

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Laísa Taline Magalhães Hipólito

**INIBIÇÃO DA SECREÇÃO PULSÁTIL DE HORMÔNIO
LUTEINIZANTE E FUNÇÃO GONADAL EM RATOS OBESOS: PAPEL
DOS NEURÔNIOS KND_y**

Belo Horizonte/MG

2018

Laísa Taline Magalhães Hipólito

**INIBIÇÃO DA SECREÇÃO PULSÁTIL DE HORMÔNIO
LUTEINIZANTE E FUNÇÃO GONADAL EM RATOS OBESOS: PAPEL
DOS NEURÔNIOS KND γ**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Raphael E. Szawka

Co-orientador: Prof. Dr. Candido C. Coimbra

Belo Horizonte/MG

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, que foi meu apoio em todos os momentos.

Aos meus queridos pais, Déa e Mauri, pelo amor incondicional.

À minha irmã Taciane, que neste mesmo período estava cursando o seu doutorado e demonstrou imenso companheirismo, compreensão e incentivo.

Ao Professor Dr. Raphael Escorsim Szawka, pela orientação e contribuição em meu amadurecimento científico, obrigada pelos ensinamentos e paciência ao longo desses anos.

Aos demais professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, professor Dr. Candido Celso Coimbra, o qual me auxiliou com a sua co-orientação, professora Dra. Adelina Martha dos Reis e professora Dra. Maristela Poletini.

Ao professor Juneo Freitas Silva pela grande contribuição nos experimentos.

A todos os professores que passaram pela minha vida acadêmica e contribuíram com seus conhecimentos.

À aluna de iniciação científica Ana Clara Campideli pela imensa ajuda nos experimentos.

À Simone, por ser sempre tão prestativa. Obrigada por todo o seu auxílio, facilitando tanto o nosso dia-a-dia no laboratório.

À Roberta que me recebeu tão bem no laboratório nos primeiros meses, à Paty que me auxiliou em diversos momentos, bem como a todos os demais colegas do grupo 'kisspeptina' e do laboratório, agradeço pelas ajudas, incentivo, amizade, convívio e momentos de descontração.

Aos amigos Priscila e Rodrigo Aprígio pela amizade desde os tempos de Alfenas, obrigada por todo apoio no período em que também residiram em Belo Horizonte, pelas caronas e pelos momentos de descontração e alegria.

Ao amigo Rodrigo Monteiro, obrigada pelo incentivo e companhia nos momentos difíceis.

A todos os amigos que me apoiaram independente da distância.

Ao Ivan José que de forma prestativa confeccionou os comedouros dos animais.

Aos funcionários do CEBIO/UFMG por cuidarem dos animais.

À UFMG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação, Cintya e Rodner pelo auxílio e disponibilidade.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Aos animais que contribuíram com sua vida para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A obesidade causa redução da secreção de hormônio luteinizante (LH) e infertilidade em homens. Nos últimos anos, a kisspeptina (Kp) tem sido apontada como o peptídeo central que interliga o metabolismo e o eixo reprodutivo. Os neurônios KNDy do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) coexpressam Kp, neurocinina B (NKB) e dinorfina (Dyn). Neste estudo, avaliamos a secreção pulsátil de LH em ratos obesos e a participação dos neurônios KNDy no efeito inibitório da obesidade sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG). No experimento 1, caracterizamos o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD) na função do eixo HPG de ratos. Estes receberam dieta controle (CT) ou HFD durante 13 semanas a partir do desmame. Ratos HFD apresentaram ganho de peso, ingestão calórica e consumo de oxigênio aumentados em relação aos CT. Ainda, ratos HFD apresentaram maior índice de adiposidade, índice de Lee e intolerância à glicose em relação aos CT. Para a avaliação da secreção pulsátil de LH por ELISA, foram realizadas coletas seriadas de sangue pela cauda, a cada seis minutos, durante 3 h. A análise da pulsatilidade revelou redução de 50% na amplitude dos pulsos e de 36% na concentração média de LH nos ratos HFD, enquanto a frequência dos pulsos não foi alterada. Posteriormente, uma parte dos animais foi perfundida para processamento dos cérebros para análise imunohistoquímica. A outra parte dos animais foi decapitada e os cérebros processados para PCR em tempo real (qPCR). O número de neurônios imunorreativos à Kp (Kp-ir) no ARC foi reduzido em 30% nos ratos HFD. Os ratos HFD também apresentaram redução de 35% nos níveis de RNAm de NKB (*Nkb*), sem alteração na expressão dos genes de Kp (*Kiss1*) e Dyn (*Pdyn*) no ARC, bem como redução de 29% na expressão de GnRH (*Gnrh1*) na área préóptica (POA). A HFD ainda reduziu em 35% o RNAm do receptor para GnRH (*Gnrhr*) e da cadeia de LH- β (*Lhb*) na adenohipófise. No experimento 2, avaliamos se o tratamento intracerebroventricular (i.c.v.) com kisspeptina-10 (Kp-10) seria capaz de reverter a redução da secreção pulsátil de LH em animais HFD. De fato, o tratamento com Kp-10 aumentou a amplitude dos pulsos e o LH médio tanto em ratos CT quanto HFD, restaurando o LH a níveis normais nos animais obesos. No experimento 3, os animais CT e HFD do experimento 2 foram castrados para avaliação da hipersecreção de LH em resposta à ausência da retroalimentação negativa. Após dez dias da castração foi realizada a coleta seriada de sangue pela cauda, o LH médio de quando os animais eram intactos (INT) foi comparado com LH médio após castração dos mesmos animais (CAST). Como esperado, ratos CT CAST apresentaram hipersecreção de LH comparados com os ratos CT INT, os ratos HFD CAST, por outro lado, tiveram o aumento de LH atenuado. Ainda, o número de neurô-

nios Kp-ir no ARC foi aproximadamente 40% menor nos ratos HFD CAST em comparação aos CT CAST. Por fim, avaliamos se o tratamento crônico com Kp-10 subcutâneo (s.c.) reverteria a supressão da pulsatilidade do LH em ratos obesos. Os ratos foram tratados com dieta CT ou HFD durante 18 semanas. A partir da oitava semana, ratos HFD receberam tratamento diário com Kp-10 (HFD+Kp, doses de 1 ou 3 nmol/rato/dia) ou salina (HFD+S), enquanto ratos CT receberam salina (CT+S). Nas doses utilizadas, contudo, a Kp-10 s.c. não foi capaz de reverter o efeito inibitório da obesidade sobre a amplitude dos pulsos e a concentração média de LH nos ratos HFD. Adicionalmente, foram realizadas dosagens de testosterona e estradiol nestes animais. Ratos HFD+S apresentaram níveis reduzidos de testosterona em relação ao CT+S, enquanto que o tratamento com 3 nmol de Kp-10 s.c. restabeleceu os níveis de testosterona dos animais HFD. O estradiol, por sua vez, foi aumentado apenas no grupo HFD+Kp 3. Nossos resultados demonstram que a obesidade induzida pela HFD inibe a amplitude dos pulsos de LH e altera a função testicular em ratos. Isto está associado primariamente à redução da produção de Kp e expressão de *Nkb* pelos neurônios KNDy, sendo que o tratamento com Kp-10 i.c.v. é capaz de reverter a inibição da pulsatilidade do LH provocada pela obesidade. Por outro lado, o tratamento crônico com baixas doses de Kp-10 s.c. não apresenta o mesmo efeito sobre o LH. Contudo, 3 nmol de Kp-10 parece ter efeito na esteroidogênese testicular independentemente da secreção de gonadotrofinas, sugerindo um mecanismo alternativo de ação da Kp nos testículos.

ABSTRACT

Obesity reduces luteinizing hormone (LH) secretion and causes infertility in men. In the past few years, it has been proposed that kisspeptin (Kp) is the central peptide responsible for connecting metabolic information and the reproductive axis. The KNDy neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC) coexpress Kp, neurokinin B (NKB) and dynorphin (Dyn). Here, we evaluated the pulsatile LH secretion in obese male rats and investigated the role of KNDy neurons in obesity-induced suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG). In experiment 1, weaning rats were treated with high-fat-diet (HFD) or standard diet (CT) for 13 weeks. HFD rats displayed higher caloric intake, increased body weight and oxygen consumption when compared with CT. Moreover, HFD rats displayed higher adiposity index, Lee index and glucose intolerance compared with CT. For pulsatile LH secretion measurement, serial blood samples were collected from the tail tip (10 μ L every 6 minutes) during 3 h, which revealed reductions of 50% in pulse amplitude and 36% in mean LH concentrations in HFD rats compared to the CT, whereas the pulse frequency did not differ between groups. After the last blood sampling, some of the rats were perfused and the brains were processed for immunohistochemistry. The other part of the rats was decapitated and the brains were processed for real-time PCR (q-PCR). The number of Kp-immunoreactive (ir) neurons in the ARC was 35% lower in HFD rats compared with CT. In addition, HFD rats displayed lower *Nkb* expression in the ARC. The preoptic area (POA) showed decreased *Gnrhl* expression and the pituitary lower mRNA levels of GnRH receptor and LH- β subunit in HFD rats. In experiment 2, we investigated whether intracerebroventricular (i.c.v.) treatment with kisspeptin-10 (Kp-10) would restore the pulsatile LH secretion in HFD rats. Indeed, icv Kp-10 treatment increased the amplitude of LH pulses and mean LH concentrations in CT and HFD rats. In experiment 3, CT and HFD rats from experiment 2 were castrated for evaluation of LH hypersecretion in response to orchietomy. As expected, LH levels were elevated in CT CAST rats. On the other hand, LH increase in response to orchidectomy was greatly diminished in HFD CAST. In addition, the number of Kp-ir neurons in the ARC was 40% lower in HFD CAST rats compared with CT CAST. In experiment 4, rats were treated with HFD for 18 weeks. From the eighth week on, HFD rats received Kp-10 daily (HFD+Kp 1 nmol or 3 nmol/rat/day s.c.) or saline (HFD+S). The CT group received only saline (CT+S). Treatment with s.c. Kp-10 was not able to restore the HFD-induced suppression of LH pulse amplitude or mean LH concentrations. On the other hand, the treatment with 3 nmol Kp-10 was able to revert the defective testosterone secretion in HFD rats. The results demonstrate

that HFD-induced obesity inhibits the amplitude of LH pulses, which is associated with of Kp peptide and *Nkb* mRNA in KNDy neurons. Central injection of Kp-10 is able to restore the HFD-induced suppression in LH pulsatile release. On the other hand, chronic treatment with low doses of s.c. Kp-10 did not show the same effect. However, 3 nmol of Kp-10 appears to exert an effect on testicular steroidogenesis independent from gonadotrophin release, suggesting an alternative mechanism of Kp action at the testicular level.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padronização do ELISA ultrasensível para avaliação da secreção pulsátil de LH de rato	35
Figura 2. Caracterização da obesidade induzida por HFD	44
Figura 3. Intolerância à glicose em ratos tratados com HFD	46
Figura 4. Efeito da HFD sobre a secreção pulsátil de LH	47
Figura 5. Efeito da HFD sobre a expressão de Kp no ARC	48
Figura 6. Efeito da HFD sobre a expressão dos genes de peptídeos KNDy e GnRH	49
Figura 7. Efeito da HFD sobre a expressão dos genes do receptor para GnRH (<i>Gnrh</i>) e da cadeia β do LH (<i>Lhβ</i>) na adenohipófise	50
Figura 8. Efeito do tratamento com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH em ratos CT e HFD	51
Figura 9. Efeito da castração sobre a secreção de LH em ratos tratados com HFD	52
Figura 10. Efeito da castração sobre a expressão de Kp no ARC em ratos tratados com HFD	53

Figura 11. Efeito do tratamento sistêmico com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH	55
Figura 12. Peso corporal e índice de adiposidade em animais HFD tratados com Kp-10 s.c. .	56
Figura 13. Efeito do tratamento crônico com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH em ratos HFD	57
Figura 14. Efeito da HFD e Kp-10 nos níveis plasmáticos de testosterona em ratos	58
Figura 15. Efeito da HFD e Kp-10 nos níveis plasmáticos de estradiol em ratos	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Componentes da dieta hiperlipídica indutora de obesidade.30
- Tabela 2.** Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.38
- Tabela 3.** Índice de adiposidade e de Lee de animais tratados com dieta CT ou HFD45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARC	– núcleo arqueado
AVPV	– núcleo anteroventral periventricular
CEBIO	– Centro de Bioterismo
Dyn	– dinorfina
ELISA	– ensaio de imunoabsorção enzimática
EM	– eminência mediana
FSH	– hormônio folículo estimulante
GnRH	– hormônio liberador de gonadotrofinas
GTT	– teste de tolerância à glicose (glucose tolerance test)
HFD	– dieta hiperlipídica (High Fat Diet)
HPG	– hipotálamo-hipófise-gonadal
i.c.v.	– intracerebroventricular
i.p.	– intraperitoneal
KNDy	– neurônios que coexpressam kisspeptina, neurocinina B e dinorfina
KOR	– receptor κ -opioide
Kp	– kisspeptina

Kp-10	– kisspeptina-10
Kp-13	– kisspeptina-13
Kp-14	– kisspeptina-14
Kp-54	– kisspeptina-54
LH	– hormônio luteinizante
NKB	– neurocinina B
POA	– área preóptica (preoptic área)
qPCR	– reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNAm	– RNA mensageiro
s.c.	– subcutâneo
Vigitel	– Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal: controle neuroendócrino da secreção de LH.	16
1.2	Reprodução e estado metabólico	17
1.3	Neurônios Kisspeptinérgicos e o eixo reprodutivo.....	20
1.4	Neurônios KNDy	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivos específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Animais	26
3.2	Planejamento Experimental	26
3.2.1	Experimento 1: Avaliação da secreção pulsátil de LH e controle do eixo gonadal em ratos obesos.....	26
3.2.2	Experimento 2: Efeito da kisspeptina intracerebroventricular (i.c.v.) sobre a secreção pulsátil de LH em ratos obesos	27
3.2.3	Experimento 3: Avaliação da resposta do LH à castração em ratos obesos	28
3.2.4	Experimento 4: Efeito do tratamento s.c. com Kisspeptina sobre a secreção pulsátil de LH	28
3.2.5	Experimento 5: Efeitos do tratamento crônico com kisspeptina sobre a secreção pulsátil de LH e função do eixo gonadal em ratos obesos.....	29
3.3	Anestésicos e drogas.....	29

3.4	Dieta hiperlipídica indutora de obesidade	30
3.5	Ingestão calórica.....	31
3.6	Taxa metabólica de repouso	31
3.7	GTT.....	32
3.8	Avaliação da secreção pulsátil de LH	32
3.9	Perfusão e processamento dos cérebros para Imunohistoquímica	35
3.10	Imunohistoquímica e análise das imagens	36
3.11	qPCR.....	37
3.12	Cirurgia estereotáxica e microinjeção i.c.v.	39
3.13	Orquiectomia bilateral.....	40
3.14	ELISA para testosterona	40
3.15	ELISA para estradiol	41
3.16	Análise da secreção pulsátil de LH.....	42
3.17	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Experimento 1: Avaliação da secreção pulsátil de LH e controle do eixo gonadal em ratos obesos.....	43
4.2	Experimento 2: Efeito da kisspeptina i.c.v. sobre a secreção pulsátil de LH em ratos obesos.....	50
4.3	Experimento 3: Avaliação da resposta do LH à castração em ratos obesos	52
4.4	Experimento 4: Efeito do tratamento s.c. com Kisspeptina sobre a secreção	

	pulsátil de LH	54
4.5	Experimento 5: Efeitos do tratamento crônico com kisspeptina sobre a secreção pulsátil de LH e função do eixo gonadal em ratos obesos.....	55
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal: controle neuroendócrino da secreção de LH

A regulação da fertilidade, tanto em humanos como em roedores, se dá através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) o qual é o componente intercomunicante de um sistema neural e endócrino (Kaprra e Huhtaniemi, 2017). No hipotálamo, um grupo de neurônios localizados principalmente na área preóptica (POA) sintetiza e libera, de maneira pulsátil, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH liberado no sangue porta-hipofisário na eminência mediana (EM) estimula as células gonadotróficas da hipófise anterior a secretarem, de forma também pulsátil, as gonadotrofinas hormônio luteinizante (LH) e hormônio foliculo estimulante (FSH) (Manfredi-Lozano, Roa e Tena-Sempere, 2018). Já em 1970, um grupo de pesquisadores demonstrava a pulsatilidade do LH, eles observaram a presença de oscilações na concentração plasmática do mesmo em macacos *Rhesus*, sendo que tais oscilações exibiam uma periodicidade de aproximadamente 1 h (Dierschke *et al.*, 1970). Tal secreção pulsátil é de extrema importância na fertilidade de mamíferos, sendo que a pulsatilidade do LH é produzida correspondentemente à pulsatilidade do GnRH, uma vez que foi demonstrado que a administração intermitente de GnRH exógeno restaura a secreção de LH em animais com lesões hipotalâmicas que aboliam a liberação do mesmo na hipófise. Por outro lado, a infusão contínua de GnRH exógeno não reverteu a supressão da gonadotrofina (Belchetz *et al.*, 1978; Tsutsumi e Webster, 2009).

As gonadotrofinas, por sua vez, são reguladores críticos da função gonadal. Os testículos, as gônadas masculinas, possuem como funções principais a produção de esteroides sexuais e a maturação das células germinativas. O LH estimula a produção da testosterona, o principal esteroide sexual masculino, através de sua ação nas células de Leydig, as quais estão localizadas no tecido intersticial entre os túbulos seminíferos dos testículos (Saner-Amigh e

Halvorson, 2010; Kaprara e Huhtaniemi, 2017). A testosterona, por sua vez, participa da diferenciação e amadurecimento sexual, estimulando a espermatogênese. Apesar de haver uma organização testicular, com a produção de andrógeno ocorrendo nas células intersticiais de Leydig, enquanto a espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos com o auxílio das células de Sertoli, a testosterona exerce uma ação parácrina essencial à espermatogênese nestas últimas células localizadas nos túbulos seminíferos (Dym e Fawcett, 1970; Schlatt, Meinhardt e Nieschlag, 1997; Schlatt e Ehmcke, 2014). Dentre as funções da célula de Sertoli está a fagocitose das células germinativas apoptóticas e dos corpos residuais. Estes últimos são os restos citoplasmáticos, provenientes de espermátides maduras, que se desprendem durante a espermiogênese (Yefimova *et al.*, 2008). Adicionalmente, as células de Sertoli possuem receptores e são estimuladas pelo FSH. Contudo, animais que não expressam o gene que codifica a subunidade FSH- β demonstram um desenvolvimento sexual normal e são férteis, assim, tem sido postulado que esta gonadotrofina não seria totalmente essencial para a fertilidade em alguns animais (Wreford *et al.*, 2001).

Por fim, para que os níveis de andrógeno sejam mantidos dentro da normalidade, a testosterona age de forma inibitória no eixo gonadal reduzindo a secreção de LH. Desta forma, a testosterona circulante é capaz de regular a própria secreção, sendo o principal mediador que exerce ação de retroalimentação negativa no hipotálamo, bem como na hipófise, inibindo a secreção de GnRH e LH, controlando assim a atividade do eixo HPG (O'donnell *et al.*, 2001).

1.2 Reprodução e estado metabólico

Dentre os reguladores do eixo HPG, destaca-se o papel do estado metabólico do organismo, uma vez que este exerce um efeito decisivo na modulação da capacidade reprodutiva (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006; Hill, Elmquist e Elias, 2008). Já é bem reconhecido que o balanço energético negativo, tal como os casos de restrição alimentar e desnutrição, prejudica

a fertilidade suprimindo o eixo HPG (Cameron e Nosbisch, 1991; Castellano *et al.*, 2005). Por outro lado, a obesidade, que se tornou um problema de saúde mundial nas últimas décadas, também está relacionada com desordens reprodutivas. Segundo os dados da *World Health Organization* (WHO), no ano 2000 havia um total de 750 milhões de casos de sobrepeso e 300 milhões de obesos no mundo (Kelly *et al.*, 2008). Já em 2016 esses números aumentaram para mais de 1.9 bilhão de adultos com sobrepeso, sendo 650 milhões de pessoas obesas (Who, 2017). Adicionalmente, as estimativas indicam que até 2030 a maioria da população adulta do mundo terá sobrepeso ou obesidade (Kelly *et al.*, 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou um levantamento realizado pela Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) que revela que a frequência de excesso de peso vem aumentando nos últimos anos, 42.7% da população estava acima do peso em 2006. Em 2016, essa taxa aumentou para 53.8%, sendo maior entre os homens que apresentaram frequência de 57.7% (Vigitel, 2017).

Pesquisadores têm demonstrado que homens obesos e com o diabetes mellitus tipo 2 podem apresentar baixas concentrações de testosterona, bem como a presença da síndrome do hipogonadismo hipogonadotrófico (Dandona *et al.*, 2008; Teerds, De Rooij e Keijer, 2011). Estudos indicam uma relação inversamente proporcional entre a obesidade masculina e fertilidade, sendo a supressão do eixo HPG mais prevalente em casos de obesidade severa. Adicionalmente, a obesidade acentua o declínio da produção de testosterona causado pelo envelhecimento e comorbidades associadas à obesidade (Grossmann, 2018).

Fatores tais como a resistência à insulina e leptina, bem como o aumento de estrógeno têm sido propostos como contribuintes para a infertilidade masculina. Em homens com obesidade há um aumento da atividade da aromatase, a qual está presente no tecido adiposo e converte irreversivelmente testosterona em estradiol o que resulta em níveis elevados de estrogênio (Schneider *et al.*, 1979; Stanik *et al.*, 1981; Cohen, 2008). Por outro lado, mais recente-

mente, têm sido relatados baixos níveis de estradiol circulante em homens obesos em paralelo à baixa concentração de testosterona, o que estaria de acordo com o fato de que esta última é o substrato para a aromatase (Dhindsa *et al.*, 2011; Huhtaniemi *et al.*, 2012; Grossmann, 2018). Em outro estudo, foi observado que a deleção seletiva do receptor para insulina no cérebro de camundongos (NIRKO) levou a uma redução nas concentrações de LH (Bruning *et al.*, 2000). Ainda, a leptina estimula a ativação dos neurônios GnRH e parece desempenhar um papel permissivo na regulação do eixo reprodutivo (Casanueva e Dieguez, 1999; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006; Farooqi e O'rahilly, 2009; Pinilla *et al.*, 2012). A deficiência de leptina está associada ao hipogonadismo hipogonadotrófico e obesidade, sendo que o tratamento com a mesma induz o desenvolvimento de características sexuais secundárias e a secreção pulsátil de gonadotrofinas (Strobel *et al.*, 1998; Licinio *et al.*, 2004). Em homens obesos, os andrógenos circulantes são inversamente correlacionados com os níveis circulantes de leptina, enquanto que, de forma complementar, uma resistência à leptina na obesidade tem sido descrita (Strobel *et al.*, 1998; Isidori *et al.*, 1999).

De forma geral, o defeito patológico que leva aos baixos níveis plasmáticos de testosterona na obesidade pode ser devido a diferentes fatores. Entretanto, os neurônios GnRH podem ser considerados fator-chave, sendo portanto integradores dos diferentes sinais que regulam o eixo reprodutivo (Dandona *et al.*, 2008; Manfredi-Lozano, Roa e Tena-Sempere, 2018). Contudo, os neurônios GnRH não expressam receptores para a maioria dos hormônios sexuais e metabólicos. Estudos demonstraram que a leptina, por exemplo, regula o GnRH de forma indireta, o que sugere a existência de vias aferentes sensíveis aos efeitos da leptina e que transmitem a sua ação para tais neurônios (Quennell *et al.*, 2009). Os neurônios produtores dos peptídeos kisspeptinas (Kp), recentemente descritos, têm sido reconhecidos por cumprirem este papel. Ações da leptina em tais neurônios foram propostas pela primeira vez em 2006, por estudos em camundongos ob/ob, nos quais a falta congênita de leptina está associa-

da a uma redução significativa na expressão do RNAm para Kp no núcleo arqueado (ARC) (Smith *et al.*, 2006). Ademais, os neurônios kisspeptinérgicos do ARC expressam receptores intracelulares para estrógeno (ER), sendo inibidos pelo estradiol, indicando que podem ter papel no efeito de retroalimentação negativa dos esteroides sexuais sobre a secreção de GnRH (Smith, Cunningham, *et al.*, 2005).

1.3 Neurônios Kisspeptinérgicos e o eixo reprodutivo

Os neurônios kisspeptinérgicos são responsáveis pela produção de Kp, os quais são resultado da expressão do gene *KISS1* em humanos, que em roedores é denominado de *Kiss1*. Tal gene codifica uma proteína biologicamente inativa composta por 145 aminoácidos, a qual é clivada para produzir a kisspeptina-54 (Kp-54), que por sua vez é biologicamente ativa (Ohtaki *et al.*, 2001). Posteriormente, foram identificados outros fragmentos, a kisspeptina-14 (Kp-14), kisspeptina-13 (Kp-13) e kisspeptina-10 (Kp-10), igualmente originários do precursor inativo (Kotani *et al.*, 2001). Inicialmente, o *KISS1* foi descrito como supressor de metástase em células humanas malignas, por este fato, a Kp-54 foi inicialmente nomeada como metastina (Lee *et al.*, 1996).

A Kp atua ligando-se ao receptor acoplado à proteína G estimulatória, inicialmente denominado GPR54, atualmente também denominado Kiss1r (Kotani *et al.*, 2001). Mutações que causavam a perda de função do Kiss1r foram relatadas por De Roux e colaboradores (2003) e Seminara e colaboradores (2003), sendo que os pacientes que exibiam tais mutações apresentavam o quadro clínico de hipogonadismo-hipogonadotrófico, evidenciando pela primeira vez a relação da Kp com o controle reprodutivo. O Kiss1r está localizado em diversos tecidos, dentre eles os neurônios GnRH, sendo que a Kp tem sido descrita nos últimos anos como o mais importante regulador destes neurônios, uma vez que neurônios kisspeptinérgicos enviam projeções para os neurônios GnRH e modulam a secreção deste e, assim, exercem um

potente efeito estimulatório sobre a secreção pulsátil de LH (Roseweir e Millar, 2009).

A distribuição dos neurônios kisspeptinérgicos no hipotálamo é mais bem caracterizada em roedores, mas também foi relatada a presença do RNA mensageiro (RNAm) e/ou peptídeo em diversos outros mamíferos, tais como suínos, ovinos, equinos, primatas e humanos (Smith, Cunningham, *et al.*, 2005; Franceschini *et al.*, 2006; Rometo *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Decourt *et al.*, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2008; Clarkson *et al.*, 2009; Mikkelsen e Simonneaux, 2009; Pinilla *et al.*, 2012). De forma geral, estes neurônios estão majoritariamente localizados no ARC, ou em sua região correspondente em primatas, o núcleo infundibular. Adicionalmente, estudos demonstraram, principalmente em roedores, a presença de outra população de neurônios kisspeptinérgicos localizada no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) da POA, o qual é sexualmente dimórfico, sendo maior em fêmeas do que em machos (Gottsch *et al.*, 2004; Kauffman, Gottsch, *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2008; Oakley, Clifton e Steiner, 2009).

Smith e colaboradores (2005) observaram que ambas as populações de neurônios kisspeptinérgicos do hipotálamo, ARC e AVPV, expressam ER, tanto o subtipo ER α quanto o ER β . Em adição, os mesmos pesquisadores demonstraram que fêmeas ovariectomizadas exibiam aumento do RNAm de *Kiss1* no ARC, o qual diminuiu após tratamento com estradiol (Smith, Cunningham, *et al.*, 2005). Adicionalmente, camundongos machos castrados (CAST) exibiram maior expressão de *Kiss1* no ARC, enquanto que o tratamento com testosterona reverteu tal quadro (Smith, Dungan, *et al.*, 2005). Corroborando estes dados, Navarro e colaboradores (2004) demonstraram que ratos machos adultos submetidos à castração apresentavam aumento nos níveis de RNAm de *Kiss1* no hipotálamo, posteriormente, o tratamento com testosterona reverteu a expressão do gene *Kiss1*, bem como os níveis de LH.

Juntos, esses dados comprovam que os esteroides sexuais são capazes de regular negativamente a expressão de *Kiss1* no hipotálamo, indicando que os neurônios kisspeptinérgicos,

mais especificamente a população presente no ARC, podem agir como mediadores dos sinais de retroalimentação negativa, tanto do estradiol quanto da testosterona, nos neurônios GnRH e consequente secreção de gonadotrofinas.

1.4 Neurônios KNDy

Goodman e colaboradores (2007) demonstraram, em ovelhas, que a já conhecida população de neurônios kisspeptinérgicos no ARC, coexpressa também neurocinina B (NKB) e Dinorfina (Dyn). Assim, reconhecendo a capacidade desses neurônios em produzir os três neuropeptídeos, Lehman e colaboradores (2010) propuseram o acrônimo de neurônios KNDy. De fato, os neurônios KNDy foram demonstrados em diversas espécies, dentre elas camundongos, macacos e ratos (Li *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009; Ramaswamy *et al.*, 2010). Em humanos, no núcleo infundibular, uma imunofluorescência de dupla marcação revelou que 77% dos neurônios kisspeptinérgicos apresentavam marcação para o peptídeo da NKB (Hrabovszky *et al.*, 2010).

A NKB pertence à família das taquicininas, sendo codificada em humanos pelo gene *TAC3*, já em roedores o gene *Tac2* desempenha essa função. Três receptores foram identificados para as taquicininas, o NK1R, NK2R e NK3R, porém a NKB age preferencialmente neste último, o qual é codificado pelo gene *TACR3* em humanos e, em roedores, pelo *Tacr3* (Rance *et al.*, 2010). Krajewski e colaboradores (2005) demonstraram, em roedores, a expressão do NK3R nos terminais dos neurônios GnRH localizados na EM, desta forma, esses dados indicaram que os neurônios NKB poderiam influenciar a secreção de GnRH. Ademais, outro grupo de pesquisadores observaram por hibridização *in situ* a expressão do NK3R também nos neurônios KNDy (Navarro *et al.*, 2009). Posteriormente, Guran e colaboradores (2009) relataram um quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico em pacientes com mutação nos genes para NKB e seu receptor NK3R. Adicionalmente, o tratamento com o agonista da NKB indu-

ziu a secreção de LH em camundongos, macacos, ovelhas e ratos (Billings *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010; Navarro, Castellano, *et al.*, 2011; Navarro, Gottsch, *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns estudos demonstraram uma ação inibitória da NKB na secreção de LH, ocorrendo assim uma discrepância de resultados a respeito das ações deste neuropeptídeo. Entretanto, o efeito final no LH parece depender da regulação exercida pelos esteroides sexuais, além disso, a NKB utilizada para tratamento experimental possui certa afinidade aos outros receptores de taquicininas, apesar da sua ação preferencial pelo NK3R (Pinilla *et al.*, 2012). De forma geral, as pesquisas realizadas com a NKB demonstram que este neuropeptídeo possui relação com o eixo reprodutivo, podendo exercer um papel de regulador do mesmo.

Em 2006, antes mesmo do reconhecimento dos neurônios KNDy, Burke e colaboradores demonstraram em neurônios do ARC a coexpressão da NKB e Dyn (Burke *et al.*, 2006). A Dyn é um opioide que age majoritariamente através de receptores κ -opioides (KOR) e a sua ação no eixo reprodutivo é de inibir a secreção de LH (Yen *et al.*, 1985). Em ratos, o pré-tratamento com antagonista de Dyn e posteriormente com o agonista da NKB, elevou os níveis circulantes de LH, demonstrando a possível ação conjunta dos dois neuropeptídeos (Ruiz-Pino *et al.*, 2015). Adicionalmente, Navarro e colaboradores (2011) propuseram um mecanismo, onde os neurônios KNDy possuiriam auto sinapses recorrentes, através das quais a liberação de NKB estimularia estes neurônios, enquanto a de Dyn teria uma ação inibitória. Por sua vez, a liberação sináptica de Kp nos neurônios GnRH exerceria o efeito regulatório resultante sobre a secreção de GnRH. Assim, eles sugerem um mecanismo de auto regulação oscilatória da atividade dos neurônios KNDy, o que resultaria na modulação da secreção pulsátil de GnRH (Navarro *et al.*, 2009; Navarro, Gottsch, *et al.*, 2011; Pinilla *et al.*, 2012). De fato, estudo recente de optogenética demonstrou que a rápida ativação dos neurônios KNDy é capaz de gerar pulsos de LH, enquanto a inibição destas células suprime a pulsatilidade endógena (Clarkson *et al.*, 2017).

A obesidade está relacionada a inibição da secreção pulsátil de LH e hipoandrogenismo em homens (Vermeulen *et al.*, 1993), o qual agrava o quadro de obesidade por favorecer o acúmulo de gordura em detrimento ao peso de massa magra (Grossmann, 2018). Foi demonstrado recentemente que o tratamento com Kp é capaz de estimular a secreção de LH e testosterona em homens obesos que apresentam diabetes tipo 2 (George *et al.*, 2013). Esta evidência sugere que uma supressão da produção de Kp possa ser responsável pelo quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico em homens obesos. Entretanto, os mecanismos pelos quais a obesidade interfere na regulação da secreção de gonadotrofinas ainda não são totalmente entendidos. Em modelos animais utilizando dietas hiperlipídicas (HFD) em ratos, observou-se que a obesidade induzida por dieta causa redução da secreção de testosterona, embora não tenham sido encontradas alterações nos níveis basais de LH (Sanchez-Garrido *et al.*, 2014; Dudek *et al.*, 2017; Sanchez-Garrido *et al.*, 2018). Assim, é possível que a secreção pulsátil de LH seja alterada pela HFD em ratos obesos, à semelhança do que ocorre em humanos, entretanto, isto ainda não foi demonstrado. Ainda em modelos animais, há divergências sobre o efeito da obesidade induzida por dieta sobre os neurônios Kp do hipotálamo, havendo relatos de efeito inibitório ou ausência de efeito da HFD sobre a expressão hipotalâmica de Kp (Sanchez-Garrido *et al.*, 2014; Dudek *et al.*, 2017; Sanchez-Garrido *et al.*, 2018).

Assim, diante da hipótese de que a diminuição da produção endógena de Kp, com consequente diminuição da pulsatilidade do GnRH, seja um mecanismo central que interliga fatores metabólicos com a supressão do eixo reprodutivo em obesos, este trabalho determinou o efeito da obesidade induzida por HFD sobre a secreção pulsátil de LH e função do eixo HPG em ratos machos, e avaliou a participação dos neurônios KNDy neste paradigma de supressão do eixo gonadal.

2 OBJETIVOS

Diversos estudos apontam o quadro de infertilidade masculina causada por obesidade, no entanto, ainda não estão totalmente esclarecidas as alterações no controle do eixo HPG pelos quais a obesidade leva à supressão da função gonadal. Assim, este projeto teve por objetivo investigar possíveis alterações na pulsatilidade de LH em animais obesos induzidos por dieta HFD, bem como avaliar o envolvimento dos neurônios KNDy no controle do eixo gonadal destes animais.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar se a indução de obesidade com dieta HFD influencia a secreção pulsátil de LH em ratos;
- Avaliar por meio de imunohistoquímica se a expressão de Kp no hipotálamo de ratos obesos estaria modificada;
- Avaliar se a expressão dos genes de GnRH (*Gnrh1*) na POA, kisspeptina (*Kiss1*), NKB (*Nkb*) e prodinorfina (*Pdyn*) no ARC, e do receptor para GnRH (*Gnrhr*) e cadeia de LH- β (*Lhb*) na adenohipófise de ratos obesos estaria modificada;
- Avaliar se o tratamento com Kp-10 i.c.v. seria capaz de reverter as alterações da secreção pulsátil do LH em ratos obesos;
- Avaliar a resposta de ativação do eixo gonadal e hipersecreção do LH após a castração em ratos obesos;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com Kp-10 s.c. sobre a secreção pulsátil de LH em ratos obesos, e os níveis plasmáticos de testosterona e estradiol dos mesmos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* recém-desmamados provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de no máximo três ratos por caixa (41 x 34 x 16 cm). Os animais foram mantidos em ambiente de temperatura (22 ± 2 °C) e luz (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas, com água e dieta padrão (CT) ou HFD *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo nº: 4/2014).

3.2 Planejamento Experimental

3.2.1 *Experimento 1: Avaliação da secreção pulsátil de LH e controle do eixo gonadal em ratos obesos*

Este experimento teve por objetivo avaliar o efeito da obesidade induzida por HFD sobre a secreção pulsátil de LH e parâmetros funcionais do eixo HPG. A indução à obesidade foi iniciada logo após o desmame dos animais, estes receberam dieta CT ou HFD pelo período de 13 semanas. O peso corpóreo dos animais foi monitorado semanalmente e, durante a última semana, a ingestão alimentar foi acompanhada e a taxa metabólica de repouso mensurada. Ao final de 13 semanas realizou-se o teste de tolerância à glicose (GTT). Três dias após o GTT, a secreção pulsátil de LH foi então avaliada por meio da colheita seriada de sangue pela cauda dos animais, o qual foi posteriormente dosado por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Após o término do experimento, uma parte dos animais foi anestesiada e a distância

naso-anal dos animais foi medida para cálculo do índice de Lee, o qual foi utilizado para avaliar o desenvolvimento de obesidade. O índice de Lee é calculado através da raiz cúbica do peso corporal (g) dividido pelo comprimento naso-anal (mm) multiplicado por 10 (Lee, 1929). Em seguida, os animais foram perfundidos (n = 6 por grupo) para a colheita e processamento dos cérebros para marcação Imunohistoquímica de Kp no ARC. A outra parte dos animais (n = 6 por grupo) foi eutanasiada por decapitação e os cérebros foram colhidos e congelados em gelo seco. Foram realizadas microdissecções da POA e ARC no hipotálamo e da adenohipófise para análise quantitativa do RNA mensageiro (RNAm) de *Gnrh1* (POA), *Kiss1*, *Nkb*, *Pdyn* (ARC), *Gnrhr* e *Lhβ* (adenohipófise) por RT-PCR em tempo real (qPCR). Os coxins adiposos retroperitoneal, mesentérico e epididimal foram colhidos e pesados a fresco, a soma destes três tecidos corrigida pelo peso corporal dos animais foi utilizada como um índice de adiposidade (Jeyakumar *et al.*, 2009).

3.2.2 *Experimento 2: Efeito da kisspeptina intracerebroventricular (i.c.v.) sobre a secreção pulsátil de LH em ratos obesos*

Este experimento teve por objetivo avaliar o efeito da administração aguda de kisspeptina-10 (Kp-10) i.c.v sobre a redução da secreção pulsátil de LH em ratos obesos. Os animais foram induzidos à obesidade com a HFD, ao final da indução os ratos receberam uma cânula guia no ventrículo lateral direito. Sete dias após a cirurgia estereotáxica para implantação da cânula, ratos CT (n = 3–4 por grupo) e HFD (n = 4–5 por grupo) receberam uma injeção i.c.v. de 1.2 µL de veículo (CT+V e HFD+V) ou Kp-10 (1.2 nmol/1.2 µL; CT+Kp e HFD+Kp) e trinta minutos após a injeção foi realizada a colheita seriada de sangue pela cauda para a avaliação da secreção pulsátil de LH, o qual foi dosado por ELISA.

3.2.3 *Experimento 3: Avaliação da resposta do LH à castração em ratos obesos*

Este experimento teve por objetivo avaliar a resposta funcional de aumento da secreção de LH após a castração em ratos obesos. Os ratos CT+V (n = 4) e HFD+V (n = 4) do experimento 2, após uma semana da realização da coleta seriada de sangue, foram submetidos à orquiectomia bilateral para a avaliação da resposta de hipersecreção de LH que ocorre em consequência da retirada do efeito inibitório dos esteroides gonadais (retroalimentação negativa). Dez dias após a castração foi realizada outra colheita de sangue pela cauda dos animais, as amostras foram colhidas a cada 6 minutos durante meia hora para avaliação dos níveis sanguíneos de LH, posteriormente os ratos foram eutanasiados por perfusão transcardíaca. Para efeito de comparação entre a condição de testículo-intacto (INT) e castrado (CAST), os animais foram utilizados como controle de si mesmos. Assim, em um mesmo ensaio de ELISA para LH, foram dosadas as amostras de sangue colhidas pré-castração, ou seja, quando os animais estavam INT, e as amostras de sangue coletadas pós-castração. Os cérebros foram processados para marcação imunohistoquímica de Kp no ARC. Para análise estatística, utilizou-se a média das amostras de LH de cada rato nas condições INT e CAST.

3.2.4 *Experimento 4: Efeito do tratamento s.c. com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH*

Este experimento teve por objetivo determinar o efeito do tratamento sistêmico com baixas doses de Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH. Ratos CT receberam uma injeção s.c. de Kp-10 nas doses de 1 nmol/rato (n =4) ou 3 nmol/rato (n = 4) ou salina (n = 5). Foi realizada a colheita seriada de sangue pela cauda a cada 6 minutos para análise da secreção pulsátil de LH, o qual foi dosado por ELISA.

3.2.5 Experimento 5: Efeitos do tratamento crônico com kisspeptina sobre a secreção pulsátil de LH e função do eixo gonadal em ratos obesos

Os ratos foram tratados a partir do desmame com dieta CT ou HFD pelo período de 18 semanas. A partir da oitava semana, dois subgrupos de ratos HFD receberam tratamento s.c. diário com Kp-10 (1 nmol Kp-10/rato/dia, HFD+Kp 1, n = 8; ou 3 nmol Kp-10/rato/dia, HFD+Kp 3, n = 8), enquanto ratos CT (CT+S; n = 7) e HFD (HFD+S; n = 7) receberam injeções de salina (0.2 mL salina/rato/dia; ou HFD+S). O peso corpóreo dos animais foi avaliado semanalmente. Ao final do tratamento foi realizada a colheita seriada de sangue pela cauda dos animais para a determinação da secreção pulsátil de LH, dosado posteriormente por ELISA. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi colhido pelo tronco para a avaliação das concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol por ELISA. Plasma de ratos CAST tratados com óleo (CAST, n = 3) ou testosterona diariamente por 3 dias (propionato de testosterona, 0,25 mg/0,2/rato, s.c., Organon; CAST+T, n = 3) (Ribeiro *et al.*, 2015) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, no ensaio de ELISA para testosterona. Plasma de ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (OVX, n = 5) ou estradiol diariamente por 3 dias (17 β -estradiol, 10 μ g/0,2/rata, s.c., Sigma-Aldrich,; OVX+E2, n = 5) (Szawka *et al.*, 2005) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, no ensaio de ELISA para estradiol. Os tecidos adiposos retroperitoneal, mesentérico e epididimal foram pesados a fresco para avaliação do índice de adiposidade dos animais.

3.3 Anestésicos e drogas

Para a realização da perfusão, canulação do ventrículo lateral e orquiec-

tomia os animais foram anestesiados com solução de ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Foi realizado um tratamento profilático após as cirurgias com antibiótico (Pentabiótico, Fort Dodge, 24000 UI/kg, i.m.) e analgésico (Flunixin meglumina, Banamine, Schering-Plough, 2.5 mg/kg, s.c.). A Kp-10 (metastin 45-54-amide, human; Phoenix Pharmaceuticals) utilizada na injeção i.c.v., foi administrada na dose de 1.2 nmol/1.2µL, diluída em tampão fosfato salina estéril (PBS). No tratamento s.c., a Kp-10 (Tocris Bioscience) foi administrada nas doses de 1 ou 3 nmol/0.2mL, diluída em DMSO 10% em salina estéril.

3.4 Dieta hiperlipídica indutora de obesidade

A dieta hiperlipídica utilizada para indução da obesidade foi preparada de acordo com o protocolo descrito por Santos *et al.* (2012). A densidade energética da dieta é de 5.28 kcal para cada 1 g de dieta, sendo a mesma composta por 60.98% de lipídeos, 24.55% de carboidratos e 14.47% de proteínas, tais componentes (Tabela 1) foram adquiridos da empresa Rhooster® LTDA (São Paulo-SP). Os macronutrientes foram pesados, e, homogeneizados até a formação de uma massa, a qual foi acondicionada em refrigerador a 4 °C.

Tabela 1. Componentes da dieta hiperlipídica indutora de obesidade.

Componentes	Quantidades em (g)
BHT	0,014
Bitartaro de Colina	2,50
Metionina	3,0
Vit. AIN93M	10,0
Minerais AIN93M	35,0
Celulose	50,0
Amido	62,0
Caseína	200,0
Óleo de Soja	20,0

Groselha	310,0
Banha	355,0
Total	1047,514 g

A dieta padrão utilizada (Nuvilab CR1-*Nuvital*®, PR, Brasil), por sua vez, possui densidade calórica de 2.92 Kcal a cada 1 g de ração, a mesma é composta de 57.5% de carboidratos, 30% de proteínas e 12.5% de lipídeos.

3.5 Ingestão calórica

A ingestão alimentar foi acompanhada durante a última semana de indução, quando os animais foram alocados em caixas individuais. A ração foi inicialmente pesada, e, após 24 h o peso remanescente foi verificado e subtraído do peso inicial. Para calcular a ingestão calórica a quantidade consumida em gramas foi multiplicada pela densidade energética de acordo com cada dieta, HFD ou CT e, então, corrigida pelo peso corporal.

3.6 Taxa metabólica de repouso

Os animais foram adaptados à câmara do sistema de fluxo aberto de calorimetria indireta (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) por dez minutos durante uma semana. No dia do experimento o sistema foi previamente calibrado com uma mistura de gases (20.5% de O₂ e 0.5% de CO₂) com certificado padrão do fabricante White Martins. Cada animal foi pesado, e, em seguida alocado em uma câmara hermeticamente fechada (De Lima *et al.*, 2008). O consumo de oxigênio de repouso foi mensurado durante um período de trinta minutos, sendo os primeiros dez minutos utilizados para habituação, sendo assim descartados da análise.

3.7 GTT

Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas para a realização do GTT. Inicialmente, foi feita uma colheita basal de sangue pela cauda para análise da glicemia de jejum, em seguida, administrou-se D-glucose (2 mg/g de peso corporal, i.p.). Os níveis de glicose foram então analisados em amostras de sangue colhidas a 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção (Santos *et al.*, 2012). Em todas as colheitas a glicemia foi medida utilizando-se um glicosímetro Accu-Chek (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, Indiana).

3.8 Avaliação da secreção pulsátil de LH

Para a avaliação da secreção pulsátil de LH padronizamos no laboratório o método de colheita de sangue pela cauda do rato, seguindo metodologia descrita previamente em camundongos (Steyn *et al.*, 2013). Os animais foram treinados diariamente durante pelo menos 30 dias para o procedimento de colheita e transferidos para a sala do experimento uma semana antes da realização das coletas. No dia do experimento, um pequeno pique de aproximadamente 1 mm foi realizado na ponta da cauda com o auxílio de uma lâmina estéril, e, foram colhidas amostras de sangue de 10 µL a cada 6 minutos durante um período de 180 minutos, totalizando 30 amostras. As amostras de sangue, assim que pipetadas, foram imediatamente diluídas em tampão fosfato salina com tween 20 (PBS-T) e congeladas em gelo seco, e, a seguir transferidas para um freezer a -20 °C.

Juntamente à colheita seriada de sangue, padronizamos de forma modificada o ensaio de ELISA ultrasensível para LH. Inicialmente, foi realizado um teste da curva com padrão de LH para ratos (rLH), para isso seguimos o protocolo de ELISA para camundongos desenvolvido e validado por Steyn *et al.* (2013), porém, utilizamos o padrão rLH RP-3 (AFP718B, NIDDKNHPP, National Hormone and Peptide Program, Harbor-UCLA, Torrance, California,

USA). Após a verificação da funcionalidade do padrão para ratos, realizamos uma modificação no tempo de incubação da curva padrão e amostras, bem como do anticorpo de detecção. O protocolo desenvolvido por Steyn utilizava uma incubação de apenas 2 h com as amostras, e, uma vez que a quantidade de amostras pipetadas nas placas de ELISA para avaliação da secreção pulsátil de LH é alta, 30 amostras por animal, totalizando cerca de 480 poços no primeiro experimento, por exemplo, um tempo curto de incubação das mesmas exibiria uma diferença entre a leitura das últimas amostras pipetadas em relação às primeiras, podendo assim prejudicar a análise. Portanto, padronizamos um tempo de incubação de 24 h. Também aumentamos o tempo de incubação com o anticorpo de detecção de 90 min à temperatura ambiente para 24 h à 4° C sob agitação. Para que isso fosse possível, foram realizados testes com diferentes diluições de tampão de bloqueio (TB; 2.5%, 5%, 10%, 15% de leite em PBS-T), do anticorpo de captura (1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:7.000, 1:10.000), do anticorpo de detecção (1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000) e do anticorpo secundário (1:1.000, 1:1.500, 1:2.000). Por último, foi realizado um teste com diferentes diluições de plasma e sangue total (1:5, 1:10, 1:20, 1:40 em PBS-T). O anticorpo de captura utilizado foi o anti-LH bovino (bovine LH β 518B7 monoclonal antibody, University of California, Davis, USA) e a diluição de escolha de 1:2.500 em PBS, o TB foi leite desnatado Molico em PBS-T a 5% m/v, o anticorpo de detecção foi o anti-rLH 1:40.000 em TB (AFP718B, NIDDKNHPP, National Hormone and Peptide Program, Harbor-UCLA), e o anticorpo secundário foi o anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Polyclonal goat anti-rabbit IgG/HRP, P0448; Dako, USA) a 1:1.000 em 50% TB, 50% PBS. Foram pipetados 50 μ L de anticorpo de captura diluído em PBS em placas para Elisa de 96 poços (9018, Corning, Kennebunk, ME), as quais foram incubadas a 4 °C por 24 h. O anticorpo de captura foi decantado, e, as placas foram incubadas com 200 μ L de TB por 2 h em temperatura ambiente. A curva padrão foi preparada previamente com uma diluição seriada. As placas foram lavadas três vezes por 3 min com PBS-T, e, em seguida foram

pipetados nos poços 50 μ L de cada ponto da curva ou amostras. As placas foram então incubadas a temperatura ambiente por 24 h. Após serem lavadas, as placas foram incubadas por 24 h à 4 °C com o anticorpo de detecção. As placas foram então incubadas por 90 min com 50 μ L do anticorpo secundário diluído em uma solução 50% PBS e 50% TB. As placas foram novamente lavadas e, para revelação, os poços foram incubados por 45 min com 100 μ L de uma solução preparada com 1 tablete de o-fenilenodiamina (OPD, 00-2003; Invitrogen, USA) diluído em tampão citrato (pH 5.0) contendo 0.02% de peróxido de hidrogênio. Após o tempo determinado, a reação foi interrompida com 50 μ L de HCL 3 M. As placas foram lidas no Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) em um comprimento de onda de 490 nm, e o comprimento de onda de 650 nm foi usado para correção de fundo. As concentrações de LH foram determinadas por interpolação da densidade óptica das amostras a partir de regressão não linear da curva padrão de LH. O menor limite de detecção foi de 0.07 ng/mL, os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 3.3% e 10.4%, respectivamente. A figura 1 demonstra a curva padronizada de 0.01 a 2.5 ng/mL de rLH ($r^2 = 0.998$) e o teste de diluição das amostras em ratos machos intactos e fêmeas ovariectomizadas tratadas com estradiol. As amostras de sangue total foram utilizadas em uma diluição 1:20 em PBS-T.

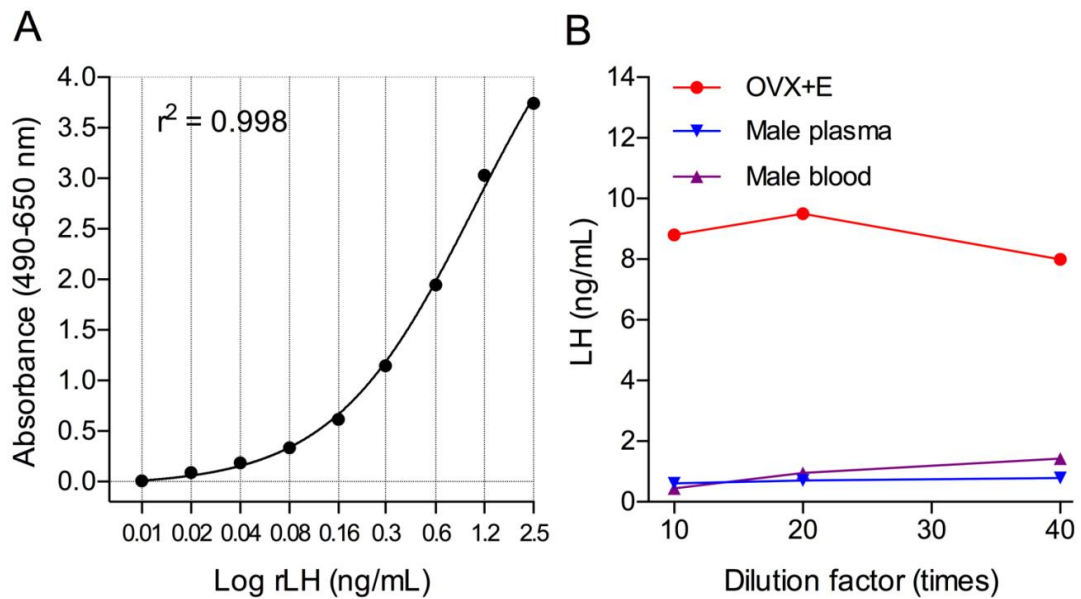


Figura 1. Padronização do ELISA ultrasensível para avaliação da secreção pulsátil de LH de rato. (A) Curva de calibração para rLH em escala semi-logarítmica. (B) Teste de diluição (1:10, 1:20, 1:30 e 1:40 em PBS-T) de amostras de plasma (Male plasma) e sangue total (Male blood) de rato e de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol no momento do pico de LH (OVX+E).

3.9 Perfusão e processamento dos cérebros para Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados, em seguida para a exsanguinação foram perfundidos por via transcardíaca com 50 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS, 0.01 M) heparinizado (10 UI/mL). Posteriormente, para fixação foram perfundidos com 400 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4% preparada em tampão fosfato (PB, 0.1M, pH 7.4). Depois de retirados, os cérebros foram ainda pós-fixados em PFA 4% durante 2 h. Para a crioproteção dos cérebros, os mesmos foram armazenados em solução de sacarose (30%, em PB 0.1 M) em refrigerador a 4 °C até que atingissem a saturação, a qual é observada quando os cérebros, que, inicialmente flutuavam em solução, precipitam-se no fundo do recipiente. A seguir, os cérebros foram congelados por imersão, durante um período de 1 min, em uma solução de isopentano 99% (C₅H₁₂) a -50 °C e imediatamente armazenados em um freezer -80 °C. Os cortes foram obtidos utilizando-se um criostato. De acordo com o atlas de (Paxinos e Watson, 2007) foram realizadas quatro sé-

ries de secções coronais de 30 µm da extensão rostrocaudal do ARC. As secções foram armazenadas em solução crioprotetora a -20 °C até a realização da imunohistoquímica (Watson *et al.*, 1986).

3.10 Imunohistoquímica e análise das imagens

A marcação simples de Kp foi realizada pelo método *free-floating* (Szawka *et al.*, 2010). As secções do ARC foram inicialmente retiradas da solução crioprotetora em que estavam guardadas, e, então, lavadas com uma solução de PBS (0.01M) por 10 vezes, sendo que cada lavagem teve a duração de seis minutos. Os cortes foram então lavados por dez minutos com glicina em PBS (0.01 M), assim os sítios antigênicos mascarados pelo PFA (4%) durante a fixação podem ser expostos. A seguir, entre cada etapa de incubação as secções passaram por lavagens com PBS (0.01 M). As secções foram incubadas em H₂O₂ (1%) durante trinta minutos, a fim de bloquear as peroxidases endógenas, e, posteriormente, incubadas durante trinta minutos com TX-100 (0.4%). Este último, permeabiliza a membrana celular, desta forma permite a difusão dos anticorpos. Posteriormente, para reduzir as possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos, os cortes foram incubados pelo período de 1 h em albumina bovina (BSA, 3%). Por último, neste primeiro dia de ensaio, as secções foram incubadas com o anticorpo primário anti-Kp-10 produzido em coelho (AB9754; Millipore; 1:30.000). As secções permaneceram incubadas pelo período de 48 h em refrigerador à 4 °C. A seguir, o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA; 1:2000) foi utilizado para incubação dos cortes pelo período de 2 h. Em seguida, as secções foram incubadas em avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories, 1:400). Após esta etapa, além da lavagem habitual em PBS entre as incubações, os cortes foram também lavados em tampão acetato (0.175 M, pH 7.6). Para a revelação foi utilizada uma solução contendo 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma-29 Aldrich), sulfato de níquel (Ni,

25 mg/mL) e H₂O₂ (0.083 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em tampão acetato (0.175M, pH 7.6). Para montagem das secções foram utilizadas lâminas gelatinizadas, que a seguir foram desidratadas e as lamínulas coladas com Entellan (Merck).

Fotomicrografias bilaterais das porções médio-posteriores do núcleo ARC (aproximadamente entre -2,4 e -3,9 mm do bregma)(Paxinos e Watson, 2007) foram obtidas utilizando-se um sistema de aquisição de imagens ligado a um microscópio óptico e os neurônios imunorreativos à kisspeptina (kisspeptina-ir) foram identificados por possuírem citoplasma corado em preto. Em estudo prévio do laboratório, foi demonstrado que a pré-adsorção do anticorpo primário com kisspeptina-10 bloqueia a marcação de kisspeptina (Araujo-Lopes *et al.*, 2014). Quatro secções do ARC, por animal, foram quantificadas bilateralmente para o número de neurônios kisspeptina-ir sem o conhecimento dos grupos experimentais durante as análises.

3.11 qPCR

Após a decapitação dos animais, os cérebros foram removidos e imediatamente congelados em gelo seco, e, em seguida dissecados pelo método de punch (Palkovits, 1973). O núcleo ARC foi dissecado para se determinar a expressão do RNAm para *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn*, e, a POA para determinação do *Gnrh*. A adenohipófise, por sua vez, foi dissecada para determinação da expressão do RNAm para *Gnrhr* e *Lhb*. Em todos os tecidos, *Gapdh* foi utilizado como gene normalizador. Os punches foram realizados dentro do criostato, utilizando-se uma agulha de 2 mm de diâmetro, em seguida os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de uma seringa de 1 mL em 500 µL de Tri-Reagent-LS (Life Technologies) e então congelados em freezer à -80 °C. Para a extração total de RNAm, foram adicionados mais 500 µL de Tri-Reagent-LS. A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg do RNA total, utilizando-se o kit Superscript III (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). O cDNA sintetizado foi amplificado utilizando-se 4 µL de cDNA, 600 nM de cada primer, 10 µL do reagente SYBR Green, água

DNase e RNase-free conforme descrito pelo fabricante (kit Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). As reações foram realizadas em um termociclador ABI-PRISMA 7900, nas seguintes condições: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C. Em seguida foi realizada análise da curva de dissociação nas seguintes condições: 1 min a 60 °C, 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C e 80 ciclos de 10 segundos a 55 °C, com aumento gradativo de 0,5 °C. A análise da expressão gênica foi feita pela comparação do número de cópias do RNAm entre os grupos experimentais, o qual foi inferido de acordo com o número de ciclos necessários para atingir um sinal de fluorescência superior ao nível basal (CT). A expressão relativa de RNAm foi calculada segundo o método que utiliza a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001), onde o ΔCT foi determinado pela subtração dos valores de CT do gene de interesse e do respectivo gene normalizador. O $\Delta\Delta CT$ foi obtido pela subtração do valor de ΔCT de cada amostra pelo ΔCT das amostras do grupo calibrador (grupo CT). A exponencial negativa na base 2 do valor de $\Delta\Delta CT$ forneceu a medida do número de vezes que o RNAm do gene de interesse variou em relação ao grupo controle. Na Tabela 2 são apresentados os primers utilizados para amplificação.

Tabela 2. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.

Gene	Primers (5' → 3')
<i>Kiss1</i>	F: AGCCACTGGCAAAAATGGC R: ATTAACGAGTTCCTGGGGTCC
<i>Nkb</i>	F: ATAGGCCAGCAGTGCAGAAA R: AGCCAACAGGAGGACCTTG
<i>Pdyn</i>	F: ATGGGGATCAGGTAGGGCAT R: ACCGAGTCACCACCTTGAAC
<i>Gnrh</i>	F: TGGTATCCCTTTGGCTTTCACA R: TGATCCTCCTCCTTGCCCAT
<i>Gnrhr</i>	F: CAGCGCTTTGCGTTCAGTTA

	R: CAAGGACGGGCTTCAAGAGT
<i>Lhb</i>	F: AGAATGGAGAGGCTCCAGGG
	R: GCAGACTGGGCAGAACTCAT
<i>Gapdh</i>	F: ACAGCCGCATCTTCTTGTGC
	R: GCCTCACCCCATTTGATGTT

F = Forward; R = Reverse.

3.12 Cirurgia estereotáxica e microinjeção i.c.v.

Os animais anestesiados foram submetidos à canulação do ventrículo lateral por meio da cirurgia estereotáxica. A calota craniana foi tricotomizada, em seguida, a mesma região foi submetida à assepsia, uma incisão longitudinal foi realizada e anestésico local foi aplicado (cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina 1:200.000). Os animais foram então colocados ao estereotáxico para animais de pequeno porte (David Kopf Instruments, M-900, Tujunga, CA, USA). Utilizando-se uma broca odontológica uma craniotomia foi realizada para o implante de uma cânula guia (22 G, 16 mm). A posição da cânula no ventrículo lateral direito (AP: 1.0 mm posterior ao bregma, ML: 1.6 mm à direita da sutura longitudinal e DV: 3.2–3.6 mm abaixo da calota craniana) seguiu as coordenadas estabelecidas a partir do atlas de (Paxinos e Watson, 2007). A fim de se verificar se o posicionamento da cânula no ventrículo lateral estava correto foi observado o deslocamento do menisco em um manômetro preenchido com salina estéril. Para a fixação da cânula foram utilizados dois parafusos de aço inoxidável e acrílico odontológico autopolimerizável. Por fim, para evitar que a cânula permanecesse aberta até o dia do experimento, a mesma foi ocluída com um mandril de aço inox (diâmetro 0,40 mm). Os animais foram adaptados diariamente à manipulação do mandril pelo período de uma semana. No dia do experimento, o mandril foi retirado, e, foi inserida através da cânula guia uma agulha injetora (27 G) conectada a uma seringa de 50 µL (Hamilton Company, Reno, NV, USA) por meio de um tubo de polietileno (PE-10). Utilizando-se uma bomba de infusão

(KdScientific, Legato 100, Holliston, MA, USA) foi realizada a micro injeção i.c.v em um fluxo de 1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.13 Orquiectomia bilateral

Os animais anestesiados foram fixados com esparadrapo em camas cirúrgicas em posição de decúbito dorsal. Foi realizada a assepsia do escroto, em seguida uma incisão na linha mediana do mesmo foi feita, os tecidos subjacentes foram divulsionados até que a túnica albugínea fosse exposta. A seguir o testículo foi pressionado para sua exteriorização a partir da incisão cirúrgica. Utilizando-se um fio realizou-se a ligadura dos funículos espermáticos, bem como dos vasos sanguíneos, realizando-se em seguida a secção para retirada do testículo. Repetiu-se o mesmo procedimento para remoção do testículo contralateral. Por último, o escroto foi suturado.

3.14 ELISA para testosterona

Inicialmente as amostras de plasma foram extraídas em éter, para isso 1.0 mL de éter etílico grau HPCL foi adicionado em 60 μL de plasma, em seguida os tubos contendo éter e plasma foram vedados com plástico filme e agitados em vórtex duas vezes por 60 segundos cada. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4500 rpm durante 20 min a 4 °C, logo em seguida foram colocados por trinta minutos em freezer -80 °C. Passados os trinta minutos, os tubos foram retirados do freezer e a fase líquida pipetada em eppendorfs. Estes últimos permaneceram abertos para que o éter etílico evaporasse, posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 40 μL do tampão do ensaio, e, agitadas duas vezes por sessenta segundos em vórtex. Os eppendorfs foram levados a centrifuga resfriada à 4 °C à 13000 rpm durante vinte minutos. O sobrenadante após centrifugação foi utilizado para a dosagem da testosterona

em kit comercial (Testosterone Elisa, EIA-1559, DRG Instruments GmbH, Alemanha). Foram pipetados 25 μL de solução padrão e amostras nos poços da placa. A seguir, adicionou-se 200 μL da enzima conjugada (hormônio conjugado com peroxidase *horseradish*), a placa foi agitada por 10 segundos e incubada por 1h. A placa foi então lavada com a solução de lavagem do próprio kit. Posteriormente, 200 μL da solução substrato (TMB, tetrametilbenzidina) foram adicionados nos poços e a placa incubada por 15 minutos. Para interromper a reação foram pipetados 100 μL de H_2SO_4 (0.5M), e, em seguida a placa foi lida no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de testosterona foram determinadas por interpolação da densidade óptica das amostras a partir de regressão não linear da curva padrão de testosterona.

3.15 ELISA para estradiol

Inicialmente as amostras de plasma foram extraídas em éter como descrito anteriormente no ensaio de ELISA para testosterona. O estradiol foi dosado por kit comercial (Estradiol Elisa, EIA-2693-96, DRG Instruments GmbH, Alemanha). Foram pipetados 25 μL de solução padrão e amostras extraídas nos poços da placa. Em seguida, adicionou-se 200 μL da enzima conjugada (hormônio conjugado com peroxidase *horseradish*), e, então a placa foi agitada por 10 segundos e incubada pelo período de 2 h. Após este período, a placa foi lavada com a solução de lavagem do próprio kit. Posteriormente, 100 μL da solução substrato (TMB, tetrametilbenzidina) foram adicionados nos poços e a placa incubada por 15 minutos. Por último, foram pipetados 50 μL de H_2SO_4 (0.5M) para interromper a reação. A placa foi lida no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de estradiol foram determinadas por interpolação da densidade óptica das amostras a partir de regressão não linear da curva padrão de estradiol.

3.16 Análise da secreção pulsátil de LH

Os pulsos de LH foram detectados utilizando-se o algoritmo de detecção de pulsos Dynpeak (Vidal *et al.*, 2012). Os parâmetros de detecção de pulso foram utilizados conforme a configuração padrão do algoritmo, exceto para o limiar global relativo (*global relative threshold*), o qual foi aumentado de 20% para 50%, como objetivo de reduzir a detecção de pulsos falsos positivos. A frequência dos pulsos foi determinada calculando-se o número de pulsos por hora durante o período avaliado (180 min). A amplitude dos pulsos foi definida como a diferença entre o valor de pico do pulso e o seu respectivo nadir. O LH médio foi calculado pela média de todos os valores de LH obtidos durante o período avaliado.

3.17 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm EPM. Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak, ou ainda pelo teste t de Student, conforme o desenho experimental. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Avaliação da secreção pulsátil de LH e controle do eixo gonadal em ratos obesos

Caracterização da obesidade induzida por dieta hiperlipídica

Os animais tratados com HFD apresentaram maior peso corporal após as treze semanas de indução, sendo que demonstraram 32.4% a mais de ganho de peso em relação aos animais CT ($P < 0.01$; Figura 2 A, B).

Além disso, o acompanhamento da ingestão alimentar na fase final do tratamento com a dieta hiperlipídica indicou que o grupo HFD teve uma maior ingestão calórica ($P < 0.05$; Figura 2 C). Por sua vez, na análise da taxa metabólica de repouso, os ratos HFD demonstraram também um aumento no consumo de oxigênio comparado ao grupo CT ($P < 0.05$; Figura 2 D), o que provavelmente se deve ao aumento da massa corporal do grupo HFD, além de que a ingestão de uma dieta hipercalórica deve levar a uma compensação no gasto energético, elevando assim a taxa metabólica. Corroborando este dado, já foi demonstrado na literatura que indivíduos obesos apresentam maior taxa metabólica (Leibel, Rosenbaum e Hirsch, 1995; De Lima *et al.*, 2008; Lam e Ravussin, 2017).

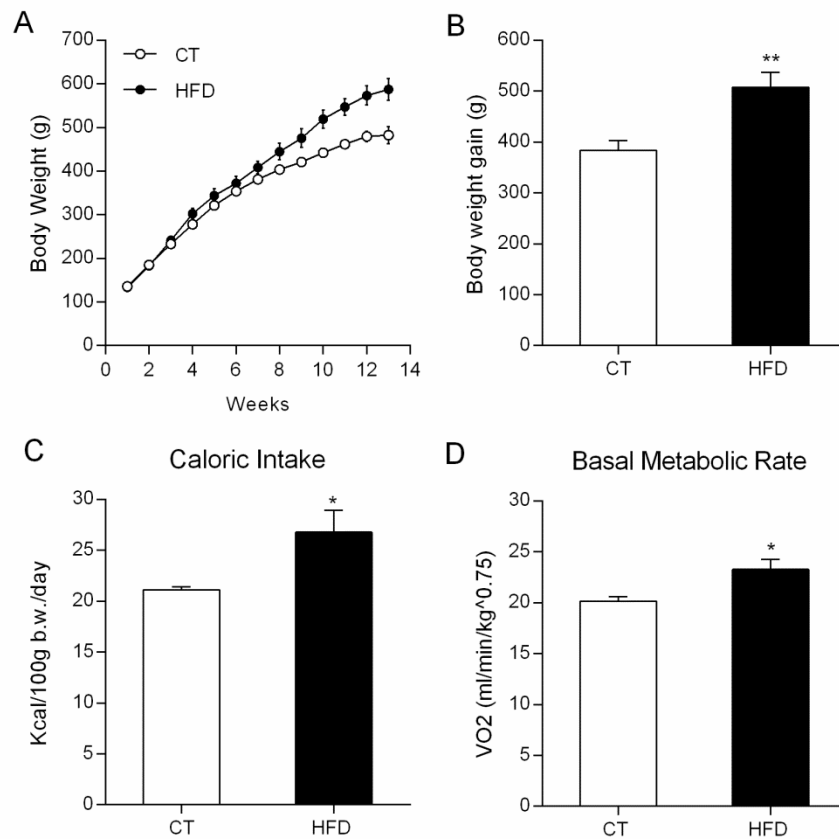


Figura 2. Caracterização da obesidade induzida por HFD. Ratos receberam dieta CT ou HFD durante 13 semanas. (A) Acompanhamento do peso corporal durante as treze semanas de tratamento. (B) Ganho de peso corporal após as treze semanas de tratamento. (C) Média do valor diário da ingestão calórica (kcal) por 100g de peso corporal durante a última semana de tratamento, quando os animais foram mantidos em caixas individuais. (D) Consumo de oxigênio (VO₂) em repouso. Resultados expressos em média ± EPM. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ HFD em relação ao grupo CT. Determinado por teste t de Student.

O índice de adiposidade calculado através dos pesos dos tecidos adiposos brancos retroperitoneal, mesentérico e epididimal demonstrou um aumento de quase 3 vezes no grupo HFD em relação ao CT. Assim, o peso corporal aumentado dos animais tratados com HFD esteve associado a uma maior deposição de gordura em tais coxins adiposos. O índice de adiposidade maior no grupo HFD em relação ao grupo CT é apresentado na Tabela 3 ($P < 0.001$). Adicionalmente, os animais HFD demonstraram valores aumentados do índice de Lee quando comparados com os animais CT, confirmando o desenvolvimento de obesidade ($P < 0.01$, Tabela 3).

Tabela 3. Índice de adiposidade e de Lee de animais tratados com dieta CT ou HFD

	CT	HFD
Adiposity Index (%)	3,33 ± 0,37	9,07 ± 0,80 ***
Lee Index	0,295 ± 0,02	0,309 ± 0,03 **

Valores expressos como média ± EPM ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ em relação ao grupo CT. Determinado por teste *t* de Student.

O grupo HFD demonstrou ainda diferença no perfil glicêmico durante o GTT em relação ao grupo CT. Os animais tratados com HFD apresentaram níveis de glicose maiores em todos os tempos 15, 30, 60 e 120 min após a sobrecarga glicêmica quando comparados com os animais CT (Figura 3). A análise da área sob a curva (AUC) de glicemia demonstrou também um aumento da resposta integrada no grupo HFD em relação ao grupo CT ($P < 0.001$). Estes dados comprovam, portanto, uma tolerância à glicose diminuída nos ratos HFD, indicando que o protocolo de dieta hiperlipídica foi eficiente em causar alteração metabólica nos animais.

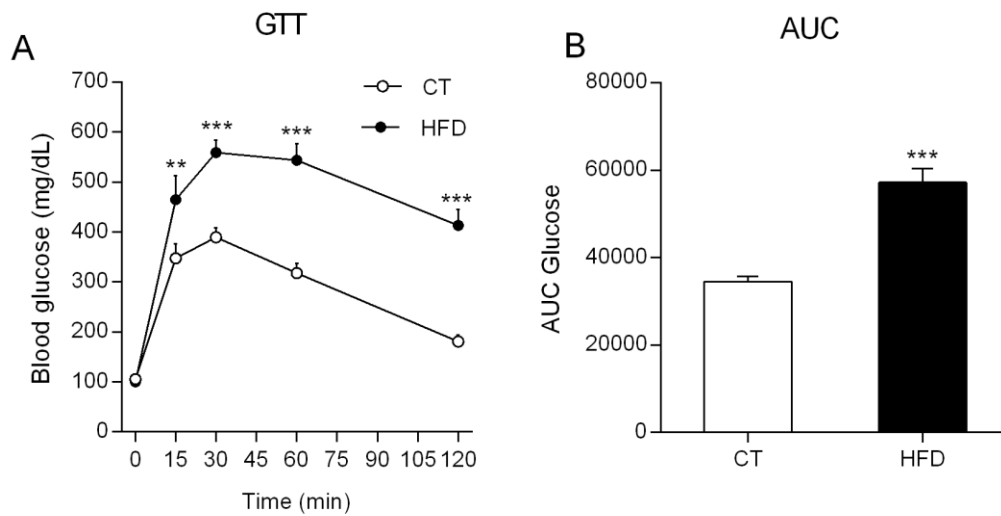


Figura 3. Curva de tolerância à glicose em ratos tratados com HFD. Os animais receberam dieta CT ou HFD durante 13 semanas. (A) O teste de tolerância à glicose (GTT) foi determinado após injeção intraperitoneal de glicose (2 mg/g de peso corporal), o nível sanguíneo de glicose foi medido aos 0 min (antes da injeção) e aos 15, 30, 60 e 120 min após a injeção. (B) Área sob a curva (AUC). Resultados expressos em média \pm EPM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ em relação ao grupo CT. Determinado por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak, e, para AUC, determinado pelo teste t de Student.

Secreção pulsátil de LH e controle do eixo gonadal

Exemplos representativos da secreção pulsátil de LH em ratos CT e HFD são apresentados na Figura 4. A análise da pulsatilidade do LH revelou redução de 50% na amplitude dos pulsos e de 36% na concentração média de LH nos ratos HFD em comparação aos CT ($P < 0.05$; Figura 4 D e 4 E), enquanto a frequência dos pulsos não foi alterada (Figura 4 C).

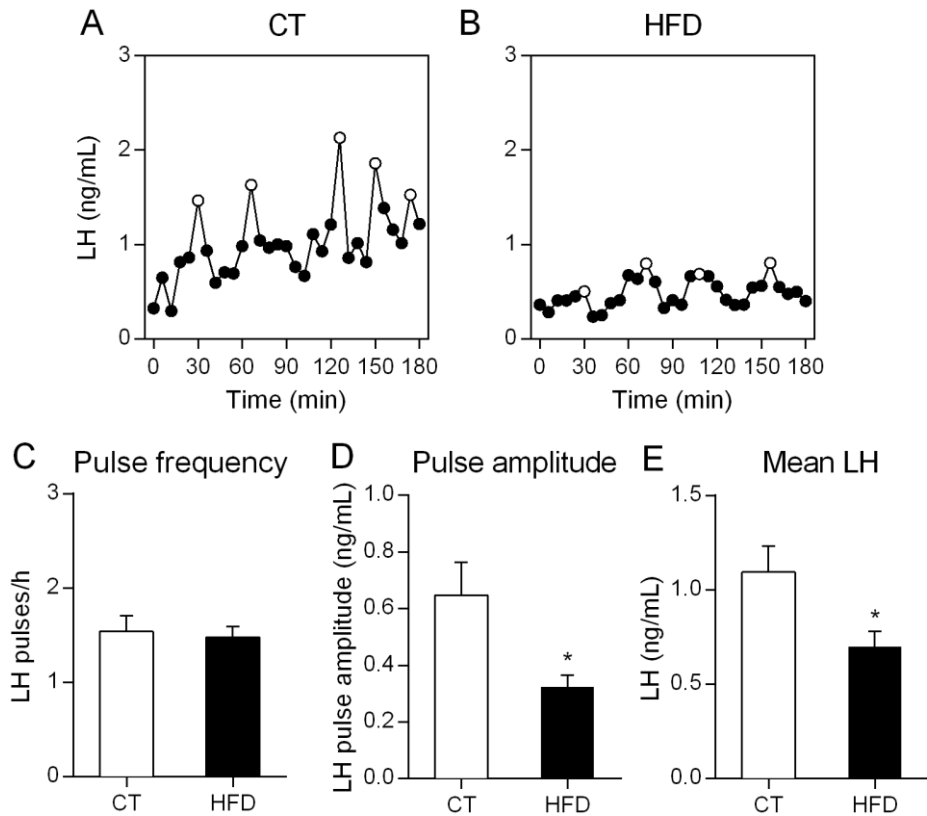


Figura 4. Efeito da HFD sobre a secreção pulsátil de LH. Ratos receberam dieta CT ou HFD durante 13 semanas. (A, B) Secreção pulsátil de LH representativa de um rato CT (A) e um rato HFD (B). Os círculos brancos indicam os pulsos detectados. (C) Frequência de pulsos de LH. (D) Amplitude de pulsos de LH. (E) LH médio. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0.05$ HFD em relação ao grupo CT, determinado por Teste t de *Student*.

Como podemos observar houve um possível comprometimento do eixo HPG em animais HFD. Desta forma, avaliamos em seguida a imunorreatividade à Kp no núcleo ARC. A Figura 5 apresenta fotomicrografias de secções coronais do núcleo ARC em animais CT e HFD onde foi realizada a marcação simples para Kp (Figura 5 A e 5 B). Verificamos que, após as 13 semanas de dieta, houve uma redução de 30% no número de neurônios imunorreativos à Kp no ARC dos animais HFD em relação ao CT ($P < 0.05$) (Figura 5 C). Este resultado sugere que uma menor expressão de kisspeptina em animais obesos provocaria redução do efeito estimulatório destes neurônios sobre os neurônios GnRH, diminuindo assim a pulsatili-

dade dos mesmos.

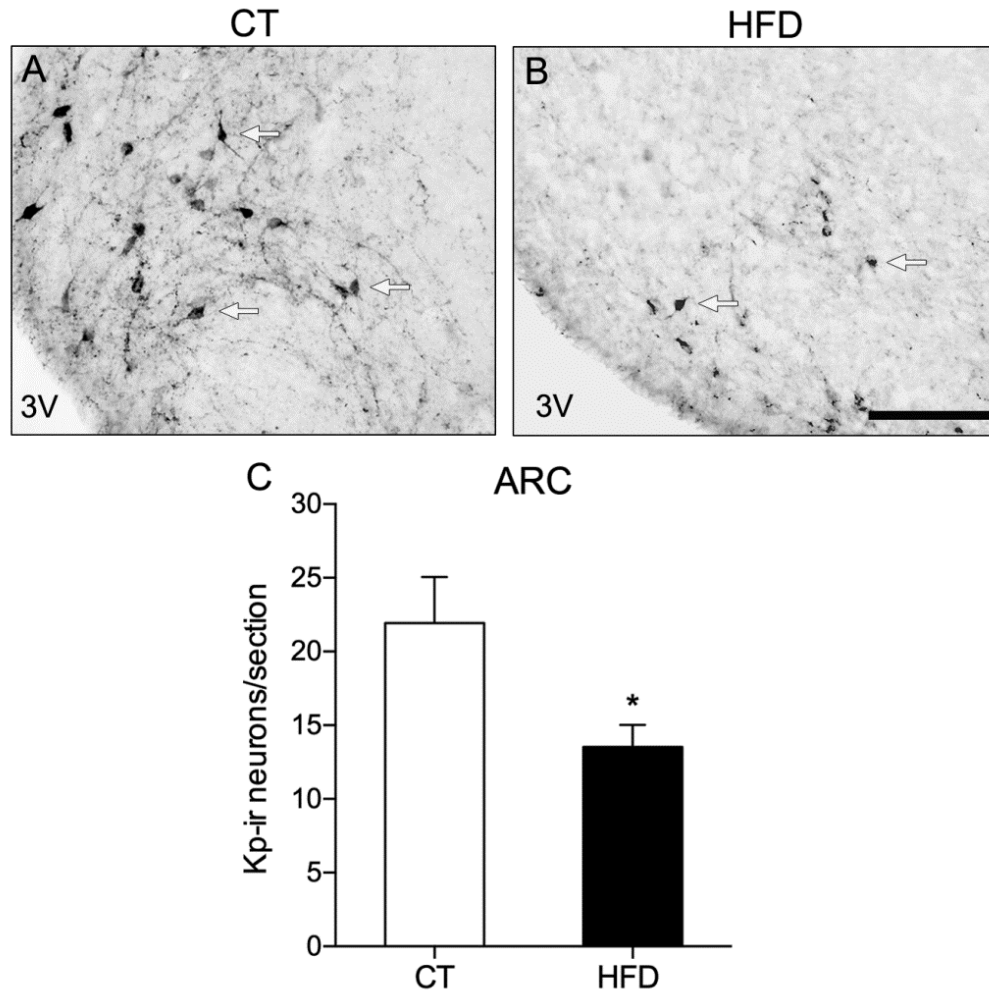


Figura 5. Efeito da HFD sobre a expressão de Kp no ARC. Ratos foram perfundidos após 13 semanas recebendo dieta CT ou HFD. (A, B) Fotomicrografias representativas da imunorreatividade à Kp (Kp-ir) no ARC de um rato CT (A) e HFD (B). (C) média ± EPM do número de neurônios Kp-ir por secção no ARC. * $P < 0.05$ HFD em relação ao grupo CT, determinado por Teste t de *Student*. Setas indicam exemplos de neurônios Kp-ir. Escala: 100 μ m.

Adicionalmente, utilizamos qPCR para avaliar a expressão do RNAm de *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* que são co-expressos nos neurônios KNDy do ARC. Observamos que, no ARC, houve redução de 35% nos níveis do RNAm de *Nkb* em animais HFD ($P < 0.01$, Figura 6 B) enquanto não houve alteração na expressão de *Kiss1* ou *Pdyn* comparados aos animais CT (Figura 6 A e 6 C). Além disso, a expressão de *Gnrh* na APO apresentou redução de 29% no

grupo HFD em relação ao CT (Figura 6 D).

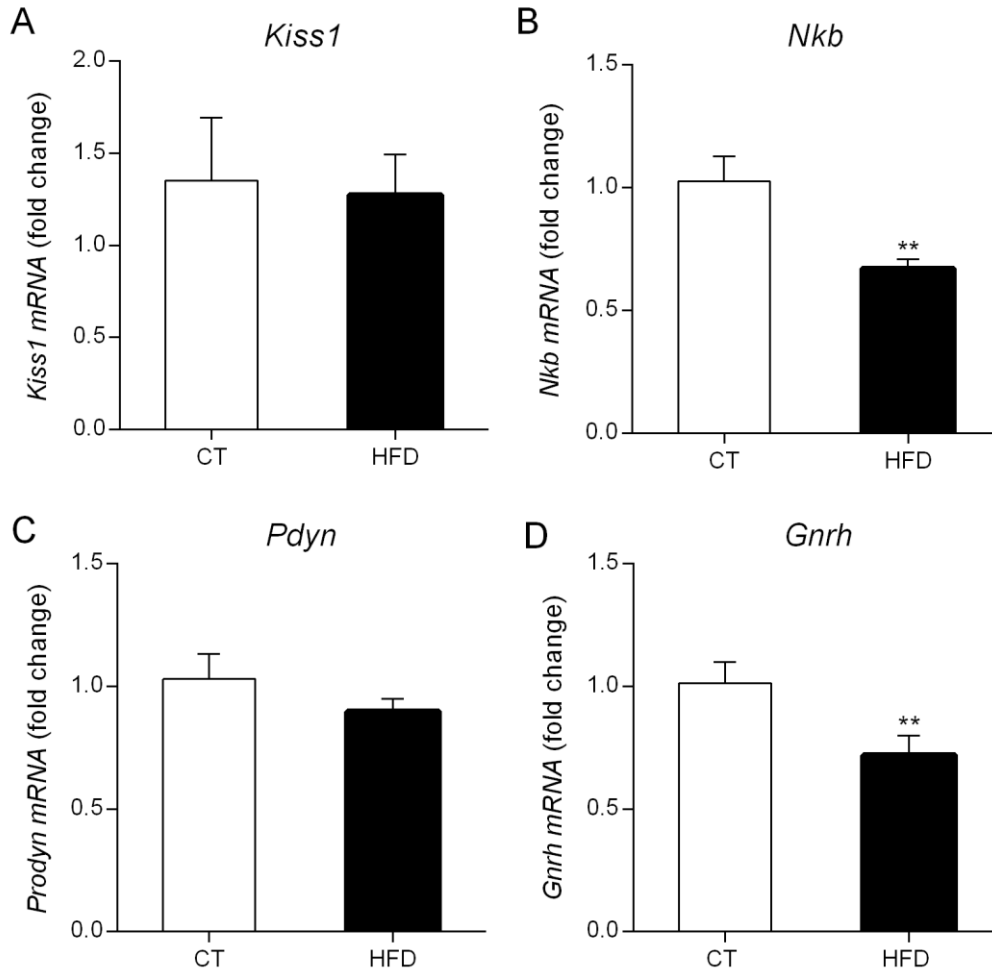


Figura 6. Efeito da HFD sobre a expressão dos genes de peptídeos KNDy e GnRH. Ratos foram tratados com dieta CT ou HFD. Os animais foram decapitados após a indução, os cérebros foram removidos rapidamente e processados para qPCR. Dados normalizados pelos níveis de *Gapdh*. Média \pm EPM da expressão do RNAm de *Kiss1* (A), *Nkb* (B) e *Pdyn* (C) no ARC e *Gnrh* na APO (D). ** $P < 0.01$ em relação ao grupo CT. Determinado por Teste *t* de Student.

Na adenohipófise, por sua vez, o qPCR revelou redução de aproximadamente 35% nos níveis de RNAm tanto de *Gnrhr* ($P < 0.01$) quanto de *Lhb* ($P < 0.01$) no grupo HFD comparado com CT (Figura 7 A e 7 B).

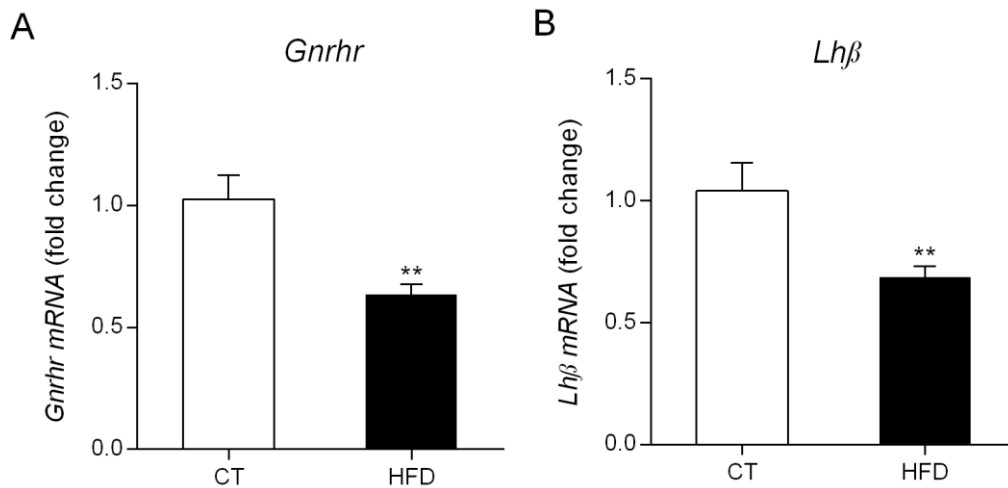


Figura 7. Efeito da HFD sobre a expressão dos genes do receptor para GnRH (*Gnrhr*) e da cadeia β do LH (*Lhb*) na adenohipófise. Ratos foram tratados com dieta CT ou HFD. Os animais foram decapitados após a indução, os cérebros foram removidos rapidamente e processados para qPCR. Dados normalizados pelos níveis de *Gapdh*. Média \pm EPM dos níveis de RNAm de *Gnrhr* (A) e *Lhb* (B). ** $P < 0.01$ em relação ao grupo CT. Determinado por Teste t de Student.

4.2 Experimento 2: Efeito da Kp i.c.v. sobre a secreção pulsátil de LH em ratos obesos

A Figura 8 mostra a pulsatilidade de LH nos grupos CT e HFD tratados com Kp-10 i.c.v. ou veículo. Corroborando os dados do experimento anterior, o grupo HFD tratado com veículo apresentou redução na amplitude dos pulsos e LH médio quando comparado com o grupo CT+V ($P < 0.05$, figura 8 F e 8 G), enquanto não houve diferença na frequência dos pulsos (Figura 8 E). O tratamento com Kp-10, por sua vez, aumentou a amplitude dos pulsos ($P < 0.05$) e o LH médio ($P < 0.001$) em ambos os grupos CT+Kp e HFD+Kp quando comparados com CT+V e HFD+V, respectivamente (Figura 8 F e 8 G). Com relação à frequência dos pulsos, não foram observadas alterações entre os grupos após o tratamento com kp-10 (Figura 8 E). Estes dados confirmam o efeito estimulatório da kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH como podemos observar pelo aumento do mesmo no grupo CT+Kp, e, reforça a hipótese de que a diminuição do LH vista em animais HFD deve-se à diminuição da Kp, uma vez

que quando estes animais são tratados com Kp-10 tanto a amplitude dos pulsos quanto o LH médio são restaurados aos níveis normais.

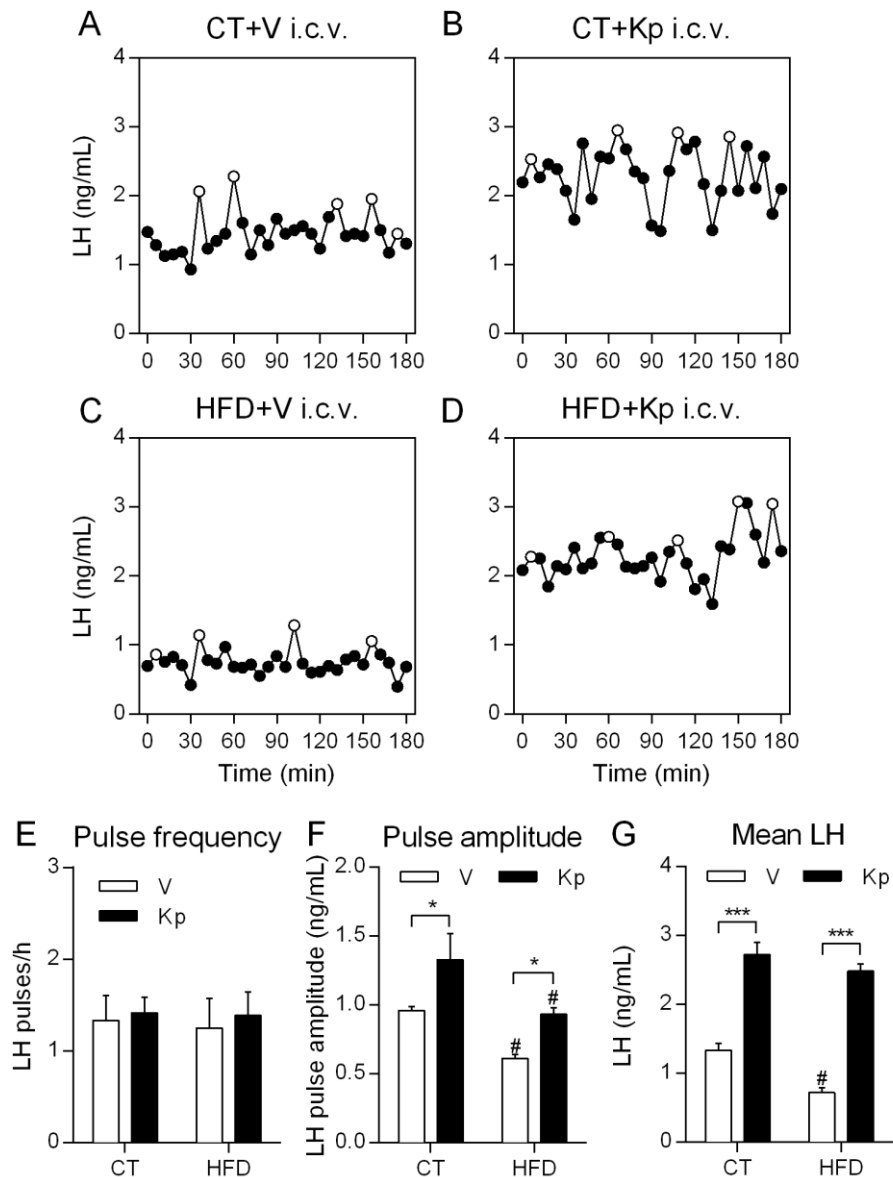


Figura 8. Efeito do tratamento com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH em ratos CT e HFD. Os ratos foram tratados com dieta CT ou HFD. Ao final da indução os animais receberam uma micro-injeção i.c.v. com 1.2 nmol de Kp-10 (HFD+Kp e CT+Kp) ou veículo (HFD+V e CT+V), após trinta minutos da injeção foi realizada a coleta seriada de sangue pela cauda para avaliação da secreção pulsátil de LH por ELISA. (A, B, C e D) Exemplos de secreção pulsátil de LH representativas de animais CT+V (A), CT+Kp (B), HFD+V (C) e HFD+Kp (D). (E) Frequência de pulsos de LH. (F) Amplitude de pulsos de LH. (G) LH médio. Resultados expressos em média \pm EPM. # $P < 0.05$ HFD+V versus CT+V, HFD+Kp versus CT+Kp. * $P < 0.05$ CT+Kp versus CT+V e HFD+Kp versus HFD+V. *** $P < 0.001$ CT+Kp versus CT+V e HFD+Kp versus HFD+V. Determinado por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak.

4.3 Experimento 3: Avaliação da resposta do LH à castração em ratos obesos

A hipersecreção de LH em resposta à orquiectomia foi avaliada como demonstrado na figura 9. Como esperado, ratos CT CAST após dez dias da castração apresentaram aumento no LH sanguíneo quando comparado com os níveis na situação INT ($P < 0.05$). A hipersecreção de LH em resposta à castração em animais HFD, por sua vez, foi significativamente atenuada. Os ratos HFD CAST apresentaram níveis de LH aproximadamente 46% menores quando comparados com ratos CT CAST ($P < 0.05$).

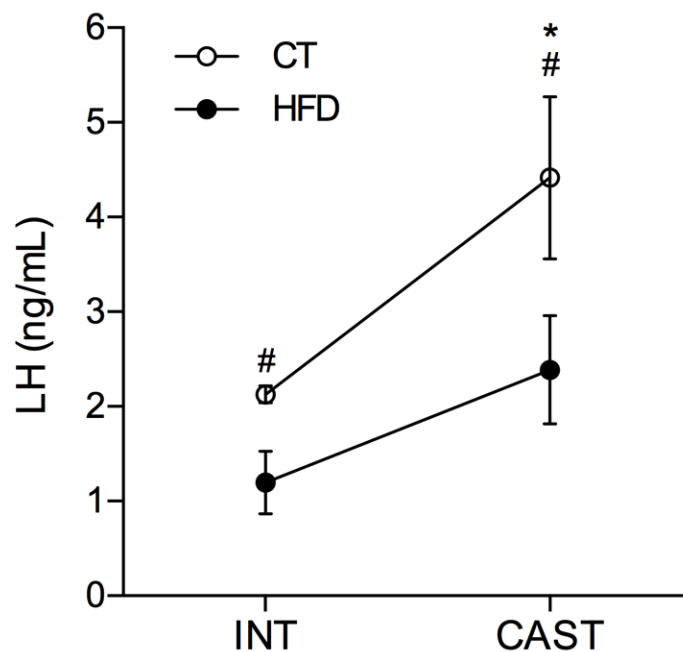


Figura 9. Efeito da castração sobre a secreção de LH em ratos tratados com HFD. Os animais do experimento 2 tratados com veículo, após uma semana da coleta seriada de sangue, foram submetidos à orquiectomia bilateral. Dez dias após a castração foi realizada outra coleta de sangue seriada pela cauda durante meia hora para avaliação dos níveis de LH dos animais. Foram utilizadas as médias das amostras de sangue (colhidas a intervalos de 6 min) nas condições INT e CAST para cada rato. Resultados expressos em média \pm EPM. # $P < 0.05$ CT CAST e CT INT versus HFD INT. * $P < 0.05$ CT CAST versus HFD CAST e CT INT. Determinado por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak.

De forma complementar, a figura 10 demonstra fotomicrografias de secções coronais do núcleo ARC em ratos CT CAST e HFD CAST em que foi realizada a marcação simples para Kp (Figura 10 A e 10 B). Os animais HFD CAST exibiram deficiência na resposta de aumento da expressão de Kp no ARC após a castração, apresentando número de neurônios imunorreativos à Kp 37.8% menor em relação ao CT CAST ($P < 0.05$).

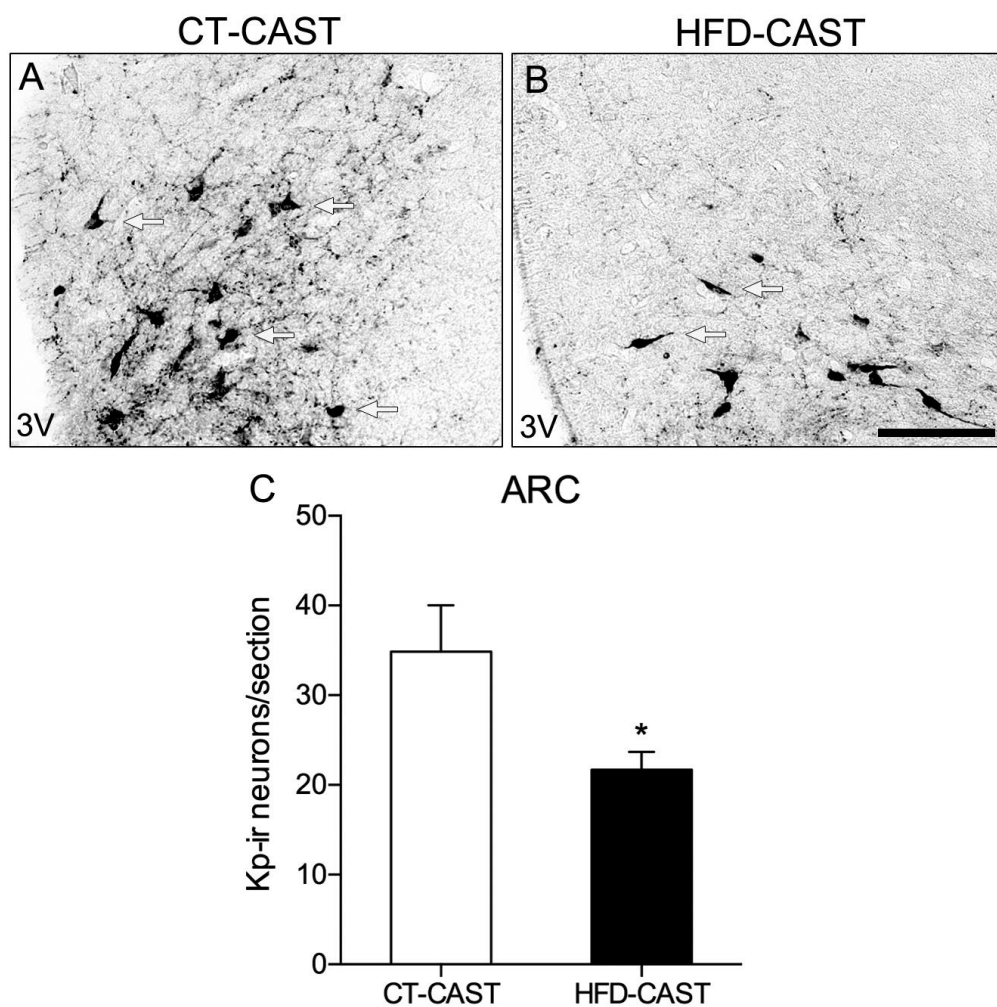


Figura 10. Efeito da castração sobre a expressão de Kp no ARC em ratos tratados com HFD. Ratos tratados com dieta CT ou HFD castrados foram perfundidos após coleta de sangue seriada. (A, B) Fotomicrografias representativas da imunorreatividade à Kp (Kp-ir) no ARC de um rato CT-CAST (A) e HFD-CAST (B). (C) média \pm EPM do número de neurônios Kp-ir por secção no ARC. * $P < 0.05$ HFD-CAST em relação ao grupo CT-CAST, determinado por Teste t de *Student*. Setas indicam exemplos de neurônios Kp-ir. Escala: 100 μ m.

4.4 Experimento 4: Efeito do tratamento s.c. com Kp sobre a secreção pulsátil de LH

Exemplos representativos da secreção pulsátil de LH em ratos CT tratados s.c. com baixas doses (1 nmol ou 3 nmol/rato) de Kp-10 ou salina são apresentados na Figura 11. O grupo CT tratado com 1 nmol de Kp-10 não apresentou diferença na pulsatilidade de LH quando comparado com o grupo CT+S. Por outro lado, o tratamento com 3 nmol de Kp-10 aumentou a amplitude dos pulsos de LH ($P < 0.05$) quando comparado com CT+S e CT+Kp 1nmol (Figura 11 E), enquanto não exerceu efeito sobre a frequência dos pulsos (Figura 11 D) ou o LH médio (Figura 11 F). Estes dados demonstram um efeito estimulatório do tratamento s.c. com 3 nmol Kp-10 sobre a amplitude dos pulsos de LH, e a ausência de efeito para a dose de 1 nmol.

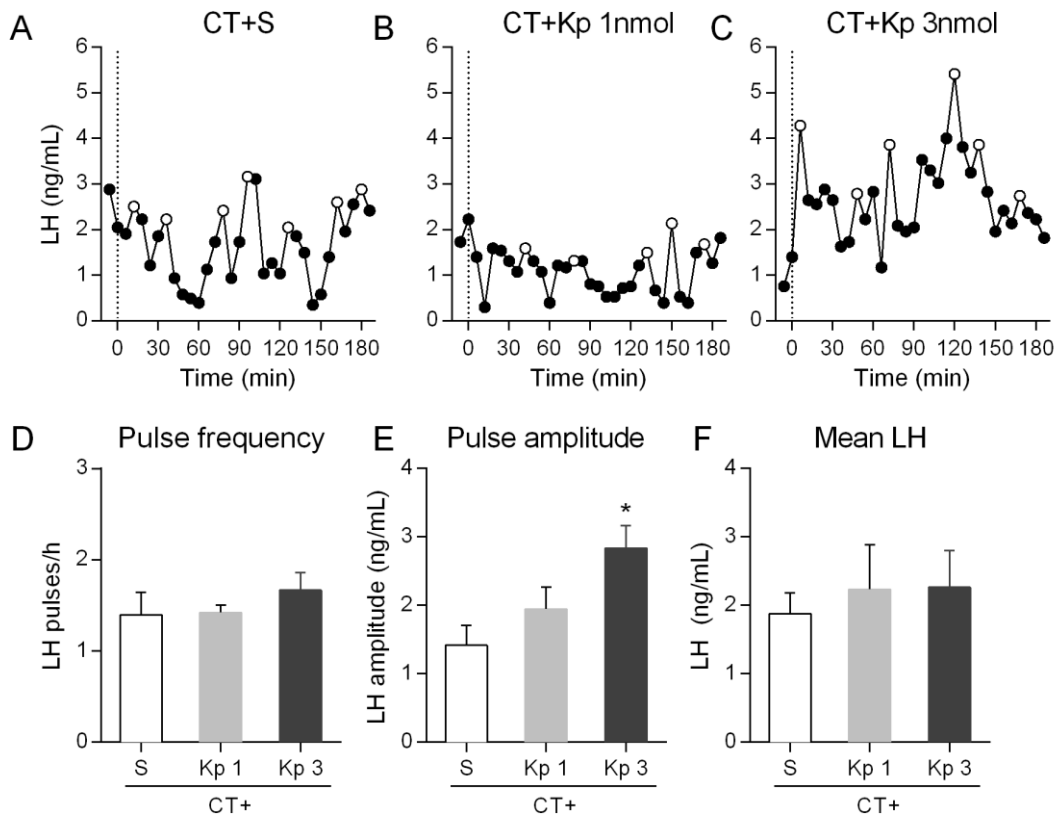


Figura 11. Efeito do tratamento sistêmico com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH. Os ratos foram tratados com uma injeção Kp-10 s.c. nas doses de 1 nmol/rato (CT+Kp 1nmol) ou 3 nmol/rato (CT+Kp 3nmol) ou com salina (CT+S). (A, B e C) Exemplos representativos da secreção pulsátil de LH em animais CT+S (A), CT+Kp 1nmol (B) e CT+Kp 3nmol (C). A linha pontilhada representa o momento da injeção s.c. (D) Frequência de pulsos de LH. (E) Amplitude de pulsos de LH. (F) LH médio. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0.05$ versus CT+S e CT+Kp 1. Determinado por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Holm-Sidak.

4.5 Experimento 5: Efeitos do tratamento crônico com kisspeptina sobre a secreção pulsátil de LH e função do eixo gonadal em ratos obesos

Como reportado na Figura 12, todos os animais HFD, tratados ou não com Kp-10, apresentaram aumento no peso corporal, maior ganho de peso ($P < 0.05$, Figura 12 B) e maior índice de adiposidade ($P < 0.00$, Figura 12 C) em relação aos animais CT+S.

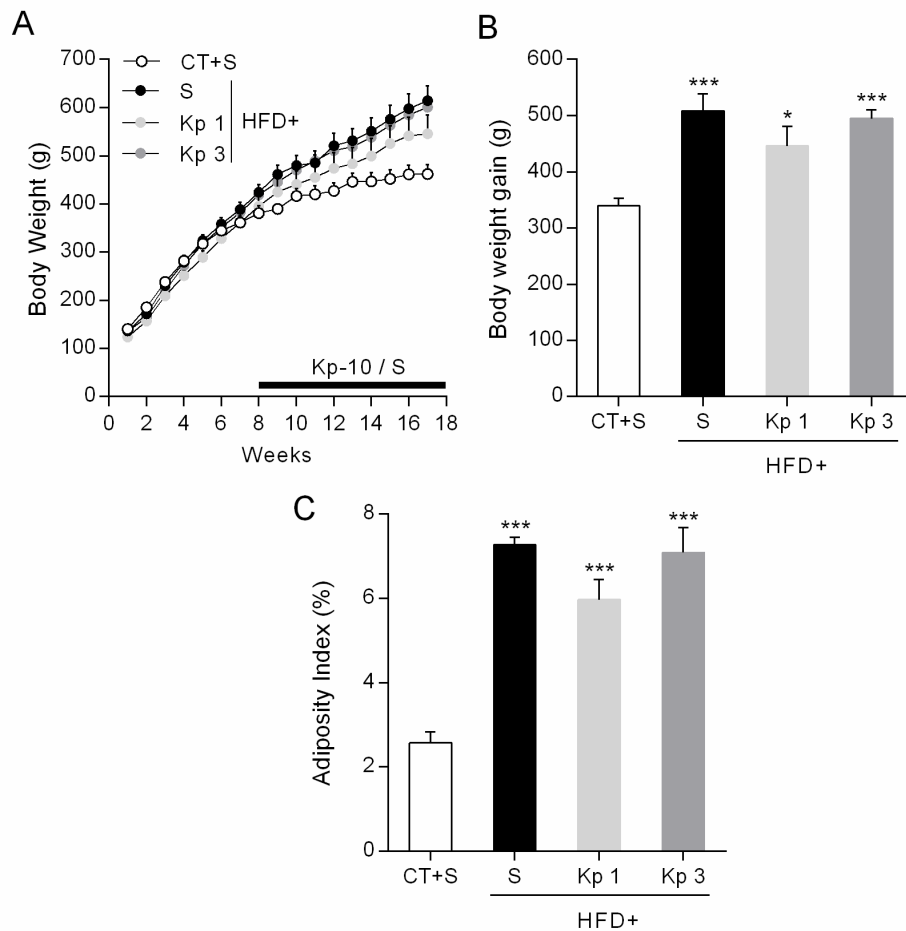


Figura 12. Peso corporal e índice de adiposidade em animais HFD tratados com Kp-10 s.c. Os ratos foram tratados com dieta CT ou HFD durante 18 semanas. A partir da oitava semana, ratos HFD receberam tratamento s.c. diário com Kp-10 1 nmol/rato/dia (HFD+Kp 1), 3 nmol/rato/dia (HFD+Kp 3) ou salina (HFD+S) e ratos CT receberam apenas salina (CT+S). (A) Peso corporal durante as dezoito semanas de tratamento. (B) Ganho de peso corporal após as dezoito semanas de tratamento. (C) Índice de adiposidade. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ em relação ao grupo CT+S. Determinado por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Holm-Sidak.

Os resultados da avaliação da secreção pulsátil de LH em ratos HFD com ou sem tratamento com Kp-10 são apresentados na Figura 13. Novamente, corroborando os resultados encontrados anteriormente, o grupo HFD+S apresentou amplitude de pulso e LH médio diminuídos em relação ao grupo CT+S ($P < 0.05$; Figura 13 E, F). Entretanto, o tratamento com Kp-10 s.c. não foi capaz de reverter o efeito da HFD sobre a amplitude dos pulsos de LH e a concentração média deste hormônio, sendo ratos HFD+S e HFD+Kp 1 ou 3 nmol igualmente diferentes do grupo CT+S.

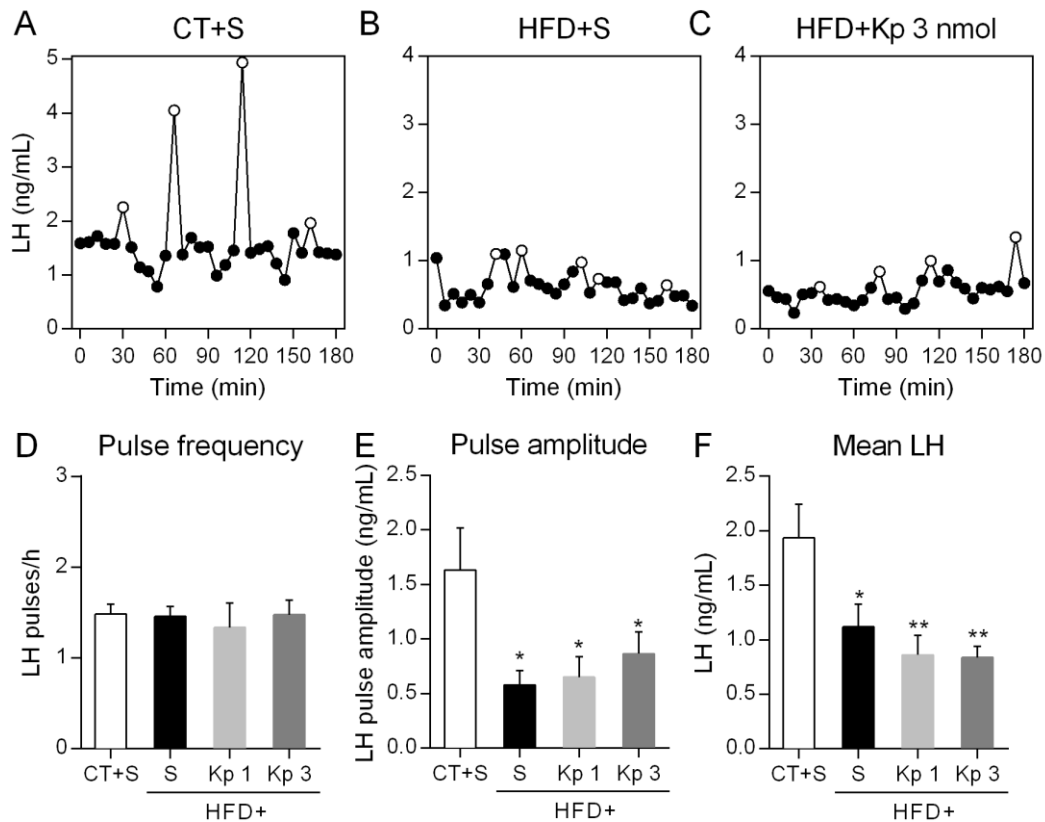


Figura 13. Efeito do tratamento crônico com Kp-10 sobre a secreção pulsátil de LH em ratos HFD. Os ratos foram tratados com dieta CT ou HFD durante 18 semanas. A partir da oitava semana, ratos HFD receberam tratamento s.c. diário com Kp-10 1 nmol/rato/dia (HFD+Kp 1), 3 nmol/rato/dia (HFD+Kp 3) ou salina (HFD+S) e ratos CT receberam apenas salina (CT+S). (A, B e C) Exemplos representativos da secreção pulsátil de LH em animais CT+S (A), HFD+S (B) e HFD+Kp 3 nmol (C). (D) Frequência de pulsos de LH. (E) Amplitude de pulsos de LH. (F) LH médio. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparado ao CT+S. Determinado por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Holm-Sidak.

A dosagem dos níveis plasmáticos de testosterona demonstrou diminuição da mesma em animais HFD+S em relação aos animais CT+S ($P < 0.05$, Figura 14 A). Este dado indica que as alterações observadas na pulsatilidade do grupo HFD repercutiram na atividade esteroidogênica dos animais diminuindo assim a produção de testosterona dos mesmos. O tratamento com a Kp-10 na dose diária de 1 nmol não reverteu a concentração diminuída de testosterona em animais HFD, apresentando, portanto, diferença em relação ao grupo CT+S ($P < 0.05$). De forma distinta, o tratamento com 3 nmol de Kp-10 reverteu os níveis de testoste-

rona dos animais HFD, tornando-os semelhantes aos dos ratos CT. Os baixos níveis de testosterona em ratos CAST e o restabelecimento dos níveis deste hormônio em ratos CAST+T (Figura 14 B) atestam a eficácia do ensaio de ELISA para a dosagem de testosterona em ratos. O aumento dos níveis de testosterona nos ratos HFD+Kp 3 nmol sugere uma provável ação da Kp-10 em estimular a esteroidogênese independentemente da secreção de gonadotrofinas, uma vez que este tratamento não apresentou efeito na pulsatilidade de LH dos animais HFD.

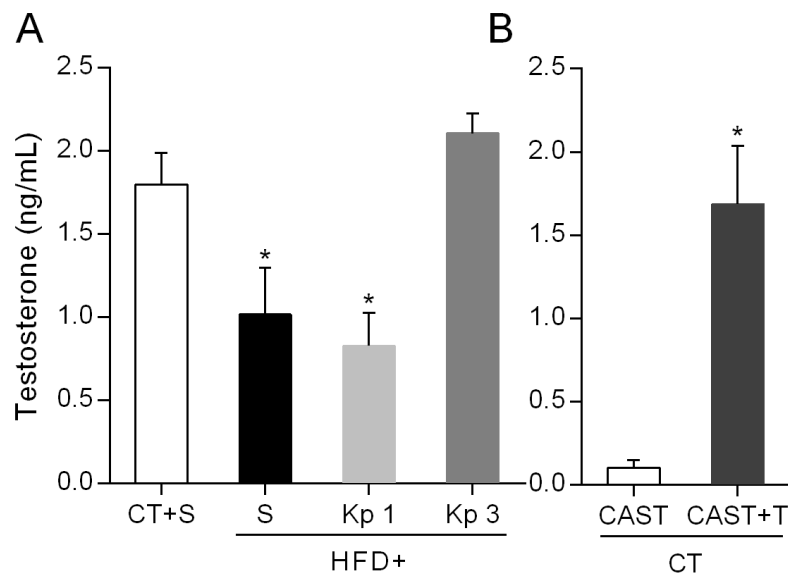


Figura 14. Efeito da HFD e Kp-10 nos níveis plasmáticos de testosterona em ratos. Os animais foram tratados com dieta CT ou HFD durante 18 semanas. A partir da oitava semana, ratos HFD receberam tratamento s.c. diário com Kp-10 1 nmol/rato/dia (HFD+Kp 1), 3 nmol/rato/dia (HFD+Kp 3) ou salina (HFD+S) e ratos CT receberam apenas salina (CT+S). Os animais foram decapitados e o sangue colhido pelo tronco. (A) Níveis plasmáticos de testosterona em animais CT+S, HFD+S, HFD+Kp 1 e HFD+Kp 3. * $P < 0.05$ HFD+S e HFD+Kp 1 versus CT+S e HFD+Kp 3, determinado por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Holm-Sidak. (B) Ratos castrados (CAST) e ratos castrados tratados com testosterona (CAST+T) foram utilizados para validação do ensaio de ELISA. * $P < 0.05$ CAT versus CAST+T, Determinado por teste t de Student. Resultados expressos em média \pm EPM.

Na Figura 15 podemos observar os níveis plasmáticos de estradiol nestes mesmos animais. Não houve diferença nos níveis de estradiol entre ratos CT, HFD+S e HFD+Kp 1 nmol. Entretanto, os ratos HFD+Kp 3 nmol apresentaram concentração aumentada de estradiol em relação aos demais grupos, o que provavelmente decorreu de uma maior aromatização periférica da testosterona, cujos níveis foram restabelecidos nestes animais obesos. A eficácia do ensaio de ELISA para dosagem de estradiol em ratos é comprovada pela dosagem de estradiol em ratas OVX e OVX+E2, sendo que níveis 3 vezes maiores de estradiol foram detectados nas ratas tratadas com 17 β -estradiol (Figura 15 B).

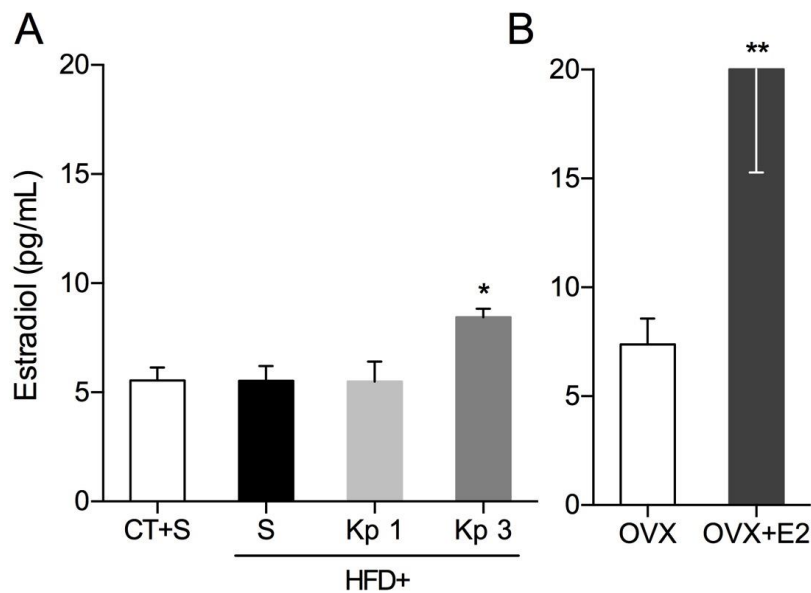


Figura 15. Efeito da HFD e Kp-10 nos níveis plasmáticos de estradiol em ratos. Os animais foram tratados com dieta CT ou HFD durante 18 semanas. A partir da oitava semana, ratos HFD receberam tratamento s.c. diário com Kp-10 1 nmol/rato/dia (HFD+Kp 1), 3 nmol/rato/dia (HFD+Kp 3) ou salina (HFD+S) e ratos CT receberam apenas salina (CT+S). Os animais foram decapitados e o sangue colhido pelo tronco. (A) Níveis plasmáticos de estradiol em animais CT+S, HFD+S, HFD+Kp 1 e HFD+Kp 3. * $P < 0.05$ HFD+Kp 3 versus CT+S, HFD+S e HFD+Kp 1. Determinado por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Holm-Sidak. (B) Ratas ovariectomizadas (OVX) e ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E2) foram utilizadas para validação do ensaio de ELISA. ** $P < 0.01$ OVX versus OVX+E2. Resultados expressos em média \pm EPM.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a secreção pulsátil de LH em ratos obesos apresenta uma inibição na amplitude de pulso. Indicando ainda uma inibição central, ratos HFD exibiram redução na produção de Kp e expressão de *Nkb*, pelos neurônios KNDy, enquanto que houve uma menor expressão de *Gnrh* na POA bem como do *Lhb* na adenohipófise. O tratamento com Kp-10 i.c.v., por sua vez, foi capaz de reverter a inibição da amplitude de pulso de LH no grupo de ratos obesos. Embora o tratamento crônico com Kp-10 s.c. não tenha apresentado tal efeito sobre o LH, os ratos obesos quando tratados com uma das baixas doses de Kp-10 apresentaram reversão nos níveis de testosterona. Tal fato indica uma ação da Kp na esteroidogênese testicular, sugerindo um mecanismo alternativo de ação da Kp independente de gonadotrofinas.

A inibição da pulsatilidade de LH já havia sido observada em ratas obesas, Todd e colaboradores (2003) demonstraram em ratas *Zucker* (*fa/fa*), as quais possuem mutações no gene para o receptor de leptina e apresentam obesidade e infertilidade, uma amplitude de pulso e secreção média de LH suprimidas em relação às ratas magras, enquanto que diferenças na frequência de pulso de LH não foram observadas. Adicionalmente, já foi relatado que homens obesos também apresentam uma diminuição da amplitude de LH, enquanto a frequência de pulso deste hormônio permanece inalterada (Vermeulen *et al.*, 1993). Por sua vez, em ratos machos tratados com HFD, Sanchez-Garrido e colaboradores (2014) observaram níveis reduzidos de testosterona, contudo, não foram observadas alterações nos níveis basais de LH. No entanto, há de se considerar que a secreção pulsátil do LH não foi analisada por este grupo.

Como apontado por estes mesmos pesquisadores, baixos níveis de testosterona geralmente estão associados com um aumento compensatório de LH em casos de impacto testicular primário. Neste contexto, um efeito inibitório direto da leptina, a qual é produzida pelos adipócitos e observada em altos níveis em indivíduos obesos, sobre a esteroidogênese testicu-

lar foi proposta em roedores e humanos (Tena-Sempere e Barreiro, 2002). No entanto, como visto em nosso presente trabalho, a diminuição da pulsatilidade e do nível médio de LH apontam que ratos tratados com a HFD, senão unicamente, apresentam majoritariamente uma inibição do eixo HPG a nível central.

Corroborando esta ideia, os ratos HFD em nosso trabalho apresentaram alterações nos neurônios KNDy. Recentemente, estudos têm fornecido evidências de que estes neurônios que coexpressam Kp, NKB e Dyn seriam o gerador de pulsos de GnRH/LH (Clarkson *et al.*, 2017; Kunimura *et al.*, 2017). Keen e colaboradores (2008) demonstraram em macacos que os pulsos de Kp na EM estavam correlacionados temporalmente com os pulsos de GnRH. Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram menor número de neurônios Kp-ir no ARC dos ratos obesos, apesar de não demonstrarem diferença na expressão de RNAm para *Kiss1* neste mesmo núcleo. De forma semelhante, Luque e colaboradores (2007) não observaram alterações na expressão hipotalâmica de RNAm para *Kiss1* em camundongos obesos, apesar dos mesmos apresentarem baixos níveis de testosterona. Estes pesquisadores sugeriram que, independentemente de variações dos níveis de RNAm, poderiam ocorrer alterações na expressão dos peptídeos e/ou atividade de Kp em camundongos HFD. Outro grupo de pesquisadores, trataram ratos machos *Wistar* em idade adulta com HFD pelo período de seis semanas, após este período eles não observaram diferença na expressão hipotalâmica do RNAm e peptídeo de *Kiss1* entre os grupos (Dudek *et al.*, 2016). Em outro estudo, ratos machos *Sprague-Dawley* tratados com HFD por dezenove dias apresentaram aumento no RNAm para *kiss1* hipotalâmico (Brown *et al.*, 2008). Por outro lado, análises de hibridização *in situ* revelaram uma queda nos níveis de *Kiss1* no ARC de ratos machos obesos tratados com HFD até os quatro meses de idade (Sanchez-Garrido *et al.*, 2014; Sanchez-Garrido *et al.*, 2018). Assim, dentre os dados encontrados na literatura, há relatos de aumento e redução do RNAm para *Kiss1* hipotalâmico em machos obesos, bem como casos em que não foram observadas dife-

renças na expressão deste gene. Há de se levar em consideração que alguns estudos processaram todo o hipotálamo em suas análises, enquanto que outros analisaram apenas o núcleo ARC. Adicionalmente, estes trabalhos utilizaram diferentes protocolos de obesidade, apresentando diversos tempos de indução e composição de HFD, entre outros fatores. Desta forma, alguns destes trabalhos podem ter utilizado protocolos que não foram suficientes para induzir um estado de obesidade capaz de levar a alterações no controle do eixo reprodutivo. Ao que tudo indica protocolos que exibem maior duração de indução à obesidade, como o utilizado no presente estudo e o relatado por Sanchez-Garrido e colaboradores (2014; 2018) levam ao prejuízo de Kp hipotalâmica, como visto pela redução da produção de Kp ou da expressão *Kiss1* no ARC nestes trabalhos.

Adicionalmente, a análise de RNAm por qPCR no presente estudo evidenciou um menor nível de RNAm para *NKB* no ARC dos ratos tratados com HFD, enquanto que os mesmos não exibiram diferença na expressão de *Pdyn*. De acordo com o estudo de Nakao e colaboradores (2018), ratas obesas exibiram menor expressão de *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn*, bem como menor produção dos peptídeos Kp, NKB e Dyn A no ARC quando comparadas com ratas magras. Ainda, as ratas obesas demonstraram redução da secreção de LH. Em machos, contudo, até o presente momento, há uma escassez na literatura a respeito do envolvimento da NKB e Dyn, os outros dois neuropeptídeos co-expressos pelos neurônios KNDy, e o metabolismo energético, pois a maior parte dos estudos aborda o impacto no eixo reprodutivo de fêmeas. De forma geral, diversos trabalhos indicam que a NKB exerce ação estimulatória sobre a secreção de GnRH. Adicionalmente, o NK3R, que é o receptor para a NKB, foi identificado em neurônios KNDy (Topaloglu *et al.*, 2009; Billings *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010). Assim, surgiu a hipótese de que a NKB pode exercer uma ação auto regulatória nestes neurônios estimulando a liberação de Kp no ARC (Navarro *et al.*, 2009; Rance *et al.*, 2010). Além disso, um estudo documentou que ratos machos apresentam maior número de células NKB-ir em re-

lação a células Kp-ir no ARC (Overgaard *et al.*, 2014). Portanto, é possível aventar que uma diminuição na expressão de NKB pode levar à redução da secreção de Kp e, conseqüentemente, à redução de GnRH. Tal hipótese está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que demonstramos o efeito da HFD de reduzir o mRNA para *Nkb*, associado a uma diminuição de neurônios Kp-ir no ARC de ratos obesos após HFD.

Com relação à Dyn, ao contrário dos outros dois neuropeptídeos expressos pelos neurônios KNDy, efeitos inibitórios sobre a secreção pulsátil de GnRH e LH são relatados (Wakabayashi *et al.*, 2010). Um grupo de pesquisadores observou que ratos machos submetidos ao jejum apresentaram baixos níveis de LH, o qual foi recuperado por meio do tratamento com nor-binaltorphimine (nor-BNI), antagonista de KOR, pelo qual a Dyn apresenta maior afinidade (Matsuzaki *et al.*, 2018). Assim, a atenuação da sinalização Dyn/KOR parece estimular a secreção de GnRH/LH. Contudo, em nossos resultados não houve diferença no RNAm para *Pdyn* entre os ratos HFD e CT.

Adicionalmente, os ratos obesos deste trabalho apresentaram menor expressão de *Gnrh* na POA, o que parece ser consequência das alterações observadas nos neurônios KNDy do ARC. Estes neurônios se projetam para os corpos celulares de neurônios GnRH, os quais expressam o *Kiss1r*, através do qual a Kp exerce o efeito estimulatório na secreção do GnRH (Seminaro *et al.*, 2003; Clarkson e Herbison, 2006; Kauffman, Park, *et al.*, 2007). Além disso, em estudos realizados *in vitro* foi demonstrado um aumento na expressão de *Gnrh* pela Kp, indicando assim que a Kp estimula o GnRH a nível transcricional, além de aumentar a sua liberação (Novaira *et al.*, 2009; Novaira *et al.*, 2012). Assim, a redução de Kp observada em ratos HFD pode ser responsável, como consequência, pela diminuição da expressão gênica de GnRH observada nestes mesmos animais.

De forma complementar, a análise de qPCR revelou redução da expressão dos genes do receptor para GnRH, ou seja, o *Gnrhr*, bem como da cadeia β do LH, o *Lh β* , ambos na

adenohipófise. Na literatura, já é bem descrito que o GnRH regula a expressão do seu receptor na hipófise, em um processo denominado de *up-regulation* (Kaprra e Huhtaniemi, 2017). Assim, quando há uma diminuição no estímulo do GnRH na hipófise o número de seus receptores declina, enquanto que os níveis destes últimos são restaurados se houver uma nova exposição ao GnRH. Por outro lado, não se pode excluir a hipótese alternativa de que a obesidade induzida por HFD cause uma redução na expressão hipofisária de GnRHr, independentemente da inibição da secreção de GnRH. Assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer qual o principal mecanismo envolvido na supressão do GnRHr hipofisário durante a obesidade.

Confirmando ainda que os ratos obesos apresentam prejuízo no eixo HPG a nível central, no experimento 3, foi realizada a orquiectomia bilateral a fim de se avaliar a hipersecreção de LH. Sabe-se que em animais gonadectomizados, há um aumento na secreção pulsátil de GnRH devido à ausência do feedback negativo exercido pela testosterona. Consequentemente há um aumento na expressão do gene para LH na hipófise e uma hipersecreção deste hormônio (Dalkin *et al.*, 1989; Kunimura *et al.*, 2017). Como esperado, os ratos CT CAST apresentaram aumento marcante no LH. No entanto, os ratos HFD CAST tiveram a sua resposta de hipersecreção de LH significativamente atenuada. Isto esteve associado a um menor aumento da expressão de Kp no ARC dos ratos HFD CAST, o que reforça a hipótese de um efeito primário da obesidade em suprimir a função dos neurônios KNDy e, conseqüentemente, o eixo gonadal, independentemente do efeito de retroalimentação negativa dos esteroides sexuais. Em linha com nossos presentes achados, Castellano e colaboradores (2006) demonstraram que ratos machos diabéticos exibem menor resposta de hipersecreção de LH à castração quando comparados com ratos controle. O mesmo grupo de pesquisadores observou que os ratos controles castrados apresentavam aumento na expressão hipotalâmica do *Kiss1*, enquanto que os ratos diabéticos castrados exibiram deficiência na resposta de aumento na expressão

deste gene.

Diante do exposto, há evidências que sugerem o envolvimento dos neurônios KNDy na redução da secreção pulsátil de LH observada nos ratos obesos. Assim, no experimento 2, foi avaliado se a administração aguda de Kp-10 i.c.v. reverteria tal quadro. Como demonstrado por Thompson e colaboradores (2004), a administração i.c.v. de Kp-10 em ratos machos *Wistar* estimula o eixo HPG, sendo que o aumento do LH plasmático observado por estes pesquisadores foi dose-dependente e observado 60 minutos após a injeção da Kp-10. Estudos prévios de nosso grupo demonstram efeito da Kp-10 i.c.v. na faixa de dose de 0.3 a 3 nmol/rata com resposta secretora máxima 30 minutos após a injeção em bolus (Szawka *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2015). De fato, em nossos resultados, os ratos CT tratados com 1.2 nmol de Kp-10 confirmaram a ação estimulatória da mesma sobre a secreção de LH, uma vez que estes animais apresentaram maior amplitude de pulso e secreção média de LH em relação aos ratos CT tratados apenas com veículo. Com relação aos ratos do grupo HFD, o tratamento com Kp-10 reverteu a redução da pulsatilidade de LH observada nestes animais, tanto a amplitude de pulsos quanto a secreção média de LH nos ratos obesos foram restauradas. No trabalho desenvolvido por Sanchez-Garrido e colaboradores (2014), foi observado que ratos HFD apresentaram menor secreção integrada de LH frente ao tratamento i.c.v com Kp-10. No entanto, estes pesquisadores utilizaram uma dose sub-ótima de Kp-10 (50 pmol/rato), a fim de detectar alterações na responsividade do LH e não de reverter a supressão na pulsatilidade do LH, como no presente estudo. De fato, estudo de nosso grupo e de outros laboratórios demonstraram que o tratamento com este peptídeo i.c.v. não produz efeitos máximos na secreção de LH em doses inferiores a 0.3 nmol/rata (Thompson *et al.*, 2004; Szawka *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2015). Ainda, outro grupo de pesquisadores demonstrou em homens saudáveis que o tratamento com Kp-54 intravenosa (4 pmol/Kg/min) pelo período de 90 minutos aumentou a se-

creção de LH, além disso a Kp foi detectável no sangue dos indivíduos analisados até 300 minutos após o tratamento (Dhillon *et al.*, 2005). George e colaboradores (2013), por sua vez, demonstraram que a administração de Kp-10 (0.3 µg/kg, intravenosa) tanto em homens saudáveis quanto em homens com diabetes tipo 2 aumentou os níveis de LH em ambos os grupos, sendo o pico de LH observado aos 30 min após administração. Portanto, nossos resultados obtidos em ratos associados com este estudo conduzido em humanos demonstram que o tratamento com Kp-10 é capaz de reverter a supressão da secreção pulsátil de LH causada pela obesidade.

Assim, no experimento 5 deste trabalho, avaliamos se o tratamento sistêmico crônico com Kp-10 s.c. também reverteria os prejuízos da pulsatilidade de LH e função gonadal nos ratos obesos. Contudo, a administração diária da Kp-10 a 1 nmol ou 3 nmol pelo período de 10 semanas não restaurou a amplitude de pulso e secreção média de LH dos ratos HFD. Embora não tenha sido observado o estímulo da secreção de LH neste experimento, a Kp administrada periféricamente estimula o eixo HPG como demonstrado em nossos resultados pelo aumento na amplitude de pulso do LH em animais CT tratados de forma aguda com 3 nmol de Kp-10 s.c.. Adicionalmente, o estímulo na secreção de LH frente ao tratamento sistêmico com Kp-10 foi relatado por outros pesquisadores. Navarro e colaboradores (2005) demonstraram que 7.5 nmol de Kp-10 i.p. promove grande aumento do LH, semelhante ao promovido por 1 nmol i.c.v. Em ratos machos *Wistar* o tratamento com Kp-10 i.p. (100 nmol) estimula o aumento de LH após 20 min da infusão, quando os ratos foram decapitados (Thompson *et al.*, 2004). Tovar e colaboradores (2006) analisaram a secreção de LH a cada 15 min pelo período de 360 min em ratos machos tratados com 0.3, 3 ou 30 nmol/kg de Kp-10 intravenosa. Estes pesquisadores observaram que as três doses testadas estimularam a secreção de LH após 15 minutos da injeção de Kp, sendo que a amplitude da resposta de LH pareceu ser dose-dependente. Assim, aventa-se que o rápido padrão de resposta do LH à administração perifé-

rica da Kp indica que esta deve regular a liberação de GnRH diretamente nos terminais nervosos do neurônio GnRH presentes na EM, região que é desprovida de barreira hematoencefálica. Além disso, tem sido indicado que o ARC possua a barreira hematoencefálica incompleta, com os neurônios KNDy se estendendo até a EM, local onde se projetam para os terminais de neurônios GnRH (Rodriguez, Blazquez e Guerra, 2010).

Adicionalmente, tem-se demonstrado que, o tratamento prolongado com a Kp-10 dessensibiliza o seu receptor Kiss1r, o que leva a inibição das respostas do LH. Desta forma, pesquisadores demonstraram que em macacos Rhesus machos (*Macaca mulatta*) o tratamento contínuo com Kp-10 estimulou a secreção de LH após 2 h de tratamento, a infusão foi então mantida por mais 12 h, após este período o LH diminuiu ao nível basal anterior ao tratamento. Eles mantiveram a infusão de Kp-10 por mais 4 dias, então realizaram o tratamento dos animais com GnRH, o qual foi capaz de aumentar o LH, indicando assim uma dessensibilização do Kiss1r e não GnRHr (Seminara *et al.*, 2006). Resultados semelhantes de dessensibilização ao tratamento com Kp também foram relatados em ratos (Thompson *et al.*, 2006). Desta forma, em nosso estudo, embora tenhamos usado baixas doses de Kp-10, não podemos excluir a possibilidade de que o tratamento crônico com a Kp-10 tenha dessensibilizado o seu receptor, o que resultou na ausência de efeito da Kp-10 sobre a secreção de LH. Por outro lado, as doses utilizadas podem ter sido ineficientes em reverter os efeitos da HFD na secreção pulsátil de LH.

No que diz respeito à dosagem da testosterona nos animais do presente trabalho, os ratos HFD tratados com salina no experimento 4 apresentaram níveis reduzidos deste esteroide sexual, confirmando o impacto da obesidade na função gonadal. Por sua vez, o tratamento crônico dos ratos HFD com a Kp-10 a 1 nmol não melhorou os níveis de testosterona, enquanto que com a dose de 3 nmol, os níveis foram restaurados. Como visto anteriormente, estes animais não apresentaram melhora na secreção pulsátil de LH, sugerindo assim que a Kp-10

deva exercer uma ação testicular independentemente de gonadotrofinas, que poderia ser um efeito local direto. Nos últimos anos tem sido demonstrada a existência tanto de Kp quanto de Kiss1r nos testículos de camundongos e macacos, no entanto, o papel desenvolvido pela Kp e seu receptor diretamente nas gônadas ainda não está elucidado (Salehi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Irfan *et al.*, 2016). A expressão de Kp nos testículos parece estar localizada principalmente nas células de Leydig no compartimento extra tubular, enquanto o Kiss1r parece estar expresso majoritariamente nas células germinativas (Hsu *et al.*, 2014; Salehi *et al.*, 2015). Entretanto, enquanto há estudo *in vivo* em macacos que sugere um efeito da kisspeptina na produção de testosterona independente da ação de gonadotrofinas (Irfan *et al.*, 2014), trabalhos *in vitro* com cultura de células testiculares e de células de Leydig não observaram efeito direto da Kp em aumentar a esteroidogênese (Mei *et al.*, 2013; Tariq e Shabab, 2017). Por outro lado, foi relatado efeito direto da Kp aumentando a expressão de enzimas esteroidogênicas no testículo de anuros (Chianese *et al.*, 2017). Por outro lado, Ayturk e colaboradores (2017) relataram que o tratamento i.p. com Kp-10 a 50 nmol/dia pelo período de 13 dias, inicialmente, promoveu a proliferação de células espermatogênicas em ratos *Wistar*, contudo, após sete dias da interrupção do tratamento houve um aumento na contagem de células apoptóticas. De forma semelhante, outro grupo de pesquisadores também apontou que ratos submetidos ao tratamento crônico s.c. com 50 nmol de Kp-54/dia durante 13 dias apresentaram degeneração dos túbulos seminíferos (Thompson *et al.*, 2006). Há de se levar em consideração, no entanto, que a dose de Kp-10 administrada por estes pesquisadores parece ter sido muito elevada. De todo modo, nossos resultados indicam que a kisspeptina em baixas doses é capaz de aumentar a produção de testosterona em ratos obesos sem alterar a secreção de LH. Embora os mecanismos responsáveis por este efeito ainda precisem ser elucidados, estes resultados apontam para novas vias ainda pouco entendidas pelas quais a Kp parece ser capaz de regular a produção testicular de andrógenos independentemente da função hipofisária.

Com relação à dosagem do estradiol, ratos HFD+S e HFD+Kp 1nmol não apresentaram diferenças em relação aos controles. O tecido adiposo comprovadamente converte a testosterona em estradiol pela enzima citocromo P450 aromatase, a qual está localizada no retículo endoplasmático de diferentes tecidos periféricos, tal como os adipócitos (Williams, 2012). Contudo, sugere-se que os ratos HFD+S e HFD+Kp 1nmol, apesar de demonstrarem maior índice de adiposidade, não apresentaram níveis elevados de estradiol devido aos seus níveis diminuídos de testosterona, uma vez que esta é o hormônio precursor, utilizado como substrato pela aromatase. De forma semelhante, outro grupo de pesquisadores também não observou diferença nos níveis de estradiol em ratos tratados com HFD (Sanchez-Garrido *et al.*, 2014). Interessantemente, no presente estudo, os ratos HFD+Kp 3 nmol que apresentaram níveis de testosterona restaurados pelo tratamento com Kp-10, de fato, demonstraram também o aumento de estradiol. Estes dados reforçam a ideia de que o aumento dos níveis de testosterona, associado a maior quantidade de tecido adiposo nos ratos HFD, resulta em um aumento periférico da conversão de testosterona em estradiol.

6 CONCLUSÃO

Ratos machos obesos apresentam redução da produção de Kp e expressão de *Nkb* pelos neurônios KNDy no ARC o que está associado à menor expressão de *Gnrh* na POA no hipotálamo e à redução da expressão de *Gnrhr* e *Lhβ* na adenohipófise. Estes achados demonstram o efeito inibitório primário da HFD em neurônios KNDy e, conseqüentemente, nos neurônios GnRH bem como nos gonadotrofos hipofisários. Os resultados demonstram pela primeira vez que a obesidade induzida por dieta reduz a amplitude dos pulsos de LH em ratos machos, o que está associado a alteração da atividade esteoidogênica. A castração dos ratos corrobora estes achados, uma vez que os ratos HFD exibem uma atenuação da hipersecreção do LH e expressão de Kp no ARC, que ocorrem em consequência da ausência do *feedback* negativo, indicando que estes animais apresentam prejuízos no nível hipotalâmico do eixo HPG. O tratamento i.c.v. com Kp-10, por sua vez, restaurou os níveis de LH e a amplitude de pulso deste hormônio nos ratos HFD. Por outro lado, o tratamento crônico s.c. com Kp-10 não foi capaz de reverter a inibição de LH presente nos ratos obesos, o que talvez se deva a uma dessensibilização no receptor *Kiss1r* em consequência ao tratamento prolongado. A Kp-10 a 3 nmol, no entanto, restaurou os níveis de testosterona, a qual se apresentou reduzida nos ratos HFD. Este dado sugere uma via alternativa de ação da Kp-10 nos testículos. Estes achados contribuem para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela infertilidade em homens obesos e, adicionalmente, abrem perspectivas para a investigação de novas ações periféricas da Kp.

REFERÊNCIAS

- 1 Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, Franci CR, Grattan DR, Szawka RE. Prolactin Regulates Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus to Suppress LH Secretion in Female Rats. *Endocrinology* 2014; 1-11.
- 2 Ayturk N, Firat T, Kukner A, Ozogul C, Tore F, Kandirali IE, Yilmaz B. The effect of kisspeptin on spermatogenesis and apoptosis in rats. *Turk J Med Sci* 2017; 47: 334-342.
- 3 Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978; 202: 631-3.
- 4 Billings HJ, Connors JM, Altman SN, Hileman SM, Holaskova I, Lehman MN, Mcmanus CJ, Nestor CC, Jacobs BH, Goodman RL. Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010; 151: 3836-46.
- 5 Brown RE, Imran SA, Ur E, Wilkinson M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 281: 64-72.

- 6 Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; 289: 2122-5.
- 7 Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 2006; 498: 712-26.
- 8 Cameron JL, Nobsch C. Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 1991; 128: 1532-40.
- 9 Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 317-63.
- 10 Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005; 146: 3917-3925.
- 11 Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Roa J, Vigo E, Pineda R,

- Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes* 2006; 55: 2602-2610.
- 12 Chianese R, Ciaramella V, Fasano S, Pierantoni R, Meccariello R. Kisspeptin regulates steroidogenesis and spermiation in anuran amphibian. *Reproduction* 2017; 154: 403-414.
- 13 Clarkson J, D'anglemont De Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 673-82.
- 14 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: 8691-8697.
- 15 Clarkson J, Han SY, Piet R, McLennan T, Kane GM, Ng J, Porteous RW, Kim JS, Colledge WH, Iremonger KJ, Herbison AE. Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E10216-E10223.
- 16 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.
- 17 Cohen PG. Obesity in men: the hypogonadal-estrogen receptor relationship and its effect on glucose homeostasis. *Med Hypotheses* 2008; 70: 358-360.
- 18 Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 1989; 125: 917-24.
- 19 Dandona P, Dhindsa S, Chaudhuri A, Bhatia V, Topiwala S, Mohanty P. Hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Curr Mol Med* 2008; 8: 816-828.
- 20 De Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab Brain Dis* 2008; 23: 361-373.
- 21 De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, 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: 10972-10976.

- 22 Decourt C, Tillet Y, Caraty A, Franceschini I, Briant C. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat* 2008; 36: 131-7.
- 23 Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatgei MA, Bloom SR. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6609-15.
- 24 Dhindsa S, Furlanetto R, Vora M, Ghanim H, Chaudhuri A, Dandona P. Low estradiol concentrations in men with subnormal testosterone concentrations and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34: 1854-9.
- 25 Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson LE, Knobil E. Circadian oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 1970; 87: 850-3.
- 26 Dudek M, Kolodziejcki PA, Pruszyńska-Oszmałek E, Sassek M, Ziarniak K, Nowak KW, Sliwowska JH. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. *Neuropeptides* 2016; 56: 41-9.

- 27 Dudek M, Kolodziejcki PA, Pruszyńska-Oszmałek E, Ziarniak K, Sliwowska JH. Effects of Orchidectomy and Testosterone Replacement on Numbers of Kisspeptin-, Neurokinin B-, and Dynorphin A-Immunoreactive Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus in Obese and Diabetic Rats. *J Neuroendocrinol* 2017; 29:
- 28 Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970; 3: 308-26.
- 29 Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 980S-984S.
- 30 Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255: 127-132.
- 31 Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 2006; 401: 225-30.
- 32 George JT, Veldhuis JD, Tena-Sempere M, Millar RP, Anderson RA. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild

- biochemical hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 79: 100-4.
- 33 Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, De Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 2007; 148: 5752-60.
- 34 Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 4073-4077.
- 35 Grossmann M. Hypogonadism and male obesity: Focus on unresolved questions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2018; 89: 11-21.
- 36 Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, Turan S, Gribble FM, Kotan LD, Akcay T, Atay Z, Canan H, Serin A, O'rahilly S, Reimann F, Semple RK, Topaloglu AK. Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3633-3639.
- 37 Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E827-832.

- 38 Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z, Kallo I. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 2010; 31: 1984-98.
- 39 Hsu MC, Wang JY, Lee YJ, Jong DS, Tsui KH, Chiu CH. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Reproduction* 2014; 147: 835-45.
- 40 Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, O'Neill TW, Finn JD, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Forti G, Wu FC, Group E. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 983-91.
- 41 Irfan S, Ehmcke J, Shahab M, Wistuba J, Schlatt S. Immunocytochemical localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the primate testis. *J Med Primatol* 2016; 45: 105-11.
- 42 Irfan S, Ehmcke J, Wahab F, Shahab M, Schlatt S. Intratesticular action of kisspeptin in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia* 2014; 46: 610-7.

- 43 Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A, Fabbri A. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3673-3680.
- 44 Jeyakumar SM, Lopamudra P, Padmini S, Balakrishna N, Giridharan NV, Vajreswari A. Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rat strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. *Nutr Metab (Lond)* 2009; 6: 27.
- 45 Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 2017;
- 46 Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; 148: 1774-1783.
- 47 Kauffman AS, Park JH, Mcphie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG, Pavlova MN, Rohde AD, Clifton DK, Steiner RA, Rissman EF. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci* 2007; 27: 8826-35.
- 48 Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E. An increase in kisspeptin-

- 54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 2008; 149: 4151-7.
- 49 Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity* 2008; 32: 1431.
- 50 Kotani M, Dethoux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636.
- 51 Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 2005; 489: 372-86.
- 52 Kunimura Y, Iwata K, Ishigami A, Ozawa H. Age-related alterations in hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons and in pulsatile LH release in female and male rats. *Neurobiol Aging* 2017; 50: 30-38.

- 53 Lam YY, Ravussin E. Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity. *Eur J Clin Nutr* 2017; 71: 318-322.
- 54 Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-7.
- 55 Lee MO. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *Am J Physiol* 1929; 89: 24-33.
- 56 Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010; 151: 3479-89.
- 57 Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* 1995; 332: 621-8.
- 58 Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP, O'byrne KT. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* 2009; 4: e8334.

- 59 Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, De Miranda PB, O'kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, Krauss RM, Veldhuis JD, Wagner AJ, Depaoli AM, Mccann SM, Wong ML. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4531-4536.
- 60 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.
- 61 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; 148: 4601-4611.
- 62 Manfredi-Lozano M, Roa J, Tena-Sempere M. Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front Neuroendocrinol* 2018; 48: 37-49.
- 63 Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Iwasa T, Yano K, Mayila Y, Tokui T, Yanagihara R, Matsui S, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Neurokinin B receptor agonist and Dynorphin receptor antagonist stimulated luteinizing hormone secretion in fasted male rodents. *Endocr J* 2018; 65: 485-492.

- 64 Mei H, Doran J, Kyle V, Yeo SH, Colledge WH. Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 198.
- 65 Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* 2009; 30: 26-33.
- 66 Nakao K, Iwata K, Takeshita T, Ozawa H. Expression of hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin A neurons attenuates in female Zucker fatty rats. *Neurosci Lett* 2018; 665: 135-139.
- 67 Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004; 145: 4565-74.
- 68 Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 2005; 146: 156-63.

- 69 Navarro VM, Castellano JM, Mcconkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, Clifton DK, Tena-Sempere M, Steiner RA. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300: E202-10.
- 70 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; 29: 11859-66.
- 71 Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, Garcia-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK, Braun RE, Palmiter RD, Tena-Sempere M, Alreja M, Steiner RA. Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 2011; 152: 4265-75.
- 72 Novaira HJ, Fadoju D, Diaczok D, Radovick S. Genetic mechanisms mediating kisspeptin regulation of GnRH gene expression. *J Neurosci* 2012; 32: 17391-400.
- 73 Novaira HJ, Ng Y, Wolfe A, Radovick S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 311: 126-34.

- 74 O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22: 289-318.
- 75 Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30: 713-743.
- 76 Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613-617.
- 77 Overgaard A, Ruiz-Pino F, Castellano JM, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD. Disparate changes in kisspeptin and neurokinin B expression in the arcuate nucleus after sex steroid manipulation reveal differential regulation of the two KNDy peptides in rats. *Endocrinology* 2014; 155: 3945-55.
- 78 Palkovits M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 1973; 59: 449-50.
- 79 Paxinos G, Watson C, Eds. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier, 2007.

- 80 Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012; 92: 1235-1316.
- 81 Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 2009; 150: 2805-2812.
- 82 Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 2008; 149: 4387-95.
- 83 Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM. Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 2010; 151: 4494-503.
- 84 Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 2010; 1364: 116-28.
- 85 Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE. Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin

- secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 2015; 27: 88-99.
- 86 Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 2010; 31: 757-76.
- 87 Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2744-2750.
- 88 Roseweir AK, Millar RP. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 203-212.
- 89 Ruiz-Pino F, Garcia-Galiano D, Manfredi-Lozano M, Leon S, Sanchez-Garrido MA, Roa J, Pinilla L, Navarro VM, Tena-Sempere M. Effects and interactions of tachykinins and dynorphin on FSH and LH secretion in developing and adult rats. *Endocrinology* 2015; 156: 576-88.
- 90 Salehi S, Adeshina I, Chen H, Zirkin BR, Hussain MA, Wondisford F, Wolfe

- A, Radovick S. Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 2015; 156: 1514-22.
- 91 Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Manfredi-Lozano M, Leon S, Garcia-Galiano D, Castano JP, Luque RM, Romero-Ruiz A, Castellano JM, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Obesity-induced hypogonadism in the male: premature reproductive neuroendocrine senescence and contribution of Kiss1-mediated mechanisms. *Endocrinology* 2014; 155: 1067-79.
- 92 Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Velasco I, Barroso A, Fernandois D, Heras V, Manfredi-Lozano M, Vazquez MJ, Castellano JM, Roa J, Pinilla L, Tena-Sempere M. Intergenerational Influence of Paternal Obesity on Metabolic and Reproductive Health Parameters of the Offspring: Male-Preferential Impact and Involvement of Kiss1-Mediated Pathways. *Endocrinology* 2018; 159: 1005-1018.
- 93 Saner-Amigh KJ, Halvorson LM. Andrology and Fertility Assessment. *Laboratory Medicine* 2010; 42: 41-50.
- 94 Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimaraes AL, De Paula AM, Campagnole-Santos MJ, Alvarez-Leite JI, Bader M, Santos RA. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept* 2012; 178: 64-70.

- 95 Schlatt S, Ehmcke J. Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 2-16.
- 96 Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 107-17.
- 97 Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, Ertel NH. Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 633-638.
- 98 Seminara SB, Di Pietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Jr., Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 2006; 147: 2122-6.
- 99 Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614-27.
- 100 Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for

- leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 298-303.
- 101 Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 2007; 148: 1150-7.
- 102 Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005; 146: 3686-3692.
- 103 Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005; 146: 2976-84.
- 104 Stanik S, Dornfeld LP, Maxwell MH, Viosca SP, Korenman SG. The effect of weight loss on reproductive hormones in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 828-832.
- 105 Steyn FJ, Wan Y, Clarkson J, Veldhuis JD, Herbison AE, Chen C. Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology* 2013; 154: 4939-45.

- 106 Strobil A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998; 18: 213-215.
- 107 Szawka RE, Helena CV, Rodovalho GV, Monteiro PM, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Locus coeruleus norepinephrine regulates the surge of prolactin during oestrus. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 639-48.
- 108 Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 3247-3257.
- 109 Tariq AR, Shabab M. Effect of kisspeptin challenge on testosterone and inhibin secretion from in vitro testicular tissue of adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia* 2017; 49:
- 110 Teerds KJ, De Rooij DG, Keijzer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 667-83.
- 111 Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 9-13.

- 112 Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Bewick GA, Stamp GW, Curtis AE, Cooke JH, Jethwa PH, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E1074-82.
- 113 Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 850-8.
- 114 Todd BJ, Ladyman SR, Grattan DR. Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion but not luteinizing hormone surge in leptin resistant obese Zucker rats. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 61-68.
- 115 Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'rahilly S, Semple RK. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009; 41: 354-8.
- 116 Tovar S, Vazquez MJ, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Vigo E, Roa J, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 2006; 147: 2696-704.

- 117 Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr J* 2009; 56: 729-37.
- 118 Vermeulen A, Kaufman JM, Deslypere JP, Thomas G. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1140-6.
- 119 Vidal A, Zhang Q, Medigue C, Fabre S, Clement F. DynPeak: an algorithm for pulse detection and frequency analysis in hormonal time series. *PLoS One* 2012; 7: e39001.
- 120 Vigitel. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. 2017. Disponível em: <
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/02/vigitel-brasil-2016.pdf>
>. Acesso em: 03/06/2017.
- 121 Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 2010; 30: 3124-32.

- 122 Wang JY, Hsu MC, Tseng TH, Wu LS, Yang KT, Chiu CH. Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. *J Chin Med Assoc* 2015; 78: 249-57.
- 123 Watson RE, Jr., Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides* 1986; 7: 155-159.
- 124 Who. Obesity and overweight. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> >. Acesso em: 03/06/2018.
- 125 Williams G. Aromatase up-regulation, insulin and raised intracellular oestrogens in men, induce adiposity, metabolic syndrome and prostate disease, via aberrant ER-alpha and GPER signalling. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 269-78.
- 126 Wreford NG, Rajendra Kumar T, Matzuk MM, De Kretser DM. Analysis of the testicular phenotype of the follicle-stimulating hormone beta-subunit knockout and the activin type II receptor knockout mice by stereological analysis. *Endocrinology* 2001; 142: 2916-20.
- 127 Yefimova MG, Sow A, Fontaine I, Guilleminot V, Martinat N, Crepieux P, Canepa S, Maurel MC, Fouhecourt S, Reiter E, Benzakour O, Guillou F. Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. *Biol Reprod*

2008; 78: 697-704.

- 128 Yen SSC, Quigley ME, Reid RL, Ropert JF, Cetel NS. Neuroendocrinology of opioid peptides and their role in the control of gonadotropin and prolactin secretion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1985; 152: 485-493.