

**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: Prof^ª. Dra. Renata Frazão

Coorientador: Prof. Dr. José Donato Jr

Versão original

**São Paulo
2019**

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.

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).

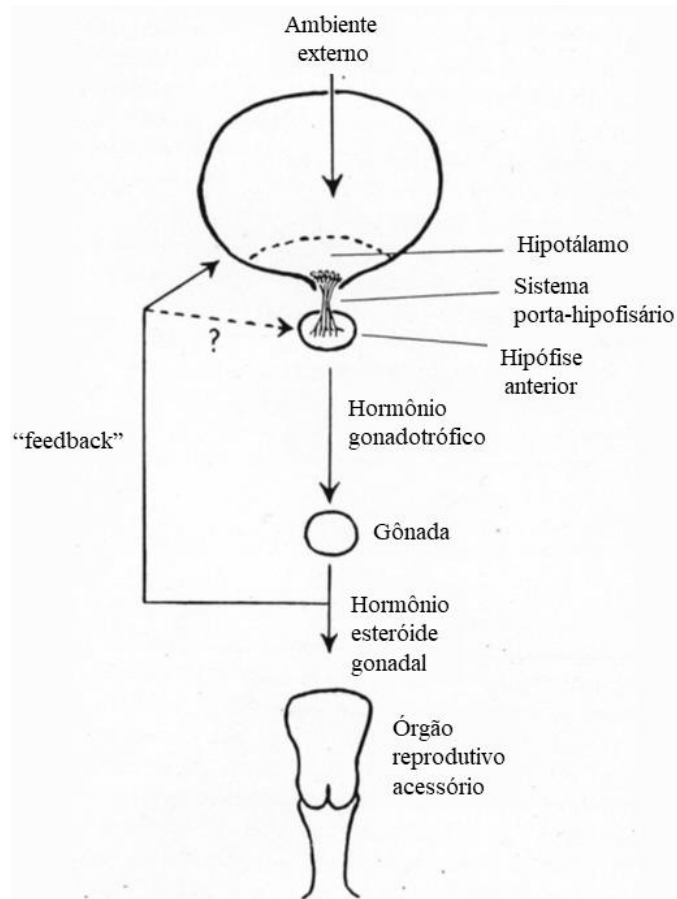


Figura 1. Esquema do controle hipotalâmico na reprodução proposto por Geoffrey Harris, modificado de Plant, 2015.

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 espermátocitos 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).

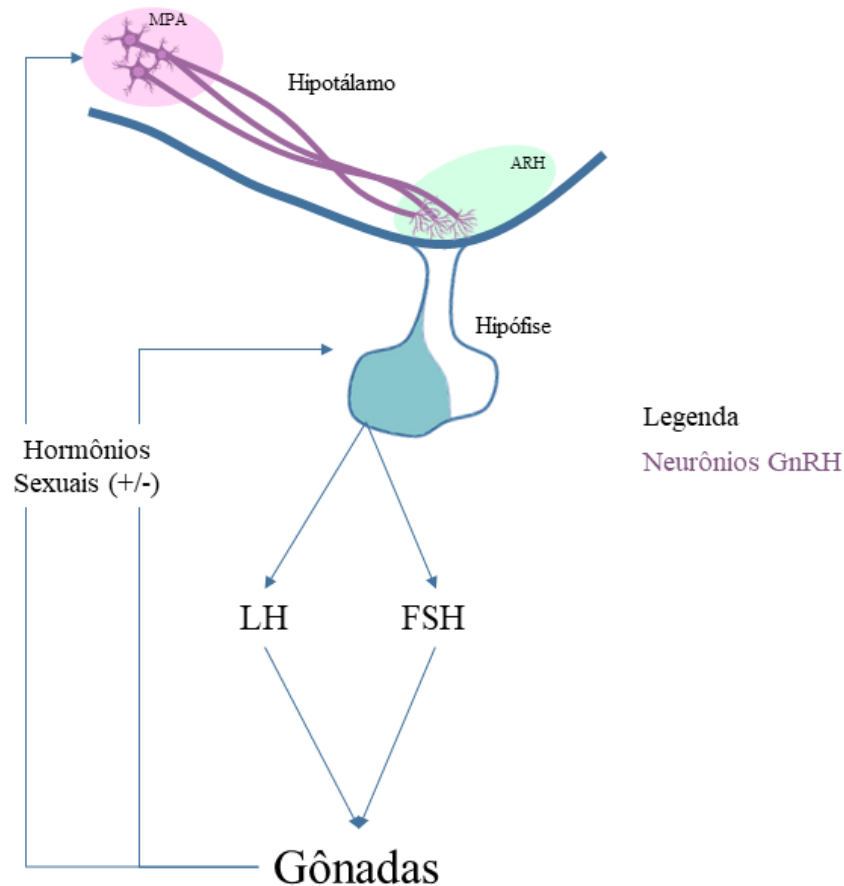


Figura 2. Esquema do eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal sob o controle dos neurônios GnRH da área pré-óptica medial (MPA). Neurônios na região MPA sintetizam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que é liberado na eminência mediana. O hormônio GnRH atua na adenohipófise, influenciando a síntese 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; Messenger 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 (Er α) (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).

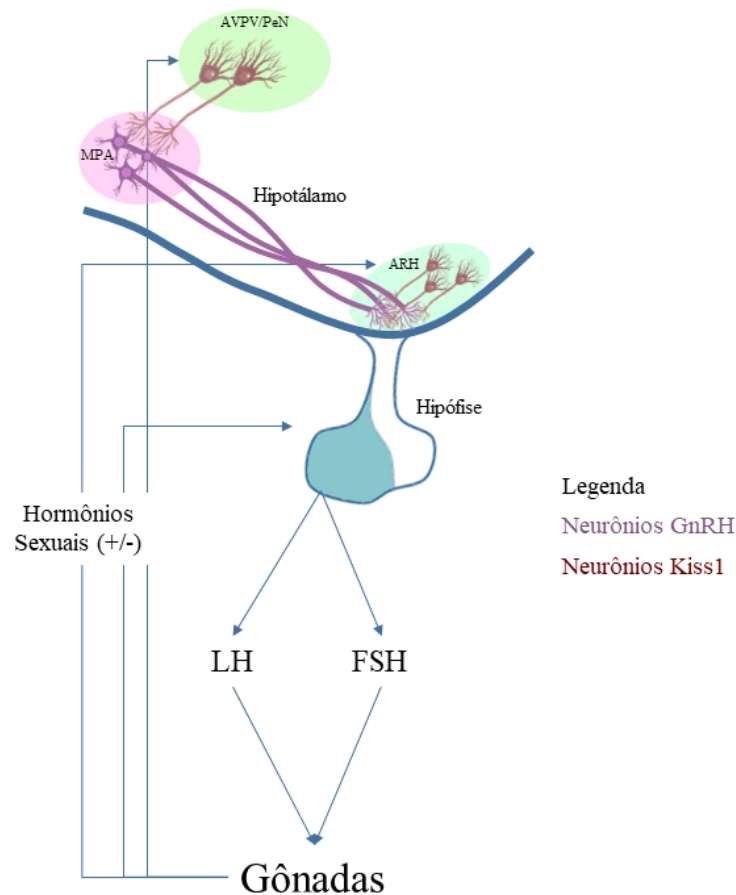


Figura 3. Esquema do eixo Hipotálamo – Hipófise – Gonadal (HPG) reorganizado após a descoberta dos neurônios Kiss1. Neurônios Kiss1 localizados nos núcleos periventricular anteroventral e periventricular anterior (AVPV/PeN) e no núcleo arqueado (ARH) regulam o eixo HPG, sendo considerados os principais 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 fosfoinosítídeo, 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 transcrição dos genes alvo. Além disto, a ativação do receptor de leptina também pode recrutar a via da proteína - 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).

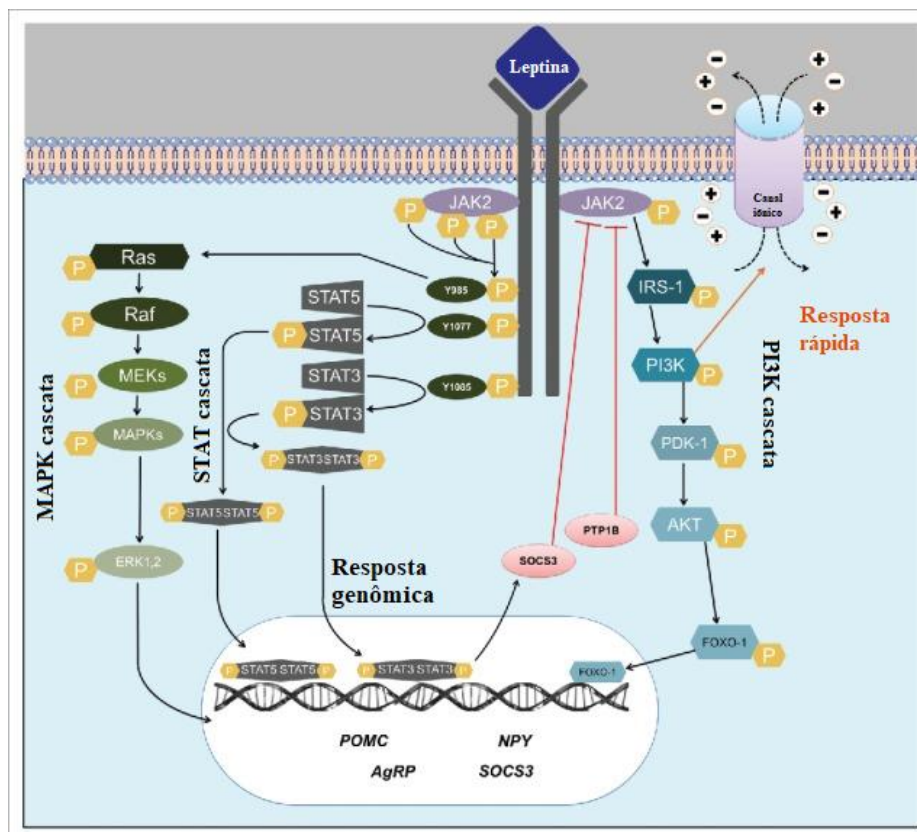


Figura 4. Vias de sinalização recrutadas pelo receptor de leptina. Representações das diferentes vias de sinalização que podem ser recrutadas após a ativação do receptor de leptina, dentre estas a via janus cinases 2 e proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (JAK/STATs), via que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

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 colocalization 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.

Bjørnbæk 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, Guiland 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. Circoral 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, Sickmüller 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 rats¹. *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.

Elmqvist 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.

Elmqvist 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.

Elmqvist 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 progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin 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, Vandenberghe 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.

Messenger 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 C57BL/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 galanergic 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 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 tract 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 Health* 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 Health 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 (*lasiodromys 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.