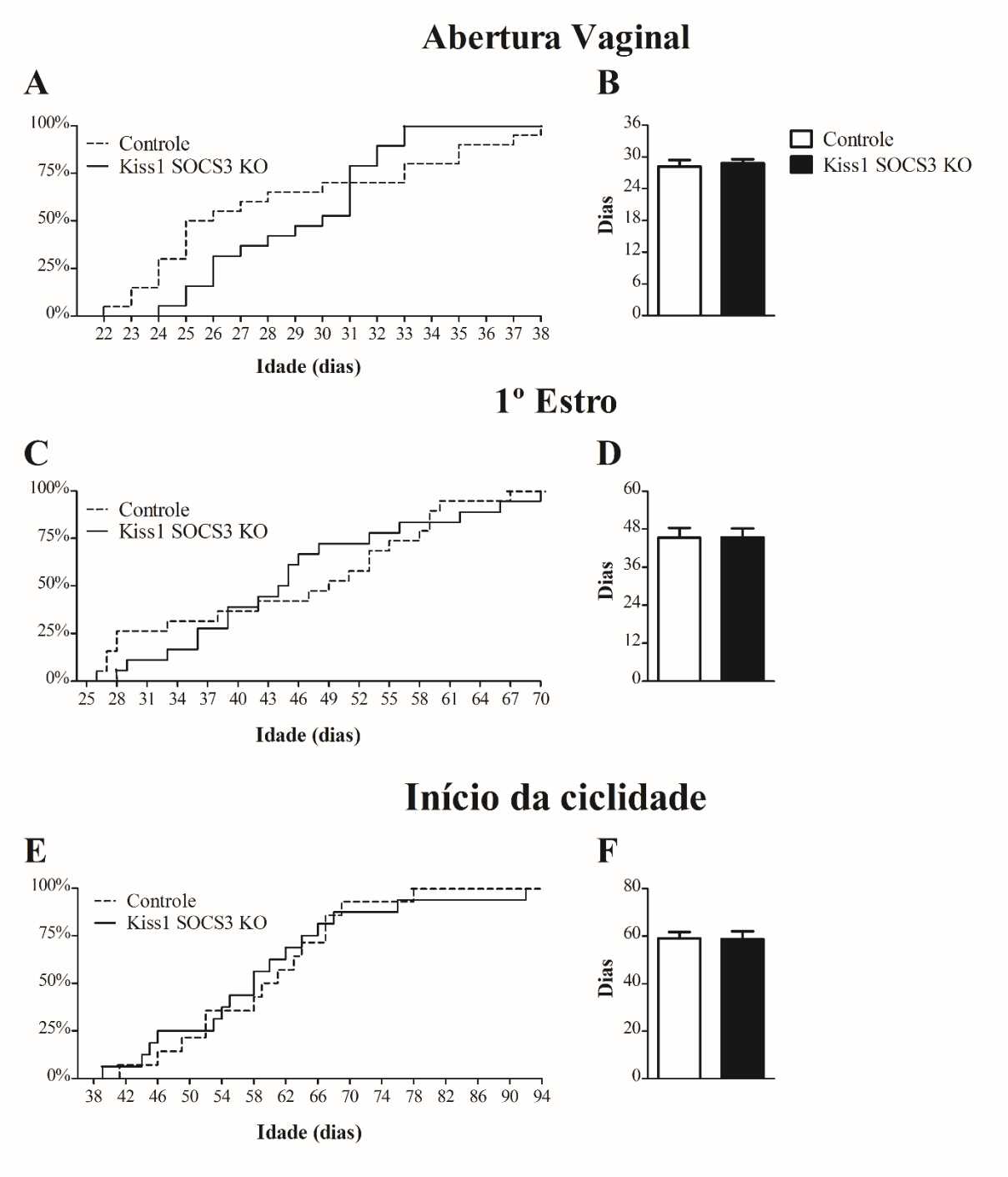

Figura 23. Expressão de *Socs3* em células que expressam o gene *Kiss1* não é necessária para a maturação sexual de fêmeas. (A, B, E). Gráficos mostrando a porcentagem de fêmeas Controle e Kiss1 SOCS3 KO que apresentaram abertura vaginal (A; Controle: n=20; Kiss1 SOCS3 KO: n=18), primeiro estro (B; Controle: n=20; Kiss1 SOCS3 KO: n=18) e início de regularidade no ciclo estral (C; Controle: n=14; Kiss1 SOCS3 KO: n= 16). **(B, D, F).** Gráficos representando o tempo médio para as fêmeas dos grupos Controle e Kiss1 SOCS3 KO apresentarem abertura vaginal (B), primeiro estro (D) e início de ciclo estral (F). Média ± erro padrão. $P>0,05$.

Como os animais gerados representavam um novo modelo experimental ainda não descrito na literatura, além dos experimentos propostos, decidimos verificar outros parâmetros

relacionados ao sistema reprodutivo. Avaliamos a duração do ciclo estral, e quantos dias as fêmeas permaneceram em cada fase do ciclo estral (estro, metestro e diestro) (Figura 24 A). Constatamos que não houve variação nem na duração dos ciclos, nem no tempo de duração de cada fase específica (Controle: 5,2 ± 0,1 dias, n= 8; Kiss1 SOCS3 KO: 5,5 ± 0,01 dias, n=11; *P*= 0,1043). Com relação à fertilidade, analisamos o tempo de acasalamento de fêmeas Kiss1 SOCS3 KO com machos homozigotos para o Socs3-flox, e também avaliamos o número de filhotes gerados na primeira ninhada de cada uma das fêmeas avaliadas. Ao compararmos os dois grupos, não foram observadas diferenças entre o número de dias até as fêmeas gerarem os filhotes (Figura 24 B) e nem entre o número de filhotes gerados (Figura 24 C).

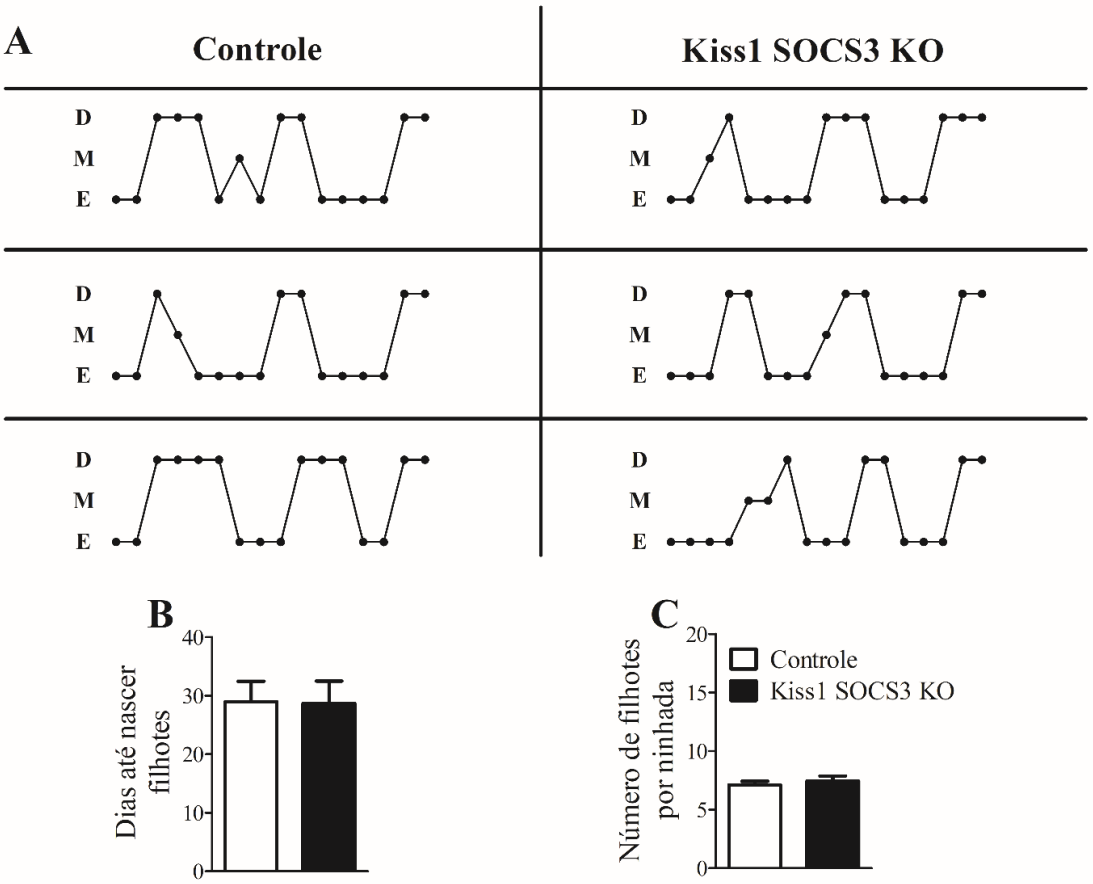

Figura 24. Inativação de Socs3 em células que expressam o gene *Kiss1* não afetam a fertilidade. (A) Gráficos representativos demonstrando dia-a-dia do ciclo estral de fêmeas Controle (esquerda) e KO (direita). **(B)** Gráfico mostrando o tempo médio que fêmeas Controle (n=8) e KO (n=9) levaram desde que colocadas para acasalar até a concepção dos filhotes. **(C)** Gráfico demonstrando o número médio de filhotes por ninhada das fêmeas Controle (n=8) e KO (n=9) colocadas para acasalar. Média ± erro padrão. *P*>0,05.

5.7 Metabolismo glicêmico não sofre alterações com a inativação de *Socs3* em células Kiss1

Na análise do GTT e ITT, que indicariam alterações no metabolismo glicêmico, visto que células pancreáticas expressam o gene *Kiss1* (Hauge-Evans et al., 2006), notamos que animais com inativação do gene *Socs3* apresentaram resposta semelhantes aos animais controle (Figura 25). Ou seja, os animais Kiss1 SOCS3 KO também apresentaram aumento da glicemia após a injeção de glicose intraperitoneal, com redução gradual dos níveis glicêmicos após ao longo do período avaliado, voltando à valores normais após 2 horas do início do teste (Figura 25 A e C). Da mesma forma, ao injetarmos insulina intraperitoneal nesses mesmos animais, ocorreu uma redução dos níveis glicêmicos, acompanhando os valores dos animais controle, e retornando à sua normalidade durante o período acompanhado (Figura 25 B e D).

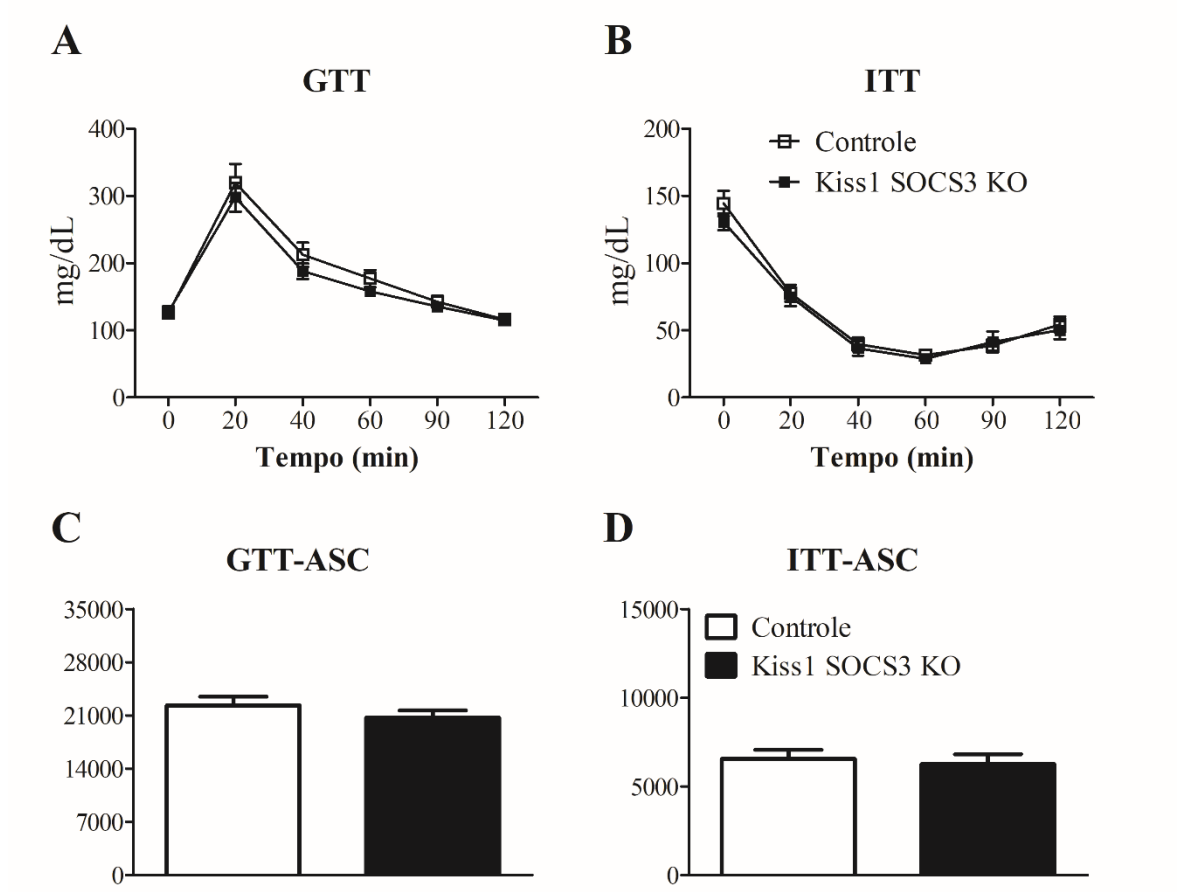

Figura 25. Inativação do SOCS3 de células que expressam o gene *Kiss1* não interfere no metabolismo glicêmico. (A). Gráfico de curva glicêmica nos tempos 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após uma injeção de 2g de glicose/ Kg nas fêmeas Controle (n=11) e Kiss1 SOCS3 KO (n=11). **(B)** Gráfico de curva glicêmica nos tempos 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após uma injeção de 0,75 µl de insulina/ 1mL de salina (0,1 mL/ 10 g de cada camundongo) nas fêmeas Controle e Kiss1 SOCS3 KO. **(C)** Gráfico de barras sobre a área sob a curva (ASC) do GTT. **(D)** Gráfico de barras sobre a área sob a curva do ITT. Média ± erro padrão. $P>0,05$.

5.8 Resposta à leptina e composição corporal não são afetados pela deleção de SOCS3 em células Kiss1

Ao avaliarmos o consumo alimentar de fêmeas adultas (12 - 14 semanas de vida) dos grupos Kiss1 SOCS3 KO e controle através do teste de sensibilidade à leptina, verificamos que todos os animais reduziram significativamente o consumo alimentar em todos os pontos avaliados após a injeção, indicando que o teste funcionou, porém não houve diferença entre os grupos (Figura 26 A). Além disto, na análise dos depósitos da gordura corporal (Figura 26 B) e do peso uterino (Figura 26 C) não foram observadas diferença entre os grupos experimentais.

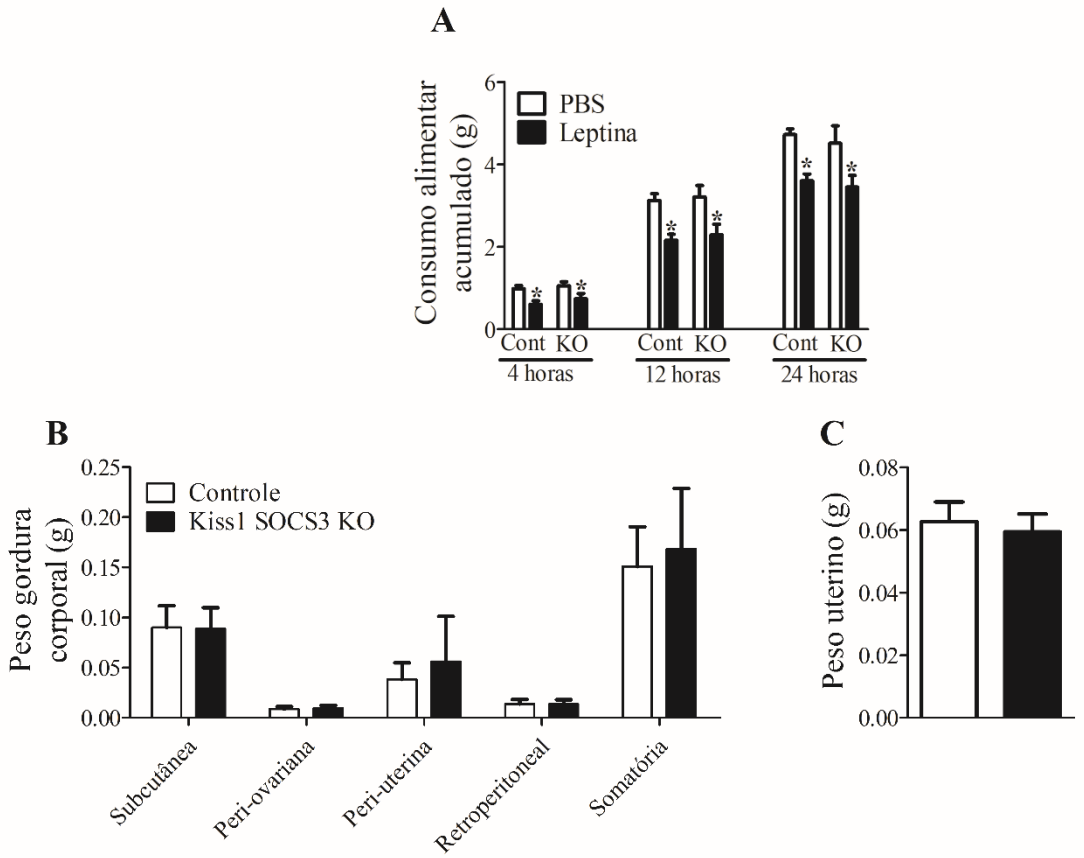

Figura 26. Sensibilidade à leptina entre grupos experimentais é semelhante e a inativação do SOCS3 não afeta a composição corporal. (A) Teste de sensibilidade à leptina para determinar a capacidade de uma injeção intraperitoneal aguda de leptina (2,5 μg/g) para reduzir a ingestão de alimentos em comparação com o dia de injeção de veículo (n= 8/ grupo). **(B)** Gráfico de barras do peso da gordura corporal das regiões: subcutânea, peri-ovariana, peri-uterina, retroperitoneal e a somatória de todas essas regiões (Kiss1 SOCS3 KO: n=10; Controle: n=11). **(C)** Gráfico de barras da média do peso dos úteros das fêmeas sacrificadas (Kiss1 SOCS3 KO: n=10; Controle: n=11). Média ± erro padrão. *P<0,05.

Antes de passarmos para a segunda parte do projeto, que é a análise das regiões hipotalâmicas relacionadas com o controle reprodutivo e metabólico, para facilitar o

entendimento de todos os acompanhamentos realizados, segue uma tabela (Tabela 3) com um resumo dos resultados mais importantes.

Tabela 3. Resumo dos resultados dos grupos acompanhados.

	NR	**Nestin SOCS3 KO**	**LepR SOCS3 KO**	**Kiss1 SOCS3 KO**
Serum Leptina	Aumenta	Diminui	Diminui	----------
Útero	Hipertrofia	Atrofia	Atrofia	Não muda
Gordura	Maior acúmulo	----------	Diminui	Não muda
AV	Adianta	Atrasa	Atrasa	Não muda
1º estro	Adianta	----------	Atrasa	Não muda
Ciclicidade	Adianta	----------	Atrasa	Não muda
Sensib. Leptina	Não muda	Aumenta	Aumenta*	Não muda

5.9 O desenvolvimento da maturação sexual de camundongos fêmeas é acompanho por mudanças na expressão de genes hipotalâmicos

Na análise das regiões hipotalâmicas contendo os núcleos de interesse definimos os genes a serem analisados com base em dados da literatura (Abreu et al., 2015; Bohlen et al., 2016; Dauber et al., 2017; Ratra and Elias, 2014), sendo que foram selecionados genes relacionados com o eixo reprodutivo e com o controle metabólico.

Na análise da área pré-óptica medial (Figura 27), os genes avaliados foram: *Gnrh1*, *Nos1*, *Esr1*, *Esr2* (receptor de estrógeno do tipo β), *Ar* (receptor de andrógeno) e *Pgr* (receptor de progesterona). Observamos que em relação as idades escolhidas, ocorreu uma diminuição da expressão do gene *Esr1* após a puberdade, e diminuição na expressão do gene *Nos1* entre as fêmeas dos grupos Pré-púbere e Púbere. Além disto, observamos um aumento do gene *Ar* a partir da puberdade, e a expressão do gene *Pgr* é elevada nos animais adultos, enquanto não foram observadas variações na expressão dos genes *Gnrh1* e *Esr2*.

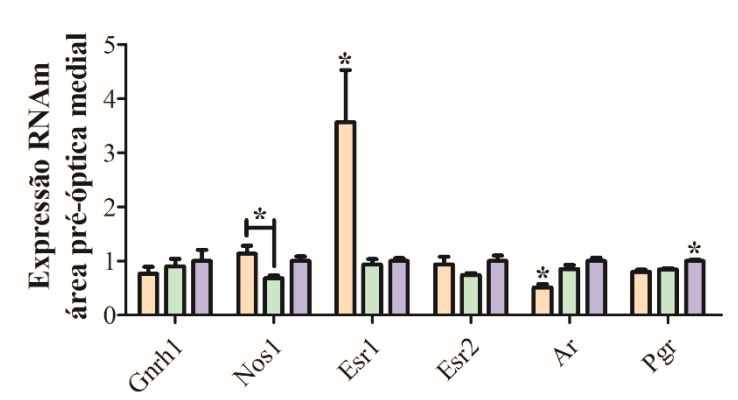

Figura 27. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com reprodução na área pré-óptica medial. Resultado da análise da expressão gênica de fêmeas nas idades pré-púbere, púbere e adultas (n = 7/grupo). Média ± erro padrão. * *P*< 0,05.

Na análise da área hipotalâmica médio basal (Figura 28), observamos que a partir da puberdade houve um uma diminuição significativa da expressão do gene *Mkrn3* (makorin ring finger protein 3) e aumento significativa na expressão dos genes *Dlk1* (protein delta homolog 1), *Gnrh1*, *Ar* e *Pgr* em relação aos demais grupos avaliados. Além disso, a expressão do gene *Tac2* apresentou um aumento comparando apenas o grupo pré-púbere e o grupo adulto. Sendo que, não foram observadas diferenças na expressão dos genes *Kiss1*, *Esr1* e *Esr2* entre os grupos.

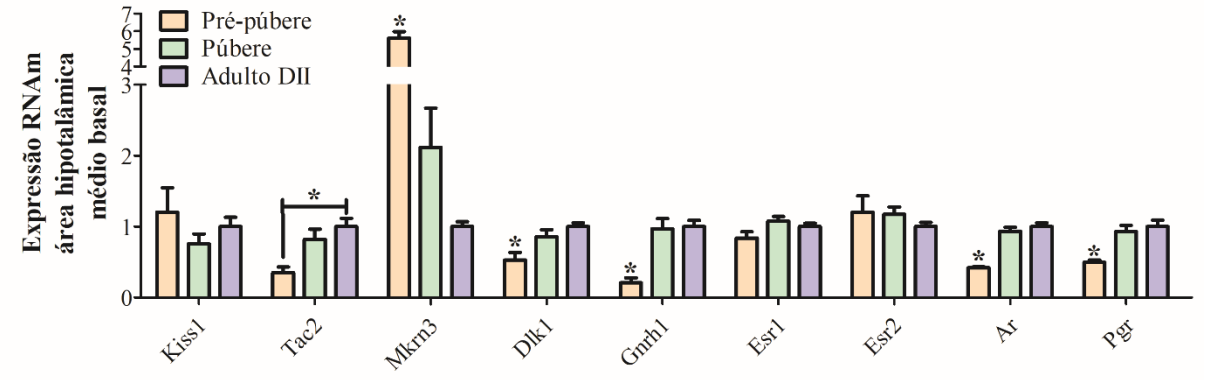

Figura 28. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com reprodução na área médio basal. Resultado da análise da expressão gênica de fêmeas nas idades pré-púbere, púbere e adultas (n = 5-7/grupo). Média ± erro padrão. * *P*< 0,05.

Na análise da área pré-mamilar ventral (Figura 29), observamos um aumento da expressão dos genes *Nos1* e *Pgr*, sendo que, a diferença do gene *Pgr* foi evidenciada apenas entre os grupos pré-púbere e adulto. A expressão do RNAm dos genes *Esr1*, *Esr2* e *Ar* não variou entre os grupos avaliados.

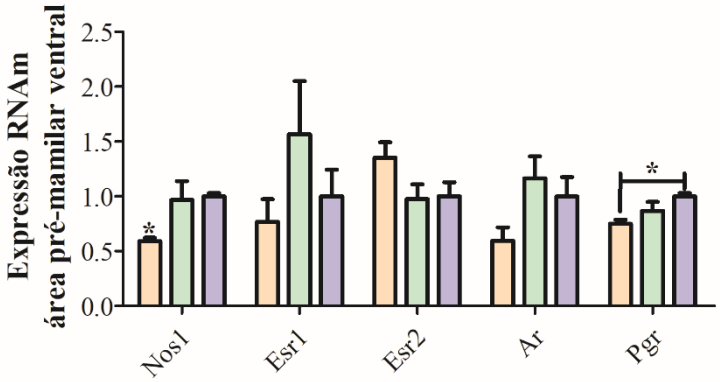

Figura 29. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com reprodução na área pré-mamilar ventral. Resultado da análise da expressão gênica de fêmeas nas idades pré-púbere, púbere e adultas (n = 6-8/grupo). Média ± erro padrão. * $P < 0,05$.

A análise dos genes relacionados ao metabolismo (Figura 30) foi realizada na área médio basal, enquanto que na área pré-óptica medial avaliamos a expressão do *Ob-rb*, e na área pré-mamilar ventral avaliamos a expressão do gene *Ob-rb* e *Cart*. Observamos que na área médio basal após a puberdade ocorreu uma diminuição significativa da expressão dos genes iodotironinas deiodinases tipo 2 e 3 (*Dio2* e *Dio3*, respectivamente). Além disso, observamos um aumento significativo na expressão do gene *Pomc* a partir da puberdade, assim como do gene *Gal*, cuja diferença foi evidenciada apenas entre os grupos pré-púberes e adulto. Por outro lado, observamos a diminuição do gene *Agrp* quando comparado com os grupos púbere e adulto. Não foi observada diferença na expressão do RNAm do gene *Ob-rb* entre os grupos. Em compensação, na área pré-óptica medial observamos uma diminuição significativa do gene *Ob-rb* a partir da puberdade. Na área pré-mamilar ventral, a expressão do gene *Cart* apresentou aumento após a puberdade, enquanto que, não detectamos alterações na expressão do gene *Ob-rb*.

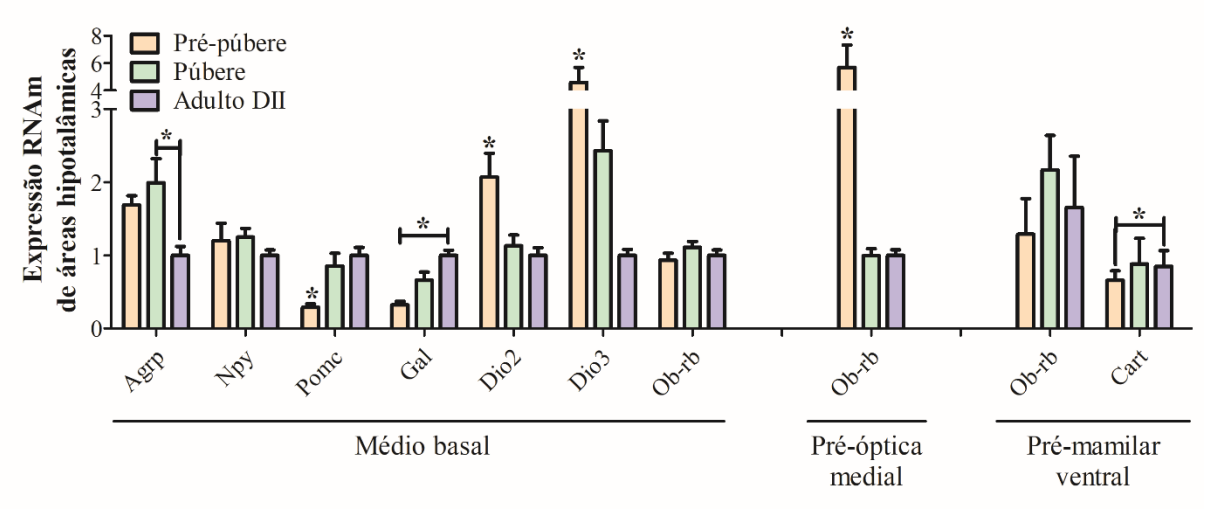

Figura 30. Análise da expressão gênica de genes relacionadas com o controle metabólico. Resultado da análise da expressão gênica da área pré-óptica medial (n = 7/grupo), **á**rea médio basal (n = 5-7/grupo) e área pré-mamilar ventral (n = 6-8/grupo) de fêmeas nas idades pré-púbere, púbere e adultas. Média ± erro padrão. * $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que, em fêmeas com maior aporte de alimento em fase lactente (modelo Ninhada Reduzida), elas são mais pesadas que seu grupo controle desde os 14 dias de vida, há adiantamento de todas as fases da maturação sexual e não há alteração na sensibilidade à leptina. Já a inativação do *Socs3* causa diferentes graus de resposta dependendo das células de onde são inativadas: 1) quando inativado globalmente do SNC (modelo Nestin SOCS3 KO), as fêmeas além de serem muito mais leves que o seu controle, apresentam apenas a primeira das três fases que definem a maturação sexual e têm a sensibilidade à leptina aumentada; 2) quando a inativação do gene ocorre em células que expressam o receptor de leptina (modelo LepR SOCS3 KO), as fêmeas são mais leves que seu grupo controle, apresentam um atraso no desencadear das três fases da maturação sexual e a sensibilidade à leptina também está aumentada; 3) quando a inativação ocorre apenas em células que expressam o gene *Kiss1* (modelo Kiss1 SOCS3 KO), as fêmeas não apresentaram nenhum tipo de alteração, nem corporal, nem no desenvolvimento da maturação sexual e nem na sensibilidade à leptina. Ainda sobre esses modelos, observamos que alguns genes no hipotálamo relacionados à reprodução e ao metabolismo apresentam alterações na expressão do RNAm em idade próxima ao da abertura vaginal. Falando sobre genes metabólicos e reprodutivos, uma outra parte deste estudo foi avaliar a variação que ocorre na expressão do RNAm de alguns genes dessas categorias durante três idades diferentes (pré-púbere, púbere e adulto) em núcleos hipotalâmicos específicos. Essa análise teve como objetivo traçar um perfil sobre quais alterações moleculares podem estar associadas com a evolução do processo de amadurecimento reprodutivo sob controle metabólico.

Em humanos, a discussão de que um determinado peso é essencial para o desencadear da maturação sexual já está estabelecido a algum tempo (Frisch and McArthur, 1974). Desde então, diversos estudos tem demonstrado que, principalmente em meninas, tem ocorrido um adiantamento da maturação sexual e que esse fenômeno pode estar intimamente relacionado ao aumento excessivo de peso que as crianças estão apresentando desde as últimas décadas (Biro et al., 2012; Day et al., 2015; Ogden et al., 2016). A obesidade e o sobrepeso infantil já são considerados como doenças não comunicáveis pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organisation, 2016; World Health Organization - WHO, 2015), principalmente por promoverem a predisposição a outras doenças (Novelle et al., 2017; Speiser et al., 2005). Existe uma miríade de fatores que podem promover a obesidade e o sobrepeso, desde a grande

facilidade para obtenção de alimentos de alto valor calórico até efeitos epigenéticos e programação intrauterina (Kubo et al., 2016).

No grupo NR deste trabalho, nós observamos que os animais se tornaram mais pesados que seu grupo controle ainda em fase lactente, e que essa proporção de maior peso se manteve durante todo o período do acompanhamento, estando de acordo com outros trabalhos na área que se referem à camundongos e ratos (Chabod et al., 2011; Habbout et al., 2013; Heidel et al., 1999; Kennedy, 1957; Andreas Plagemann et al., 1999; Zhang et al., 2011). Também notamos que essas fêmeas apresentaram adiantamento em todas as fases da maturação sexual, além de apresentarem maior tamanho uterino e quantidade acumulada de gordura, que foi acompanhado por níveis elevados de leptina circulante aos 32 dias de vida. Sánchez-Garrido e colaboradores (2013) obtiveram resultados semelhantes ao adiantamento da maturação sexual em ratos Wistar machos que foram submetidos à ninhada reduzida. Nesse mesmo trabalho, entretanto, as fêmeas provenientes de ninhada reduzida, embora mais pesadas que seu grupo controle, não apresentaram adiantamento da abertura vaginal (Sánchez-Garrido et al., 2013).

Apesar de alguns estudos mostrarem que roedores de ninhadas reduzidas desenvolvem resistência central à leptina (A. Plagemann et al., 1999; Rodrigues et al., 2011; Zhang et al., 2011), em nosso estudo as fêmeas do grupo NR não apresentaram resistência a leptina, pelo menos na idade avaliada. Os dados obtidos estão de acordo com o observado em um estudo realizado com ratas fêmeas, em que os animais de ninhada reduzida, tinham mais leptina circulante que os animais controle aos 30 dias de vida, dessa forma, levantando a hipótese de que tivessem desenvolvido resistência ao hormônio. Esses animais após 2 horas do tratamento com leptina, apesar de não mostrarem diferença na sensibilidade ao hormônio com relação ao grupo controle, mantiveram os níveis de leptina elevados, sugerindo que o excesso de nutrição em fase lactente não necessariamente causa resistência à leptina, apesar de aumentar o peso corporal, a adiposidade e os níveis circulantes de leptina (Castro-González et al., 2015). Apesar de nesse estudo de Castro-González e colaboradores não ter sido observado mudanças no desencadear da maturação sexual das ratas que avaliaram (Castro-González et al., 2015), um estudo de 2016 com meninas mostrou que os níveis elevados de leptina circulante pode ser um indicador de adiantamento da menarca, independente do índice de massa corporal (Gavela-Pérez et al., 2016).

Nossos resultados em relação a expressão de genes hipotalâmicos obtidos no grupo NR, em que mostramos um aumento da expressão de *Pomc* e redução na expressão de *Npy*, estão em acordo com resultados obtidos em protocolos que causam obesidade induzida por dieta (Hagan et al., 1999; Pedroso et al., 2014; Ziotopoulou et al., 2017). Em outro trabalho realizado

com ratas fêmeas, foi demonstrado que os animais tratados com dieta rica em gordura em período lactente se tornaram mais pesadas que seu grupo controle, e que apesar de não ter acontecido adiantamento da maturação sexual, 30% delas apresentaram irregularidades no ciclo estral (Lie et al., 2013). Dessa forma, levantamos a possibilidade de que os efeitos da obesidade induzida por redução de ninhada, ou outro protocolo não explorado no presente trabalho, podem impactar a maturação sexual dependendo da idade em que o indivíduo estiver sujeito as alterações alimentares, sendo que, alterações crônicas em fase inicial da vida, antecedendo a puberdade, provavelmente tem uma influência maior sobre a maturação sexual.

Ainda assim, Rodrigues e colaboradores relataram que há um aumento da expressão de *Socs3* em ratos de ninhada reduzida, o que poderia indicar resistência central à leptina (Rodrigues et al., 2011). Sabendo que o SOCS3 é uma das moléculas responsáveis por bloquear a cascata de atividade do LepR (Bjørbæk et al., 1998), a inativação desse gene promove um aumento da resposta celular aos efeitos de citocinas, incluindo a leptina. Por causa do efeito na sensibilidade à leptina, diferentes estudos induziram a deleção específica do *Socs3* em células alvo para entender sua função específica. Em machos, a inativação do *Socs3* no SNC melhora a homeostase da glicose, e nos animais com inativação do *Socs3* em células que expressam o LepR, previne contra a resistência à leptina e à insulina induzida por dieta rica em caloria (Pedroso et al., 2014). Em fêmeas a inativação do *Socs3* das células que possuem o LepR previne ainda: 1) a hiperfagia induzida pela gravidez; 2) o acúmulo de gordura corporal; 3) melhora a resistência à leptina e à insulina; sem impedir as fêmeas de continuarem com a gravidez (Zampieri et al., 2015).

No presente estudo demonstramos que a inativação específica do gene *Socs3* no SNC ou em células que expressam o LepR, induziu o aumento da sensibilidade à leptina, como esperado, sendo acompanho por déficits significativos na maturação sexual, principalmente nas fêmeas Nestin SOCS3 KO. Além disto, em ambos modelos experimentais observamos menor ganho de peso corporal ao longo do desenvolvimento. Em camundongos um atraso na maturação sexual também foi observado em animais provenientes de ninhadas grandes, ou seja, que acabam recebendo menos alimento, apresentando um quadro de desnutrição (Caron et al., 2012). Em ratos Wistar de ambos os sexos subnutridos, o mesmo efeito de menor peso corporal e atraso na maturação sexual também já foi relatado (Sánchez-Garrido et al., 2013). Além disto, na análise da expressão de genes hipotalâmicos, observamos aumento da expressão do *Npy*, possivelmente para servir como mecanismo compensatório devido ao baixo peso corporal.

Em animais de NR e LepR SOCS3 KO observamos o aumento da neurocinina b com 32 dias de vida. Gill e colaboradores estudaram os efeitos da neurocinina b no desencadear da

maturação sexual. Eles observaram que tanto camundongos fêmeas controle quanto com deleção do *Gnrh1*, com 30 dias de vida, apresentavam valores elevados de neurocinina b e de seu receptor em função da puberdade, sugerindo que durante o desencadear da maturação sexual, *Tac2* não é tão sensível ao controle negativo de hormônios sexuais. Esse fato foi comprovando com um experimento comparando a sensibilidade do *Tac2* e do *Kiss1* ao estradiol, em que a expressão de *Kiss1* foi muito mais sensível à regulação negativa do hormônio sexual (Gill et al., 2012). Em 2009 foi descoberto que mutações na neurocinina b ou em seu receptor causam disfunções reprodutivas (Navarro et al., 2012; Topaloglu et al., 2009).

É importante destacar que animais Nestin-Cre são conhecidos por apresentarem menor peso corporal, pois o modelo ao ser gerado teve inserido junto à *Cre-recombinase* o hormônio de crescimento humano (hGH), sendo que, essa inserção promove a maior ativação hipotalâmica do receptor do hormônio de crescimento (GHr), além do receptor de prolactina (Declercq et al., 2015; Galichet et al., 2010). Nossos resultados são semelhantes à relatos já descritos na literatura que mostraram que animais com a inativação global do *Socs3* no SNC apresentam outros problemas além da diminuição significativa do peso corporal, indicando que o papel do SOCS3 no SNC é muito importante para manutenção do organismo (Briancon et al., 2010; Mori et al., 2004; Pedroso et al., 2014). Como as fêmeas LepR SOCS3 KO, entretanto, não apresentaram diferença no peso corporal nas idades específicas das fases da maturação sexual, nossos resultados sugerem que os organismos precisam atingir um determinado peso corporal para atingir cada estágio da maturação sexual. Algo semelhante já foi relatado para garotas (Frisch and McArthur, 1974).

Dois estudos mostraram a correlação entre o acúmulo de tecido adiposo e os níveis de hormônios sexuais, um deles realizado em ratas e outro realizado em meninas (Cannady et al., 2000; De Ridder et al., 1990). Por causa disso, supomos que nossos animais apresentariam variações nos níveis circulantes de estrógeno, uma vez que notamos diferenças na quantidade de gordura acumulada. Os níveis de estradiol, porém, não variaram entre animais NR e seu controle, levantando a hipótese de que provavelmente os níveis de estradiol não estão envolvidos no adiantamento da maturação sexual. Já os animais LepR SOCS3 KO com 32 dias apresentaram valores elevados de estradiol ao compararmos com seu grupo controle. Nesse caso, como a idade escolhida para dosagem hormonal é muito próxima da idade em que ocorre a abertura vaginal, fenômeno que ocorre devido à um pico de estradiol circulante (Ahima et al., 1997; Safranski et al., 2005), e a maior parte das fêmeas eutanasiadas ainda não haviam apresentado essa característica, esse fator pode explicar os valores elevados de estradiol. Apesar de já estar demonstrado na literatura que o tamanho uterino é influenciado pelos níveis

circulantes de estrógeno (Frazão et al., 2013), as diferenças observadas no tamanho uterino dos animais não pôde ser explicada pelos níveis circulantes de estradiol medido. Como os animais NR tiveram adiantamento da maturação sexual, provavelmente o útero desses animais tenha crescido mais rapidamente que dos animais controle, contrapondo os resultados obtidos pelos animais com inativação do *Socs3*, que tiveram atraso na maturação sexual e menor tamanho uterino.

Estudos anteriores demonstraram que alterações do metabolismo afetam ainda a expressão hipotalâmica do gene *Kiss1* e de seu receptor em diferentes modelos experimentais. Animais subnutridos apresentam redução da quantidade de fibras kisspeptinérgicas e da expressão do RNAm que codifica o gene *Kiss1* no hipotálamo (Caron et al., 2012; Castellano et al., 2005), e outro trabalho de Castellano e colaboradores demonstrou que processos de inflamação aguda em ratos machos causam redução na imunorreatividade à kisspeptina no núcleo arqueado (Castellano et al., 2010; Luque et al., 2007). Além disso, tanto camundongos quanto ratos machos diabéticos com hipogonadismo que apresentam expressão de RNAm de *Kiss1* reduzida, quando tratados com kisspeptina-10, têm parâmetros reprodutivos restabelecidos (Castellano et al., 2006). Sabe-se, entretanto, que neurônios Kiss1 são responsivo a leptina apenas após a puberdade, e que a inativação do LepR em células que expressam o gene *Kiss1* não afetam o peso corporal, maturação sexual e fertilidade (Cravo et al., 2013; Jose Donato et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados no modelo gerado no presente estudo, Kiss1 Socs3 KO, no qual não foram observados déficits no sistema reprodutivo. Nossos resultados, portanto, corroboram a conclusão de que neurônios Kiss1 não são alvos da sinalização da leptina durante o período de maturação sexual, entretanto, eles não deixam de chamar à atenção, visto a importância da Socs3 na sinalização de diversas citocinas. Mesmo sabendo-se que em animais intactos um percentual baixo de neurônios Kiss1 são responsivos à leptina (Cravo et al., 2011), estes neurônios são responsivos à outras citocinas como, por exemplo, prolactina e hormônio do crescimento (Araujo-Lopes et al., 2014; Brown et al., 2014; Kokay et al., 2011; Silveira et al., 2019, 2017; Sjoeholm et al., 2011). Portanto, não podemos ainda descartar a hipótese, que durante o desenvolvimento um mecanismo compensatório devido a inativação de Socs3 possa ter sido desencadeado. Importante destacar que, como já sabemos, humanos e animais adultos que tenham mutações no gene *Kiss1* ou de seu receptor, apresentam infertilidade (Funes et al., 2003; de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Mayer e Boehm, porém, também demonstraram a existência de um mecanismo de compensação relacionado ao *Kiss1*, pois mostraram que em camundongos que não expressam o gene ou seu

receptor, o desenvolvimento acontece normalmente e esses animais se tornam férteis, apesar de apresentarem ovários menores que o de animais controle (Mayer and Boehm, 2011).

Ainda, considerando que células pancreáticas de humanos e camundongos expressam o gene *Kiss1* e *Kiss1r* e que o papel desses genes no pâncreas está relacionado à um controle parácrino ou autócrino das ilhas pancreáticas (Hauge-Evans et al., 2006), realizamos os testes de GTT e ITT no modelo Kiss1 SOCS3 KO. Como mencionado anteriormente, trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que machos Nestin SOCS3 KO e animais LepR SOCS3 KO apresentaram alterações na regulação glicêmica (Pedroso et al., 2014; Zampieri et al., 2015). No nosso modelo Kiss1 SOCS3 KO, entretanto, não observamos qualquer alteração no metabolismo glicêmico sugerindo que, apesar de injeções de kisspeptina exógena aumentar a secreção de insulina induzida por glucose (Hauge-Evans et al., 2006), a expressão de Socs3 em células Kiss1 não promove alterações no metabolismo glicêmico propriamente dito.

6.1 Caracterização gênica ao longo do desenvolvimento

Para entender os padrões dos mecanismos moleculares durante o desenvolvimento da maturação sexual, avaliamos três regiões hipotalâmicas que são reconhecidas por seus papéis de atuação na regulação da reprodução e do metabolismo. São elas: a área pré-óptica medial, a área médio basal e a área pré-mamilar ventral. As análises foram realizadas em fêmeas nas idades pré-púbere, púbere e adulto. De forma geral, observamos que a maior parte das diferenças nas expressões gênicas, tanto metabólicas quanto reprodutivas, ocorrem a partir da fase púbere, indicando a importância das mudanças fisiológicas para o estabelecimento da puberdade.

Na área pré-óptica medial, encontramos o núcleo pré-óptico medial, que possui uma população de neurônios GnRH (Canteras et al., 1994). Nossas análises indicaram que a expressão dos genes *Nos1*, *Esr1*, *Ar*, *Pgr* e *Ob-rb* estão alteradas nessa área. Com relação ao *Nos1*, os neurônios dessa região que expressam esse gene já foram relacionados ao desencadear da reprodução (Bellefontaine et al., 2014; Donato et al., 2010b; J. K. Elmquist et al., 1998) por responderem à efeitos regulatórios da leptina. Além disso, Kim e colaboradores (2016) mostraram que em ratos, há colocalização dos receptores LepR e Erα em aproximadamente 80% dos neurônios dessa região, independente do sexo (Kim et al., 2016). Em nossos experimentos observamos que tanto a expressão do LepR, quanto do Erα, quanto do Nos1, estão elevados em idade pré-púbere. Assim podemos supor que a relação entre eles é essencial para a preparação do organismo para o início da maturação sexual. Também já se sabe

a muito tempo que essa região comporta núcleos dimórficos para o estabelecimento de comportamentos sexuais e que lesões nessa região causam alterações nos padrões de acasalamento tanto em ratos quanto em camundongos (Paredes et al., 1998; Roselli, 1991).

Um estudo mostrou que em idade pós-natal a diferenciação sexual sofre mais influência do estrógeno do que de andrógenos (Döhler et al., 1986). Bodo e Rissman (2008) também mostraram que logo depois do nascimento o tratamento com andrógenos, seguido por gonadectomia em fase adulta, causa alterações nos padrões de comportamento sexual (Bodo and Rissman, 2008). Em ovelhas adultas, foi demonstrado que a presença de receptores de progesterona na área pré-óptica medial não colocaliza com neurônios GnRH e que o efeito inibitório da progesterona sobre o GnRH não ocorre de forma direta (Skinner et al., 2001), e que camundongos fêmeas com inativação do receptor de progesterona em neurônios Kiss1 são inférteis e não produzem picos de LH por indução de injeção de estradiol (Stephens et al., 2015). A baixa expressão de *Pgr* pode ser justificada pela não necessidade deles nessa fase da vida, dado que em idade pré-púbere, neurônios GnRH estão quiescentes e os animais ainda não entraram em maturação sexual.

Na área médio basal do hipotálamo está localizado o núcleo arqueado (ARH) que possui tanto neurônios importantes para a reprodução (população Kiss1) quanto neurônios que regulam o metabolismo (populações POMC/Cart e AgRP/NPY). Com relação à reprodução, nessa região observamos que as diferenças na expressão gênica ocorreram sempre em idade pré-púbere. As alterações que encontramos nessa idade específica estão de acordo com dados da literatura que demonstram que a expressão isolada desses genes não são suficientes para o desencadear da maturação sexual (Bodo and Rissman, 2008; Clarkson et al., 2008; Döhler et al., 1986; Gill et al., 2012; Herbison, 2016; Navarro et al., 2009; Stephens et al., 2015). Observamos também que a expressão do gene *Dlk1* está reduzida nos animais pré-púberes e a expressão do *Mkrn3* está elevada. Recentemente, mutações desses dois genes foram associadas ao desencadear de puberdade precoce em humanos e modelos animais, sendo que, mutações que provocam a puberdade precoce causam expressões inversas às observadas em nosso estudo. Dessa forma, o padrão obtido está de acordo com a literatura (Abreu et al., 2015, 2013; Dauber et al., 2017).

Ainda nessa região, observamos que a expressão de *Pomc* apresenta um aumento significativo a partir da puberdade. Como demonstrado em nossos experimentos *in vivo*, os animais precisam atingir um peso ideal para que a maturação sexual seja desencadeada. Dessa forma o aumento da expressão de *Pomc* a partir da puberdade pode indicar que o organismo, após atingir esse patamar do peso corporal para o desencadear da maturação sexual, começa a

controlar melhor o aporte de alimento dado o efeito anorexígeno desse peptídeo. Também observamos que a expressão de galanina, difere em todas as idades avaliadas. Galanina é uma molécula que estimula o comportamento alimentar (Bartfai et al., 1993; Wang et al., 1998) e foi já demonstrado que ratos com peso corporal elevado em idade neonatal apresentam alterações na expressão dessa molécula (Andreas Plagemann et al., 1999; Plagemann et al., 2002). Nossos resultados demonstram que ocorre um aumento progressivo da expressão de *Gal* durante o desenvolvimento. A expressão de *Dio2* e *Dio3* estavam elevadas em idade pré-púbere. Ambas convertem o hormônio inativo T_4 no hormônio ativo T_3. Animais com deleção de *Dio3* apresenta aumento da sinalização de hormônios tireoidianos no SNC, promovendo efeitos antiobesogênicos (Wu et al., 2017). Assim, podemos supor que os níveis elevados dos dois genes estão associados com a necessidade de o organismo ganhar peso para adentrar na puberdade.

Na área pré-mamilar ventral observamos que os genes com alterações em sua expressão apresentavam níveis reduzidos de RNAm em idade pré-púbere. Nessa área está localizado o núcleo pré-mamilar ventral (PMv), e nossas análises demonstraram que ocorreu uma redução da expressão de *Nos1*. Assim como na área pré-óptica medial, os neurônios que expressam esse gene, na área pré-mamilar ventral, foram associados à reprodução devido as respostas aos efeitos regulatórios da leptina, sendo que, lesões em neurônios do PMv causam alterações na expressão de *Kiss1* e *Gnrh1* (Donato et al., 2013, 2010b). Sabe-se que essa região possui alguns neurônios que expressam o receptor de progesterona, porém que seu papel ainda não está muito claro (Donato and Elias, 2011; Intlekofer and Petersen, 2011). O que observamos em nossas análises é que ocorre um aumento da expressão do RNAm do *Pgr* a partir da puberdade. O mesmo padrão de resposta foi encontrado para a expressão do RNAm de *Cart*. Como já demonstrado na literatura, os neurônios do PMv que expressam o LepR também expressam *Cart*, mas que o efeito metabólico ainda é debatido (Elias et al., 2000). Curiosamente, em ratos machos adultos inexperientes expostos ao odor de fêmeas induziu o aumento da expressão de *Cart* na porção ventral do PMv (Cavalcante et al., 2006). Sabendo que neurônios do PMv projetam fibras para diversas áreas hipotalâmicas (Canteras et al., 1994; Donato et al., 2009), inclusive às outras duas áreas analisadas neste projeto, podemos supor que os efeitos observados na área pré-mamilar ventral auxiliam na coordenação do desencadear da maturação sexual.

Com esses resultados de animais selvagens conseguimos traçar um perfil genético da expressão de genes metabólicos e reprodutivos em áreas hipotalâmicas importantes para o controle dessas funções. Assim, em estudos futuros, conseguiremos comparar os resultados de

modelos experimentais para avaliarmos se houve algum desbalanço nesse fino controle genético.

7. CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados, podemos concluir que o peso corporal é mais importante para o desencadear da maturação sexual do que a sensibilidade do organismo ao hormônio leptina, sugerindo portanto, que a leptina atua na maturação sexual de forma indireta sobre os neurônios hipotalâmicos, importantes reguladores do eixo hipotálamo – hipófise – gonadal.

Além disso, ao traçar um perfil da expressão gênica hipotalâmica em diferentes idades poderemos no futuro avaliar se déficits da maturação sexual podem ser correlacionados a expressão do RNAm que codificam a expressão de receptores de hormônios sexuais, peptídeos correlacionados a funções reprodutivas e ou ao controle da ingestão alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central Precocious Puberty Caused by Mutations in the Imprinted Gene MKRN3. N Engl J Med 2013;368:2467–75. doi:10.1056/NEJMoa1302160.

Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. J Mol Endocrinol 2015;54:R131–9. doi:10.1530/JME-14-0315.

Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. J Clin Invest 1997;99:391–5. doi:10.1172/JCI119172.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 1996;382:250–2. doi:10.1038/382250a0.

Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. Biochem Biophys Res Commun 1971. doi:10.1016/S0006-291X(71)80179-1.

Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NSS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, et al. Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. Endocrinology 2014. doi:10.1210/en.2013-1889.

Babon JJ, Nicola NA. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. Growth Factors 2012. doi:10.3109/08977194.2012.687375.

Bakker H, Nagai J, Eisen EJ. Genetic Differences in Age and Weight at Sexual Maturation in Female Mice Selected for Rapid Growth Rate. J Anim Sci 1977;44:203–12.

Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 2000. doi:10.1074/jbc.275.19.14563.

Barry J, Dubois MP, Poulain P. LRF producing cells of the mammalian hypothalamus - A fluorescent antibody study. Zeitschrift Für Zellforsch Und Mikroskopische Anat 1973. doi:10.1007/BF02346227.

Bartfai T, Hokfelt T, Langel U. Galanin--a neuroendocrine peptide. Crit Rev Neurobiol 1993.

Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Breininger JF, et al. 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. J Histochem Cytochem 1999. doi:10.1177/002215549904700309.

Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. Proc Natl Acad Sci 1996. doi:10.1073/pnas.93.16.8374.

Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, D'Anglemont De Tassigny X, et al. Leptin-dependent neuronal no signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. J Clin Invest 2014. doi:10.1172/JCI65928.

Biosystems P. User bulletin 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. PE Biosyst Foster City, Calif 1997;1997.

Biro FM, Galvez MP, Greenspan LC, Succop PA, Vangeepuram N, Pinney SM, et al. Pubertal assessment method and baseline characteristics in a mixed longitudinal study of girls. Pediatrics 2010;126:e583–90. doi:10.1542/peds.2009-3079.

Biro FM, Greenspan LC, Galvez MP. Puberty in Girls of the 21st Century. J Pediatr Adolesc Gynecol 2012;25:289–94. doi:10.1016/j.jpag.2012.05.009.

Bjørbæk C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. Mol Cell 1998;1:619–25. doi:10.1097/QAI.0b013e3181ba37a7.

Bodo C, Rissman EF. The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. Endocrinology 2008. doi:10.1210/en.2008-0183.

Bohlen TM, Silveira MA, Buonfiglio D do C, Ferreira-Neto HC, Cipolla-Neto J, Donato J, et al. A Short-Day Photoperiod Delays the Timing of Puberty in Female Mice via Changes in the Kisspeptin System. Front Endocrinol (Lausanne) 2018;9. doi:10.3389/fendo.2018.00044.

Bohlen TM, Silveira MA, Zampieri TT, Frazão R, Donato J. Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice. Mol Cell Endocrinol 2016;423:11–21. doi:10.1016/j.mce.2015.12.022.

Briancon N, McNay DE, Maratos-Flier E, Flier JS. Combined neural inactivation of suppressor of cytokine signaling-3 and protein-tyrosine phosphatase-1B reveals additive, synergistic, and factor-specific roles in the regulation of body energy balance. Diabetes 2010. doi:10.2337/db10-0481.

Broberger C, Schalling M, Johansson C. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. Proc Natl Acad Sci 2002;95:15043–8. doi:10.1073/pnas.95.25.15043.

Brown RSE, Herbison AE, Grattan DR. Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. J Neuroendocrinol 2014;26:898–908.

Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. Reproduction 2010;140:399–410. doi:10.1530/REP-10-0119.

Cali AMG, Caprio S. Obesity in children and adolescents. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:S31–6.

Caligioni C. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. Curr Protoc Neurosci 2009;APPENDIX:Appendix-4I. doi:10.1002/0471142301.nsa04is48.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science (80-) 1995. doi:10.1126/science.7624778.

Cannady WE, Brann DW, Mahesh VB. The potential role of periovarian fat and leptin in

initiation of puberty in the immature rat. Int J Obes 2000. doi:10.1038/sj.ijo.0801307.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J Comp Neurol 1994;348:41–79. doi:10.1002/cne.903480103.

Caron E, Ciofi P, Prevot V, Bouret SG. Alteration in Neonatal Nutrition Causes Perturbations in Hypothalamic Neural Circuits Controlling Reproductive Function. J Neurosci 2012;32:11486–94. doi:10.1523/jneurosci.6074-11.2012.

Castellano JM, Bentsen a H, Romero M, Pineda R, Ruiz-Pino F, Garcia-Galiano D, et al. Acute inflammation reduces kisspeptin immunoreactivity at the arcuate nucleus and decreases responsiveness to kisspeptin independently of its anorectic effects. Am J Physiol Metab 2010;299:E54–61. doi:10.1152/ajpendo.00081.2010.

Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in Hypothalamic KiSS-1 System and Restoration of Pubertal Activation of the Reproductive Axis by Kisspeptin in Undernutrition. Endocrinology 2005;146:3917–25. doi:10.1210/en.2005-0337.

Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Roa J, Vigo E, Pineda R, et al. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. Diabetes 2006;55:2602–10. doi:10.2337/db05-1584.

Castro-González D, Fuente-Martín E, Sánchez-Garrido MA, Argente-Arizón P, Tena-Sempere M, Barrios V, et al. Increased prepubertal body weight enhances leptin sensitivity in proopiomelanocortin and neuropeptide Y neurons before puberty onset in female rats. Endocrinology 2015;156:1272–82. doi:10.1210/en.2014-1759.

Cavalcante JC, Bittencourt JC, Elias CF. Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. Physiol Behav 2006. doi:10.1016/j.physbeh.2006.03.032.

Chabod F, Goirand F, Rochette L, Guilland J-C, Sediki M, Vergely C, et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. Biochimie 2011;94:117–24. doi:10.1016/j.biochi.2011.09.023.

Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. J Clin Invest 2003;111:1409–21. doi:10.1172/JCI200317490.

Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. Science (80-) 1997;275:88–90.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 1996. doi:10.1016/S0092-8674(00)81294-5.

Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. Endocrinology 1997. doi:10.1210/endo.138.10.5570.

Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone

(GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized EWES. Endocrinology 1982. doi:10.1210/endo-111-5-1737.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. J Neurosci 2008;28:8691–7.

Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 2006;147:5817–25. doi:10.1210/en.2006-0787.

Coppari R, Bjørbæk C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. Nat Rev Drug Discov 2012;11:692–708. doi:10.1038/nrd3757.

Cravo RM, Frazao R, Perello M, Osborne-Lawrence S, Williams KW, Zigman JM, et al. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. PLoS One 2013;8:e58698. doi:10.1371/journal.pone.0058698.

Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J, Atkin S, Bookout AL, et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. Neuroscience 2011;173:37–56.

Darwin C. On the Origin of the Species, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life). 1859. doi:10.1016/S0262-4079(09)60380-8.

Dauber A, Cunha-Silva M, MacEdo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally Inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab 2017;102:1557–67. doi:10.1210/jc.2016-3677.

Day FR, Elks CE, Murray A, Ong KK, Perry JRB. Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. Sci Rep 2015;5:11208. doi:10.1038/srep11208.

Declercq J, Brouwers B, Pruniau VPEG, Stijnen P, De Faudeur G, Tuand K, et al. Metabolic and behavioural phenotypes in Nestin-Cre mice are caused by hypothalamic expression of human growth hormone. PLoS One 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0135502.

Devos R, Guisez Y, Van Der Heyden J, White DW, Kalai M, Fountoulakis M, et al. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. J Biol Chem 1997. doi:10.1074/jbc.272.29.18304.

Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson LE, Knobil E. Circhoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. Endocrinology 1970. doi:10.1210/endo-87-5-850.

Döhler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Sickmöller PM, et al. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats[1]. Neuroendocrinology 1986. doi:10.1159/000124484.

Donato J, Cravo RM, Frazão R, Elias CF. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. Neuroendocrinology 2011;93:9–18. doi:10.1159/000322472.

Donato J, Cravo RM, Frazão R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. J Clin Invest 2011;121:355–68. doi:10.1172/JCI45106.

Donato J, Elias CF. The ventral premammillary nucleus links metabolic cues and reproduction. Front Endocrinol (Lausanne) 2011. doi:10.3389/fendo.2011.00057.

Donato J, Frazão R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. Arq Bras Endocrinol Metabol 2010a;54:591–602. doi:10.1590/S0004-27302010000700002.

Donato J, Frazão R, Fukuda M, Vianna CR, Elias CF. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. Endocrinology 2010b;151:5415–27. doi:10.1210/en.2010-0651.

Donato J, Lee C, Ratra D V., Franci CR, Canteras NS, Elias CF. Lesions of the ventral premammillary nucleus disrupt the dynamic changes in Kiss1 and GnRH expression characteristic of the proestrus-estrus transition. Neuroscience 2013;241:67–79. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.013.

Donato J, Silva RJ, Sita L V, Lee S, Lee C, Lacchini S, et al. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. J Neurosci 2009;29:5240–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.0405-09.2009.

Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. Horm Metab Res 1994;26:213–21. doi:10.1055/s-2007-1001668.

Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, et al. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. J Comp Neurol 2000;423:261–81. doi:10.1002/1096-9861(20000724)423:2<261::AID-CNE6>3.0.CO;2-6.

Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. Proc Natl Acad Sci 1998. doi:10.1073/pnas.95.2.741.

Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, Flier JS, Saper CB. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. Endocrinology 1997. doi:10.1210/endo.138.2.5033.

Elmquist JK, Bjørbæk C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. J Comp Neurol 1998. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980615)395:4<535::AID-CNE9>3.0.CO;2-2.

Frazão R, Cravo RM, Donato J, Ratra D V, Clegg DJ, Elmquist JK, et al. Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor α. J Neurosci 2013;33:2807–20. doi:10.1523/JNEUROSCI.1610-12.2013.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. Nat Med 1995;1:1311–4. doi:10.1038/nm1295-1311.

Friedman JM, Leibel RL. Tackling a weighty problem. Cell 1992;69:217–20.

doi:10.1016/0092-8674(92)90402-X.

Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. Science (80-) 1974;185:949–51. doi:10.1126/science.185.4155.949.

Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem Biophys Res Commun 2003;312:1357–63.

Galichet C, Lovell-Badge R, Rizzoti K. Nestin-Cre Mice Are Affected by Hypopituitarism, Which Is Not Due to Significant Activity of the Transgene in the Pituitary Gland. PLoS One 2010;5:e11443. doi:10.1371/journal.pone.0011443.

Gavela-Pérez T, Navarro P, Soriano-Guillén L, Garcés C. High Prepubertal Leptin Levels Are Associated With Earlier Menarcheal Age. J Adolesc Heal 2016;59:177–81. doi:10.1016/j.jadohealth.2016.03.042.

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. Proc Natl Acad Sci 1996;93:6231–5. doi:10.1073/pnas.93.13.6231.

Gill JC, Navarro VM, Kwong C, Noel SD, Martin C, Xu S, et al. 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 2012;153:4883–93. doi:10.1210/en.2012-1529.

Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:8173–7. doi:10.1073/pnas.0611514104.

Golub MS, Collman GW, Foster PMD, Kimmel CA, Rajpert-De Meyts E, Reiter EO, et al. Public health implications of altered puberty timing. Pediatrics 2008;121 Suppl:S218–30. doi:10.1542/peds.2007-1813G.

Griffiths LJ, Wolke D, Page AS, Horwood JP. Obesity and bullying: different effects for boys and girls. Arch Dis Child 2006;91:121–5.

Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. J Nutr 2013;143:553–62. doi:10.3945/jn.112.172825.

Hagan MM, Rushing PA, Schwartz MW, Yagaloff KA, Burn P, Woods SC, et al. Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. J Neurosci 1999.

Håkansson ML, Hulting AL, Meister B. Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus--relationship with NPY neurones. Neuroreport 1996;7:3087—3092.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science (80-) 1995. doi:10.1126/science.7624777.

Han S-KK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J Neurosci 2005;25:11349–56. doi:10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005.

Hauge-Evans AC, Richardson CC, Milne HM, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. A role for kisspeptin in islet function. Diabetologia 2006;49:2131–5. doi:10.1007/s00125-006-0343-z.

Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL. Sympathetic and Cardiorenal Actions of Leptin. Hypertension 1997;30:619–23. doi:10.1161/01.hyp.30.3.619.

Heidel E, Plagemann A, Davidowa H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. Neuroreport 1999. doi:10.1097/00001756-199906230-00005.

Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. Nat Rev Endocrinol 2016;12:452–66.

Hillman JB, Huang B, Pinney SM, Biro FM. Early Pubertal Development and Insulin Sensitivity among School-Aged Girls: Mediation Via Adiposity. J Pediatr Adolesc Gynecol 2013;26:47–50. doi:10.1016/j.jpag.2012.09.007.

Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. Trends Endocrinol Metab 2006. doi:10.1016/j.tem.2006.09.007.

Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, et al. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. Endocrinology 2000;141:3506–9.

Hwa JJ, Ghibaudi L, Compton D, Fawzi AB, Strader CD, Hwa JJ, et al. Intracerebroventricular Injection of Leptin Increases Thermogenesis and Mobilizes Fat Metabolism in ob/ob Mice. Horm Metab Res 2008;28:659–63. doi:10.1055/s-2007-979873.

Intlekofer KA, Petersen SL. Distribution of mRNAs encoding classical progestin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progestin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. Neuroscience 2011. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.051.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido B V, Popa SM, Cunningham MJ, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinology 2004;80:264–72. doi:10.1159/000083140.

Janssen I, Craig WM, Boyce WF, Pickett W. Associations between overweight and obesity with bullying behaviors in school-aged children. Pediatrics 2004;113:1187–94. doi:10.1001/jama.288.14.1728.

Kaplowitz PB, Slora EJ, Wasserman RC, Pedlow SE, Herman-Giddens ME. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. Pediatrics 2001. doi:10.1542/peds.108.2.347.

Kennedy GC. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. J Endocrinol 1957;16:9–17. doi:10.1677/joe.0.0160009.

Kim JS, Rizwan MZ, Clegg DJ, Anderson GM. Leptin signaling is not required for anorexigenic estradiol effects in female mice. Endocrinology 2016. doi:10.1210/en.2015-1594.

Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. Endocrinology 2011. doi:10.1210/en.2010-0668.

Kos CH. Methods in Nutrition Science: Cre/loxP System for Generating Tissue-specific Knockout Mouse Models. Nutr Rev 2004;62:243–6. doi:10.1111/j.1753-4887.2004.tb00046.x.

Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J Biol Chem 2001;276:34631–6. doi:10.1074/jbc.M104847200.

Kubo A, Ferrara A, Laurent CA, Windham GC, Greenspan LC, Deardorff J, et al. Associations Between Maternal Pregravid Obesity and Gestational Diabetes and the Timing of Pubarche in Daughters 2016. doi:10.1093/aje/kww006.

Lakshman R, Forouhi N, Luben R, Bingham S, Khaw K, Wareham N, et al. Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: Results from the EPIC-Norfolk cohort study. Diabetologia 2008;51:781–6. doi:10.1007/s00125-008-0948-5.

Lee J-H, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. JNCI J Natl Cancer Inst 1996;88:1731–7.

Lehman MN, Coolen LM, Steiner RA, Neal-Perry G, Wang L, Moenter SM, et al. The 3rd World Conference on Kisspeptin, “Kisspeptin 2017: Brain and Beyond”: Unresolved questions, challenges and future directions for the field. J Neuroendocrinol 2018;30:e12600. doi:10.1111/jne.12600.

Leshan RL, Louis GW, Jo Y-H, Rhodes CJ, Münzberg H, Myers MG. Direct innervation of GnRH neurons by metabolic- & sexual odorant-sensing leptin receptor neurons in the hypothalamic ventral premammillary nucleus. J Neurosci 2009;29:3138–47. doi:10.1523/JNEUROSCI.0155-09.2009.

Lie MEK, Overgaard A, Mikkelsen JD. Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats. Reprod Biol 2013. doi:10.1016/j.repbio.2013.08.001.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402–8.

Luque RM, Kineman RD, 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 2007. doi:10.1210/en.2007-0500.

Madej T, Boguski MS, Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. FEBS Lett 1995. doi:10.1016/0014-5793(95)00977-H.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human

and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1995;1:1155–61. doi:10.1038/nm1195-1155.

Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng F-J, Stuart CT, Bazan NG, et al. Opposing Crosstalk between Leptin and Glucocorticoids Rapidly Modulates Synaptic Excitation via Endocannabinoid Release. J Neurosci 2006;26:6643–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.5126-05.2006.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Brazilian J Biol 2002;62:609–14. doi:10.1590/S1519-69842002000400008.

Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, Badenhop NE, Goel P, Clairmont A, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3239–45. doi:10.1210/jc.82.10.3239.

Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally A V. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem Biophys Res Commun 1971. doi:10.1016/S0006-291X(71)80019-0.

Mayer C, Boehm U. Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. Nat Neurosci 2011;14:704–10. doi:10.1038/nn.2818.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Bruce Lawrence C, Hannah LT, Morgan PJ, et al. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol 1996a. doi:10.1046/j.1365-2826.1996.05161.x.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett 1996b. doi:10.1016/0014-5793(96)00473-5.

Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:1761–6. doi:10.1073/pnas.0409330102.

Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs C V. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. Diabetes 1998. doi:10.2337/diab.47.2.294.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 1997;387:903–8. doi:10.1038/43185.

Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. Nat Med 2004;10:739–43. doi:10.1038/nm1071.

Nakashima K, Narazaki M, Taga T. Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130. FEBS Lett 1997. doi:10.1016/S0014-5793(97)00013-6.

Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. J Physiol 2004;561:379–86. doi:10.1113/jphysiol.2004.072298.

Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Kisspeptin/Dynorphin/Neurokinin B Neurons in the Arcuate Nucleus of the Mouse. J Neurosci 2009. doi:10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009.

Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, Garcia-Galiano D, Hobbs SJ, Manfredi-Lozano M, et al. Role of Neurokinin B in the Control of Female Puberty and Its Modulation by Metabolic Status. vol. 32. 2012. doi:10.1523/JNEUROSCI.4288-11.2012.

Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. Nat Rev Endocrinol 2012;8:40–53. doi:10.1038/nrendo.2011.147.

Neill JD, Arraztoa JA, Atkinson DE, Bagby SP, Bathgate RAD, Benson GS, et al. Knobil And Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. St. Louis, USA; San Diego, USA; London, UK: Elsevier; 2006.

Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, Finch CE. Altered Profiles of Estradiol and Progesterone Associated with Prolonged Estrous Cycles and Persistent Vaginal Cornification in Aging C578L/6J Mice1. Biol Reprod 1981. doi:10.1095/biolreprod24.4.784.

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I. Cycle Frequency, Length and Vaginal Cytology1. Biol Reprod 1982. doi:10.1095/biolreprod27.2.327.

Nelson JF, Karelus K, Felicio LS, Johnson TE. Genetic influences on the timing of puberty in mice. Biol Reprod 1990;42:649–55. doi:10.1095/biolreprod42.4.649.

Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: A key mediator of insulin-induced anorexia. Diabetes 2003. doi:10.2337/diabetes.52.2.227.

Novelle MG, Vázquez MJ, Peinado JR, Martinello KD, López M, Luckman SM, et al. Sequential Exposure to Obesogenic Factors in Females Rats: From Physiological Changes to Lipid Metabolism in Liver and Mesenteric Adipose Tissue. Sci Rep 2017;7:46194. doi:10.1038/srep46194.

Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG, Fryar CD, Kruszon-Moran D, Kit BK, et al. Trends in obesity prevalence among children and adolescents in the United States, 1988-1994 through 2013-2014. JAMA - J Am Med Assoc 2016. doi:10.1001/jama.2016.6361.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature 2001;411:613–7. doi:10.1038/35079135.

Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A, Kaidar G, Matagne V, Sandau US, et al. Gene Networks and the Neuroendocrine Regulation of Puberty. Mol Cell Endocrinol 2010;324:3–11. doi:10.1016/j.mce.2009.12.003.

Ojeda SR, Lomniczi A. Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. Nat Rev Endocrinol 2014;10:67–9.

Paredes RG, Tzschentke T, Nakach N. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. Brain Res 1998. doi:10.1016/S0006-8993(98)00914-7.

Parent A-S, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon J-P. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. Endocr Rev 2003;24:668–93.

Parkening TA, Collins TJ, Smith ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and Prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. Neurobiol Aging 1982;3:31–5. doi:10.1016/0197-4580(82)90058-6.

Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. Amsterdam : Elsevier; 2007.

Pedroso JAB, Buonfiglio DC, Cardinali LI, Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Tirapegui J, et al. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. Mol Metab 2014;3:608–18. doi:10.1016/j.molmet.2014.06.001.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science (80-) 1995. doi:10.1126/science.7624776.

Petridou E, Syrigou E, Toupadaki N, Zavitsanos X, Willett W, Trichopoulos D. Determinants of age at menarche as early life predictors of breast cancer risk. Int J Cancer 1996;68:193–8. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19961009)68:2<193::AID-IJC9>3.0.CO;2-T.

Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. Brain Res 1999. doi:10.1016/S0006-8993(99)01662-5.

Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. J Neuroendocrinol 1999;11:541–6. doi:10.1046/j.1365-2826.1999.00357.x.

Plagemann A, Rake A, Melchior K, Dörner G. Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. Brain Res 2002;818:160–3. doi:10.1016/s0006-8993(98)01264-5.

Plant TM. The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. J Endocrinol 2015;226:T41–54. doi:10.1530/JOE-15-0113.

Quennell JH, Anderson GM, Mulligan AC, Tups A, Grattan DR. Leptin Indirectly Regulates Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Function. Endocrinology 2009;150:2805–12. doi:10.1210/en.2008-1693.

Ramos-Lobo AM, Donato J. The role of leptin in health and disease. Temperature 2017.

doi:10.1080/23328940.2017.1327003.

Ramos-Lobo AM, Teixeira PDS, Furigo IC, Donato J. SOCS3 ablation in SF1 cells causes modest metabolic effects during pregnancy and lactation. Neuroscience 2017. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.09.048.

Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2ˆ(–delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath 2013;3:71–85.

Ratra D V., Elias CF. Chemical identity of hypothalamic neurons engaged by leptin in reproductive control. J Chem Neuroanat 2014;61–62:233–8. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.05.005.

De Ridder CM, Bruning PF, Zonderland ML, Thijssen JHH, Bonfrer JMG, Blankenstein MA, et al. Body fat mass, body fat distribution, and plasma hormones in early puberty in females. J Clin Endocrinol Metab 1990. doi:10.1210/jcem-70-4-888.

Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MCF, Trevenzoli IH, da Conceição EPS, Bonono IT, et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. J Nutr Biochem 2011. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.11.013.

Roselli CE. Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. Endocrinology 1991. doi:10.1210/endo-128-3-1310.

de Roux N, Genin E, Carel J-CC, Matsuda F, Chaussain J-LL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:10972–6. doi:10.1073/pnas.1834399100.

Safranski T, Lamberso WR, Keisler DH. Correlations among Three Measures of Puberty in Mice and Relationships with Estradiol Concentration and Ovulation1. Biol Reprod 2005. doi:10.1095/biolreprod48.3.669.

Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Garcia-Galiano D, Manfredi-Lozano M, Leon S, et al. Metabolic programming of puberty: Sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. Endocrinology 2013;154:3387–400. doi:10.1210/en.2012-2157.

Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tumer N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. Am J Physiol Metab 2017;273:E226–30. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.1.e226.

Schally A V, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormones. Science (80-) 1971;173:1036 LP-1038.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem 2000;285:194–204.

Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. Mol Brain Res 1989. doi:10.1016/0169-328X(89)90076-4.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. J Clin Invest 1996. doi:10.1172/JCI118891.

Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, et al. Leptin targets in the mouse brain. J Comp Neurol 2009;514:518–32. doi:10.1002/cne.22025.

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr. JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003;349:1614–27. doi:10.1056/NEJMoa035322.

Silveira MA, Furigo IC, Zampieri TT, Bohlen TM, de Paula DG, Franci CR, et al. STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty. Mol Cell Endocrinol 2017;448:55–65. doi:10.1016/j.mce.2017.03.024.

Silveira MA, Zampieri TT, Furigo IC, Abdulkader F, Donato J, Frazão R. Acute effects of somatomammotropin hormones on neuronal components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Brain Res 2019.

Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE. Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. J Comp Neurol 1999;411:346–58.

Sjoeholm A, Bridges RS, Grattan DR, Anderson GM. Region-, neuron-, and signaling pathway-specific increases in prolactin responsiveness in reproductively experienced female rats. Endocrinology 2011. doi:10.1210/en.2010-1220.

Skinner DC, Caraty A, Allingham R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: No colocalization with gonadotropin-releasing neurons. Endocrinology 2001. doi:10.1210/endo.142.2.7956.

Smith JT, Acohido B V., Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. J Neuroendocrinol 2006;18:298–303. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x.

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. Endocrinology 2005a;146:3686–92. doi:10.1210/en.2005-0488.

Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology 2005b;146:2976–84. doi:10.1210/en.2005-0323.

Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. J Neurosci 2006;26:6687–94. doi:10.1523/JNEUROSCI.1618-06.2006.

Speiser PW, Rudolf MCJ, Anhalt H, Camacho-Hubner C, Chiarelli F, Eliakim A, et al. Consensus statement: Childhood obesity. J Clin Endocrinol Metab 2005. doi:10.1210/jc.2004-1389.

Stephens SBZ, Tolson KP, Rouse ML, Poling MC, Hashimoto-Partyka MK, Mellon PL, et al. Absent progesterone signaling in kisspeptin neurons disrupts the LH surge and impairs fertility

in female mice. Endocrinology 2015;156. doi:10.1210/en.2015-1300.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. Nature 1995;377:530–2. doi:10.1038/377530a0.

Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem 1997. doi:10.1074/jbc.272.10.6093.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 1995. doi:10.1016/0092-8674(95)90151-5.

Teles MG, Bianco SDC, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med 2008;358:709–15. doi:10.1056/NEJMoa073443.

Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. Endocrinology 1997;138:5063–6. doi:10.1210/endo.138.11.5651.

Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. Nat Genet 2009. doi:10.1038/ng.306.

Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive traci during the natural estrous cycle: Correlation with circulating estradiol and progesterone. Endocrinology 1992. doi:10.1210/endo.131.3.1505477.

Walvoord EC. The timing of puberty: Is it changing? Does it matter? J Adolesc Heal 2010;47:433–9. doi:10.1016/j.jadohealth.2010.05.018.

Wang J, Akabayashi A, Yu HJ, Dourmashkin J, Alexander JT, Silva I, et al. Hypothalamic galanin: Control by signals of fat metabolism. Brain Res 1998. doi:10.1016/S0006-8993(98)00632-5.

Wattigney WA, Srinivasan SR, Chen W, Greenlund KJ, Berenson GS. Secular trend of earlier onset of menarche with increasing obesity in black and white girls: The bogalusa heart study. Ethn Dis 1999;9:181–9.

Watts AG. The structure of the neuroendocrine hypothalamus: The neuroanatomical legacy of Geoffrey Harris. J Endocrinol 2015. doi:10.1530/JOE-15-0157.

Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, et al. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. Obstet Gynecol Surv 2005;60:104–5. doi:10.1097/01.ogx.0000151645.22134.0b.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. Anal Biochem 1999;270:41–9. doi:10.1006/abio.1999.4085.

World Health Organisation. Report of the Commission on Ending Childhood Obesity. World Heal Organ 2016. doi:ISBN 978 92 4 151006 6.

World Health Organization. Childhood overweight and obesity n.d. https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/ (accessed February 5, 2019).

World Health Organization - WHO. Fiscal policies for diet and the prevention of noncommunicable diseases. 2015. doi:10.1007/s10459-017-9754-5.

Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. Proc Natl Acad Sci 1989. doi:10.1073/pnas.86.20.8132.

Wu Z, Elena Martinez M, Germain DLS, Hernandez A. Type 3 deiodinase role on central thyroid hormone action affects the leptin-melanocortin system and circadian activity. Endocrinology 2017;158:419–30. doi:10.1210/en.2016-1680.

Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. Nat Immunol 2003;4:551. doi:10.1038/ni938.

Yener T, Turkkani Tunc A, Aslan H, Aytan H, Cantug Caliskan A. Determination of Oestrous Cycle of the Rats by Direct Examination: How Reliable? Anat Histol Embryol 2007;36:75–7. doi:10.1111/j.1439-0264.2006.00743.x.

Yoon CH. HOMEOSTASIS ASSOCIATED WITH HETEROZYGOSITY IN THE GENETICS OF TIME OF VAGINAL OPENING IN THE HOUSE MOUSE. Genetics 1955;40:297 LP-309.

Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Furigo IC, Pedroso JAB, Buonfiglio DC, Donato J. SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. Mol Metab 2015;4:237–45. doi:10.1016/j.molmet.2014.12.005.

Zhang XY, Zhang Q, Wang DH. Litter size variation in hypothalamic gene expression determines adult metabolic phenotype in brandt's voles (lasiopodomys brandtii). PLoS One 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0019913.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994. doi:10.1038/372425a0.

Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. Am J Physiol Metab 2017;279:E838–45. doi:10.1152/ajpendo.2000.279.4.e838.

ANEXO A

Molecular and Cellular Endocrinology xxx (2016) 1–11

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice

Tabata M. Bohlen [a, 1], Marina A. Silveira [a, 1], Thais T. Zampieri [b, 1], Renata Frazão [a, 2], Jose Donato Jr. [b, *, 2]

[a] Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
[b] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 May 2015
Received in revised form
30 December 2015
Accepted 30 December 2015
Available online xxx

Keywords:
Obesity
SOCS3
Leptin resistance
Precocious puberty
Reproduction

ABSTRACT

Leptin is a permissive factor for the onset of puberty. However, changes in adiposity frequently influence leptin sensitivity. Thus, the objective of the present study was to investigate how changes in body weight, fatness, leptin levels and leptin sensitivity interact to control the timing of puberty in female mice. Pre-pubertal obesity, induced by raising C57 BL/6 mice in small litters, led to an early puberty onset. Inactivation of *Socs3* gene in the brain or exclusively in leptin receptor-expressing cells reduced the body weight and leptin levels at pubertal onset, and increased leptin sensitivity. Notably, these female mice exhibited significant delays in vaginal opening, first estrus and onset of estrus cyclicity. In conclusion, our findings suggest that increased leptin sensitivity did not play an important role in favoring pubertal onset in female mice. Rather, changes in pubertal body weight, fatness and/or leptin levels were more important in influencing the timing of puberty.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The onset of puberty is a complex phenomenon that is controlled by genetic, environmental and endogenous factors. There is some evidence suggesting that puberty in girls is occurring earlier than in past decades (Biro et al., 2010, 2012; Wattigney et al., 1999). Precocious puberty potentially leads to negative health consequences because it increases the incidence of polycystic ovary syndrome, diabetes and breast cancer in adulthood, as well as behavior disorders during adolescence (Franceschi et al., 2010; Golub et al., 2008; Lakshman et al., 2008; Petridou et al., 1996; Walvoord, 2010). However, the possible causes of this shift remain elusive. The role of genetics have been studied in conditions that cause precocious puberty (Abreu et al., 2013; Bulcao Macedo et al., 2014; Silveira et al., 2010; Teles et al., 2008) or hypogonadism (de Roux et al., 2003; Lofrano-Porto et al., 2007; Seminara et al., 2003). Among possible environmental factors that may affect pubertal timing, considerable attention has been given to the effects of endocrine disrupting chemicals such as bisphenol A (Bourguignon et al., 2010; Fisher and Eugster, 2014). These compounds may mimic or interfere with endocrine systems, affecting the timing of sexual maturation (Bellingham et al., 2009; Biro et al., 2012; Mouritsen et al., 2010; Walvoord, 2010). Psychological factors such as stress may also interfere with the timing of puberty as environmental variables (Walvoord, 2010).

Adiposity and nutritional status are well-known endogenous factors that affect the timing of sexual maturation (Dunger et al., 2006; Frisch and McArthur, 1974; Kaplowitz et al., 2001; Martos-Moreno et al., 2010; Roa and Tena-Sempere, 2014; Sanchez-Garrido et al., 2013). A minimum body fat threshold seems to be necessary to initiate puberty (Frisch and McArthur, 1974). Leptin is an important link between nutritional status and puberty because this hormone is secreted in proportion to adiposity and conveys the status of body energy reserves to the brain (Ahima et al., 1996; Considine et al., 1996; Donato et al., 2011a; Frederich et al., 1995; Maffei et al., 1995). Leptin deficiency caused either by monogenic mutations or excessive leanness leads to hypogonadotropic

Abbreviations: AgRP, agouti-related peptide; CART, cocaine and amphetamine regulated transcript; ERα, estrogen receptor α; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; LepR, leptin receptor; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NPY, neuropeptide Y; POMC, proopiomelanocortin; RP, retroperitoneal; SOCS3, suppressor of cytokine signaling-3.

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil.
E-mail address: jdonato@ich.usp.br (J. Donato).

[1] These authors contributed equally to this study as co-first authors.
[2] Co-senior authors.

http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.022
0303-7207/0 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Bohlen, T.M., et al., Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice, Molecular and Cellular Endocrinology (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.022

ANEXO B

frontiers in Endocrinology

ORIGINAL RESEARCH
published: 20 February 2018
doi: 10.3389/fendo.2018.00044

A Short-Day Photoperiod Delays the Timing of Puberty in Female Mice *via* Changes in the Kisspeptin System

*Tabata Mariz Bohlen[1], Marina Augusto Silveira[1], Daniella do Carmo Buonfiglio[2], Hildebrando Candido Ferreira-Neto[3], José Cipolla-Neto[2], Jose Donato Jr.[2] and Renata Frazao[1]**

[1] Department of Anatomy, Instituto of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, [2] Department of Physiology and Biophysics, Instituto of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, [3] Department of Physiology, Augusta University, Augusta, GA, United States

The reproduction of seasonal breeders is modulated by exposure to light in an interval of 24 h defined as photoperiod. The interruption of reproductive functions in seasonally breeding rodents is accompanied by the suppression of the *Kiss1* gene expression, which is known to be essential for reproduction. In non-seasonal male rodents, such as rats and mice, short-day photoperiod (SP) conditions or exogenous melatonin treatment also have anti-gonadotropic effects; however, whether photoperiod is able to modulate the puberty onset or *Kiss1* gene expression in mice is unknown. In the present study, we investigated whether photoperiodism influences the sexual maturation of female mice *via* changes in the kisspeptin system. We observed that SP condition delayed the timing of puberty in female mice, decreased the hypothalamic expression of genes related to the reproductive axis and reduced the number of *Kiss1*-expressing neurons in the rostral hypothalamus. However, SP also reduced the body weight gain during development and affected the expression of neuropeptides involved in the energy balance regulation. When body weight was recovered *via* a reduction in litter size, the timing of puberty in mice born and raised in SP was advanced and the effects in hypothalamic mRNA expression were reverted. These results suggest that the SP delays the timing of puberty in female mice *via* changes in the kisspeptin system, although the effects on hypothalamic–pituitary–gonadal axis are likely secondary to changes in body weight gain.

Keywords: puberty onset, *Kiss1*, photoperiod, melatonin, energy balance

OPEN ACCESS

Edited by:
Sarah J. Spencer,
RMIT University, Australia

Reviewed by:
Tamas Kozicz,
Radboud University Nijmegen, Netherlands
Chris Scott,
Charles Sturt University, Australia

****Correspondence:***
Renata Frazao
rfrazao@usp.br

Specialty section:
This article was submitted to Neuroendocrine Science, a section of the journal Frontiers in Endocrinology

Received: *10 November 2017*
Accepted: *02 February 2018*
Published: *20 February 2018*

Citation:
Bohlen TM, Silveira MA, Buonfiglio DC, Ferreira-Neto HC, Cipolla-Neto J, Donato J Jr. and Frazao R (2018) A Short-Day Photoperiod Delays the Timing of Puberty in Female Mice via Changes in the Kisspeptin System. Front. Endocrinol. 9:44. doi: 10.3389/fendo.2018.00044

INTRODUCTION

Photoperiod duration is one of the most potent environmental cues responsible for synchronizing daily variations in mammalian physiology, including factors that control the reproductive system. The mechanism by which the light/dark cycle synchronizes biological functions in mammals relies on the suprachiasmatic nuclei (SCN), which are considered the master clock that coordinates daily rhythms. SCN neurons receive information about the light/dark cycle *via* the retino-hypothalamic tract (1, 2). The lack of circadian rhythms, as induced by SCN ablation, or free-running rhythms, as induced by constant light, leads to reproductive deficits as demonstrated by impairment of ovulation, disruption of the estrous cycle and LH surge (3–5). Melatonin is the principal hormone produced by the pineal gland; its secretion is modulated by photoperiod duration, depends upon input from the

ANEXO C

Molecular and Cellular Endocrinology 448 (2017) 55–65

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty

Marina Augusto Silveira [a], Isadora C. Furigo [b], Thais T. Zampieri [a], Tabata M. Bohlen [a], Daniella G. de Paula [a], Celso Rodrigues Franci [c], Jose Donato Jr. [b], Renata Frazao [a,*]

[a] Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
[b] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
[c] Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 October 2016
Received in revised form
3 March 2017
Accepted 22 March 2017
Available online 23 March 2017

Keywords:
Prolactin
Kiss1
Sexual maturation
HPG axis
Hypothalamus
Whole-cell patch-clamp

ABSTRACT

Previous studies have shown that kisspeptin neurons are important mediators of prolactin's effects on reproduction. However, the cellular mechanisms recruited by prolactin to affect kisspeptin neurons remain unknown. Using whole-cell patch-clamp recordings of brain slices from kisspeptin reporter mice, we observed that 20% of kisspeptin neurons in the anteroventral periventricular nucleus was indirectly depolarized by prolactin via an unknown population of prolactin responsive neurons. This effect required the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. No effects on the activity of arcuate kisspeptin neurons were observed, despite a high percentage (70%) of arcuate neurons expressing prolactin-induced STAT5 phosphorylation. To determine whether STAT5 expression in kisspeptin cells regulates reproduction, mice carrying *Stat5a/b* inactivation specifically in kisspeptin cells were generated. These mutants exhibited an early onset of estrous cyclicity, indicating that STAT5 transcription factors exert an inhibitory effect on the timing of puberty.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cytokines play a pivotal role in reproduction by regulating the hypothalamus-pituitary-gonad (HPG) axis. For example, leptin signaling in the hypothalamus is required for the onset of puberty, as well as to maintain reproduction (Ahima et al., 1996; Donato et al., 2011a, 2011b). Leptin and several other cytokines possess receptors that depend on an association with the Janus kinase 2 (JAK2) to induce the transduction of their intracellular effects. This class of cytokine receptors recruits transcription factors from the family of signal transducer and activator of transcription (STAT), as well as signaling pathways that can induce rapid non-genomic effects, such as the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. Thus, the recruitment of STAT proteins controls the transcription of target genes, whereas the activation of the PI3K signaling pathway may mediate acute changes in neuronal electrical activity (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000; Furigo et al., 2016).

One particular cytokine that has interesting effects on the reproductive system is prolactin. Hyperprolactinemia causes reproductive dysfunctions, representing a frequent cause of infertility in both males and females (Glezer and Bronstein, 2015; Newey et al., 2013; Shibli-Rahhal and Schlechte, 2011; Vilar et al., 2014). Several studies have reported that prolactin may modulate the reproductive axis through its actions on the neurons expressing the *Kiss1* gene (Araujo-Lopes et al., 2014; Brown et al., 2014; Sjoeholm et al., 2011). The *Kiss1* gene encodes neuropeptides known as kisspeptins, which play a critical role in reproduction (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). In rodents, neurons expressing the *Kiss1* gene, denoted here as kisspeptin neurons, are mainly located in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), the rostral periventricular nucleus (PeN) and the arcuate nucleus (ARH) of the hypothalamus (Gottsch et al., 2004).

Abbreviations: 3V, third ventricle; APs, Action potentials; AP-5, 2-amino-5-phosphonovalerate; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; AVPV, anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; FSH, follicle-stimulating hormone; GABA, γ-aminobutyric acid; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; HPG, hypothalamic-pituitary-gonadal; hrGFP, humanized Renilla green fluorescent protein; IR, input resistance; JAK2, Janus kinase 2; KPBS, 0.02 M potassium PBS; LH, luteinizing hormone; MPA, medial preoptic area; PBS, phosphate-buffered saline; PeN, rostral periventricular nucleus of the hypothalamus; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PRLRs, prolactin receptors; pSTAT5, phosphorylated form of signal transducer and activator of transcription-5; pSTAT5-ir, pSTAT5 immunoreactivity; RMP, resting membrane potential; STAT, signal transducer and activator of transcription; TIDA neurons, tuberoinfundibular dopamine neurons; TTX, tetrodotoxin.

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo 05508-000, Brazil.
E-mail address: rfrazao@usp.br (R. Frazao).

http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.024
0303-7207/o 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO D

Neuroscience Letters 681 (2018) 12–16

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Conspecific odor exposure predominantly activates non-kisspeptin cells in the medial nucleus of the amygdala

Leandro Bueno Lima[a,1], Fernanda Tais Haubenthal[b,1], Marina Augusto Silveira[b], Tabata Mariz Bohlen[b], Martin Metzger[a], Jose Donato Jr.[a], Renata Frazao[b,*]

[a] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
[b] Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Kisspeptin
Amygdala
Pheromone
Fos
Steroid receptors

ABSTRACT

A small neuronal subpopulation in the medial nucleus of the amygdala (MeA), expressing the *Kiss1* gene, is now considered an important mediator that integrates socio-sexual behavior and odor information in order to modulate the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) axis. Previous studies demonstrated that exogenous kisspeptin administration or selective activation of *Kiss1*-expressing neurons in the MeA modulates the onset of puberty, LH secretion and sexual behavior. These functions are supported by the known MeA neuronal connections. In the MeA, as well as in the hypothalamus, *Kiss1* mRNA expression mostly depends on sex steroids levels. However, the percentage of *Kiss1*-expressing cells that co-express estrogen receptor α (ERα) in the MeA is currently unknown. Additionally, whether MeA kisspeptin neurons show Fos expression due to pheromone exposure is still undisclosed. In the present study, we used adult male and female mice that express a reporter protein under the *Kiss1* promoters to determine the percentage of *Kiss1*-expressing neurons that co-express the ERα in the MeA and, whether those cells are activated by olfactory cues. We found a high percentage of *Kiss1*-expressing neurons in the MeA co-expressing the ERα. The proportion of co-expression was similar between male and female mice in diestrus. Interestingly, a low percentage of *Kiss1*-expressing neurons in the MeA co-express Fos after conspecific odor exposure, despite a significant increase of Fos positive cells in the MeA. Additionally, odor exposition leads to a sexually dimorphic change in *Kiss1* expression in the posterior subdivision of the MeA. Our findings suggest that olfactory signals predominantly activate non-kisspeptin cells in the MeA to modulate responses to pheromones and therefore the HPG axis.

1. Introduction

The medial nucleus of the amygdala (MeA) is a sexually dimorphic area composed of different chemically defined neuronal populations, including some neurons that express the gene *Kiss1* [9,13,19,32]. The MeA expresses high levels of steroid receptors [26], and *Kiss1* mRNA expression mostly depends on sex steroid levels in this area [19,29]. *Kiss1* mRNA levels in the MeA increase as puberty approaches and sex steroid levels rises [29]. In adult rodents, MeA *Kiss1* expression is higher in males than in females at diestrus [19]. However, *Kiss1* mRNA levels increase during proestrus and *Kiss1* mRNA or kisspeptin protein content in the MeA is similar between adult male and female when estradiol (E2) levels are comparable [19,31]. In addition, the expression of the *Kiss1* gene in the MeA is specifically modulated by estrogen receptors (ERs) but not by androgen receptors [19]. Studies using ERs knockout mice further demonstrated that kisspeptin cells in the MeA are primarily regulated by estrogen receptor α (ERα), similar to what has been described for hypothalamic kisspeptin neurons [13,29]. However, although it is well known that virtually all hypothalamic kisspeptin neurons co-express the ERα [9,27], the percentage of *Kiss1*-expressing neurons in the MeA that contain ERα remains unexplored.

Recent studies have begun to uncover possible functions of kisspeptin in the amygdala. Exogenous kisspeptin administration into the MeA or activation of MeA *Kiss1* neurons modulates the onset of puberty, the secretion of luteinizing hormone (LH), and sexual behaviors [1,2,6,7,14,20]. In male rodents, MeA kisspeptin neurons maintain reciprocal connections with the accessory olfactory bulb, and with a subset (15%) of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. This suggests that extrahypothalamic kisspeptin neurons contribute to the integration of socio-sexual behavior and odor information in order to modulate the HPG axis [1,2,22,32]. However, whether MeA kisspeptin neurons are activated by conspecific odor signals has not been

* Corresponding author at: Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo, 05508-000, Brazil.
E-mail address: rfrazao@usp.br (R. Frazao).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.023
Received 6 February 2018; Received in revised form 8 May 2018; Accepted 14 May 2018
0304-3940/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.