

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICA: FISILOGIA

Jéferson Ferraz Goularte

**EFEITO DA DIETA DE CAFETERIA DESDE O DESMAME SOBRE FATORES
PERIFÉRICOS E CENTRAIS ENVOLVIDOS COM A INSTALAÇÃO DA
PUBERDADE EM FÊMEAS DE RATO WISTAR**

Porto Alegre

2015

Jéferson Ferraz Goularte

**EFEITO DA DIETA DE CAFETERIA DESDE O DESMAME SOBRE FATORES
PERIFÉRICOS E CENTRAIS ENVOLVIDOS COM A INSTALAÇÃO DA
PUBERDADE EM FÊMEAS DE RATO WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Goularte, Jéferson Ferraz

Efeito da dieta de cafeteria desde o desmame sobre fatores periféricos e centrais envolvidos com a instalação da puberdade em fêmeas de rato wistar / Jéferson Ferraz Goularte. -- 2015.
151 f.

Orientador: Gilberto Luiz Sanvitto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. dieta de cafeteria. 2. abertura vaginal. 3. tecido adiposo intra-abdominal. 4. leptina. 5. Gnrh1; Kiss1; Kiss1r; Lepr mRNA. I. Sanvitto, Gilberto Luiz, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

**À minha esposa Taís e minha filha Camila pelo
apoio, carinho e fonte de motivação.**

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela assistência financeira ao desenvolvimento da presente tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pelas oportunidades oferecidas para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos ao longo dos anos em que trabalhamos juntos.

À Profa. Maria Flávia Marques Ribeiro por aceitar ser a relatora desta tese e principalmente pelas sugestões que aprimoraram o presente trabalho.

Aos professores da banca examinadora Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho e a Profa. Dra. Patrícia Pelufo Silveira por aceitarem avaliar esta tese.

À Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva pela colaboração e auxílio na realização do experimento de expressão gênica.

À Dra. Lolita Schneider Pizzolato e Me. Gabriela Dos Santos Sant Anna pelo auxílio técnico nos experimentos de expressão gênica.

Às colegas Grace Violeta Espinoza Pardo e Amanda Brondani Mucellini pela colaboração nos experimentos e por dividir seu tempo com ricas discussões científicas.

Aos alunos de iniciação científica Ana Carla de Araújo da Cunha e Rafael Corrêa Caceres pela colaboração em grande parte dos experimentos que compõem esta tese.

Aos professores Dr. Marcelo Lacerda Grillo e Dr. Gustavo Hauber Gameiro que gentilmente me convidaram para dividir sua sala e com os quais aprendi muito.

Aos colegas do PPG Fisiologia pelo convívio amigável e agradável.

Aos colaboradores do PPG Fisiologia em especial ao Diego Coelho da Motta.

A minha família, esposa e filha que sempre me apoiaram.

"The doubter is a true man of science; he doubts not only himself and his interpretations, but he believes in science." Claude Bernard, in *An Introduction to the Study of Experimental Medicine*.

RESUMO

A puberdade é uma fase do desenvolvimento marcada pelo surgimento de características sexuais secundárias e que culmina na capacidade reprodutiva do organismo. A puberdade inicia com a ativação dos neurônios que expressam o peptídeo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que resulta em modificação do padrão de liberação do hormônio luteinizante (LH) pelos gonadotrofos, e aumento da produção gonadal de 17β -estradiol (E2). O sistema kisspeptidérgico, composto pelo peptídeo kisspeptina (KiSS-1) e o receptor de kisspeptina (KiSS1r), parece ser um dos responsáveis pela ativação dos neurônios que secretam GnRH para o início da puberdade. Alguns trabalhos sugerem que esse sistema é modulado por sinais periféricos que sinalizam o estado de desenvolvimento e reserva de energia do organismo, como o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o hormônio leptina, respectivamente. Estudos em humanos sustentam que há um adiantamento da idade de início da puberdade em meninas, atribuindo o excesso de adiposidade como um possível fator causal. Em condições de excesso de tecido adiposo, as concentrações de leptina e IGF-1 estão aumentadas, sugerindo que estes fatores possam exercer modulação sobre o sistema kisspeptina e adiantar a instalação da puberdade. Assim, o presente estudo analisou a ingestão alimentar e o desenvolvimento de obesidade sobre a instalação da puberdade e a participação de fatores-chave para a instalação da puberdade em fêmeas de rato Wistar alimentadas com Dieta de Cafeteria a partir do desmame. Foram utilizadas fêmeas de rato Wistar desmamadas aos 21 dias de vida. Os animais foram alocados para o grupo Controle (ração padrão e água ad libitum) e grupo Dieta de Cafeteria (alimentos processados consumidos por humanos). Diariamente, os animais foram inspecionados para a abertura vaginal (indicador de instalação da puberdade) e a ingestão alimentar foi monitorada. No dia da abertura vaginal, os animais foram decapitados e o encéfalo e sangue foram coletados e armazenados. Nas amostras contendo a Banda Diagonal de Broca e hipotálamo foi analisada a expressão dos genes *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Lepr*. No soro, quantificou-se a concentração de LH, E2, leptina e IGF-1. Também foram dissecados e pesados o tecido adiposo intra-abdominal, o útero, os ovários e as adrenais. Os resultados revelaram aumento da ingestão de energia e lipídeos e adiantamento da abertura vaginal no grupo Dieta de

Cafeteria. O peso dos ovários foi aumentado pela Dieta de Cafeteria, embora o peso do útero e o peso das adrenais não tenham sido alterados. Esses animais tiveram menor peso corporal, porém com aumento do tecido adiposo intra-abdominal e da concentração de leptina, ambos associados entre si e com o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria. A Dieta de Cafeteria não alterou a concentração sérica de LH e E2 no dia da abertura vaginal. O tratamento com Dieta de Cafeteria não modificou a expressão de *Gnrh1* mRNA, *Kiss1* mRNA e *Kiss1r* mRNA, porém aumentou a expressão de *Lepr* mRNA em amostras contendo a Banda Diagonal de Broca e hipotálamo. A maior concentração de leptina não foi correlacionada com a maior expressão de *Lepr* mRNA. Os resultados sugerem que a introdução precoce de alimentos processados pode alterar o padrão fisiológico de ingestão alimentar e estimular o desenvolvimento do tecido adiposo intra-abdominal e a liberação de leptina. Um limiar de concentração de leptina parece ser um elemento permissivo para a instalação da puberdade em condições controle, porém uma elevação precoce pode estimular os reguladores fisiológicos e adiantar o início da puberdade.

Palavras-chave: Dieta de Cafeteria; Ingestão alimentar; Abertura vaginal; Tecido adiposo intra-abdominal; leptina; *Gnrh1*; *Kiss1*; *Kiss1r*; *Lepr*.

ABSTRACT

Puberty is a stage of development marked by the appearance of secondary sexual characteristics, culminating in the achievement of reproductive capacity. Some observational studies support the notion that there is an early onset of puberty in girls related to obesity. Puberty starts with the activation of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurons, which stimulate the release of luteinizing hormone (LH) by gonadotrophs, and increased gonadal production of 17β -estradiol (E2). The kisspeptidergic system, comprising the kisspeptin peptide (KiSS-1) and the kisspeptin receptor (KISS1R), seems to activate GnRH neurons and puberty onset. The kisspeptidergic system is modulated by peripheral signals related to the body energy storage, such as the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and the leptin. In an obesity situation, the levels of leptin and IGF-1 are increased, suggesting that these factors may exert modulation of the kisspeptidergic system and the puberty onset. Thus, this study examined the effect of obesity on puberty onset in female rats and the expression of key genes (GnRH, kisspeptin and its receptor) and its potential regulators (leptin, IGF-1 and E2). Wistar female rats weaned at 21 days were allocated to the Control group (chow and water *ad libitum*) or to the Cafeteria Diet group (processed foods consumed by humans). Every day, the animals were inspected for vaginal opening (puberty onset signal) and the food intake was measured. On the day of vaginal opening, the animals were decapitated and the brain and blood were collected and stored. Expression of genes *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* and *Lepr* were analyzed in the collected brains by qPCR. Serum LH, E2, leptin and IGF-1 were analyzed by ELISA. Intra-abdominal adipose tissue, the uterus, the ovaries and adrenal glands were also dissected and weighed. The results have shown higher energy and fat intake and early vaginal opening in the Cafeteria Diet group. The ovarian weight was increased by the Cafeteria Diet, although the weight of the uterus and adrenal have not changed. These animals demonstrated lower body weight, but with increased intra-abdominal adipose tissue and high leptin levels, both associated with each other and with the day of vaginal opening in Cafeteria Diet group. The Cafeteria Diet has not changed serum LH and E2 on the day of vaginal opening. Treatment with Cafeteria Diet has not changed the expression of *Gnrh1* mRNA, *Kiss1* mRNA and *Kiss1r* mRNA, but increased the expression of *Lepr* mRNA

in brain samples from Diagonal Band of Broca and hypothalamus. The higher concentration of leptin was not associated with the increased expression of *Lepr* mRNA. The results suggest that early access to processed foods can change the physiological pattern of food intake and stimulate the development of obesity and the release of leptin. A leptin threshold appears to be a permissive factor for puberty onset under control conditions, but it may overlap other physiological regulators and trigger early puberty onset in obesity conditions.

Keywords: Cafeteria Diet; Food intake; Vaginal opening; Intra-abdominal adipose tissue; leptin; Gnrh1; Kiss1; Kiss1r; Lepr.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1. Desenho experimental.....	33
Fig. 2. Imagens ilustrativas da região genital de uma fêmea de rata Wistar do desmame (dia 21) até a abertura vaginal (instalação da puberdade) no dia 31.....	36
Fig. 3. Imagens ilustrativas das diferentes apresentações do orifício vaginal de 18 fêmeas de rata Wistar no dia da abertura vaginal (instalação da puberdade).....	37
Fig. 4. Localização dos cortes coronais realizados em encéfalo de rato.....	39
Fig. 5. Dissecção de amostra de encéfalo contendo a Banda Diagonal de Broca e hipotálamo.....	40
Fig. 6. Curva de Melt e gel de agarose dos produtos amplificados por qPCR.....	46
Fig. 7. Ingestão alimentar no período juvenil e puberal.....	50
Fig. 8. Curvas de Kaplan-Meier da proporção de animais com abertura vaginal.....	51
Fig. 9. Peso de órgãos do sistema reprodutor na abertura vaginal.....	52
Fig. 10. Concentração sérica de hormônios do eixo HHG no dia da abertura vaginal.....	52
Fig. 11. Correlação entre LH e E2 no dia da abertura vaginal.....	53
Fig. 12. Peso corporal, ganho de peso e peso do tecido adiposo intra-abdominal e adrenais no dia da abertura vaginal.....	55
Fig. 13. Correlação entre o peso corporal no dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal.....	56
Fig. 14. Correlação entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal.....	57
Fig. 15. Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e o dia da abertura vaginal.....	58
Fig. 16. Concentração de hormônios IGF-1 e leptina no dia da abertura vaginal.....	59

Fig. 17. Correlação entre a concentração sérica de leptina e a abertura vaginal.....	60
Fig. 18. Correlação entre o tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal.....	61
Fig. 19. Expressão de genes do sistema kisspeptina e do gene <i>Gnrh1</i>	62
Fig. 20. Correlação entre a expressão de <i>Gnrh1</i> mRNA e a abertura vaginal.....	63
Fig. 21. Correlação entre a expressão de <i>Gnrh1</i> mRNA e LH no dia da abertura vaginal.....	64
Fig. 22. Correlação entre IGF-1 e a expressão de <i>Gnrh1</i> mRNA.....	65
Fig. 23. Correlação entre <i>Kiss1</i> mRNA e <i>Gnrh1</i> mRNA.....	66
Fig. 24. Correlação entre <i>Kiss1</i> mRNA e a abertura vaginal.....	67
Fig. 25. Correlação entre <i>Kiss1r</i> mRNA e a abertura vaginal.....	68
Fig. 26. Correlação entre a concentração sérica de leptina e <i>Kiss1</i> mRNA.....	69
Fig. 27. Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão de <i>Kiss1</i> mRNA.....	70
Fig. 28. Correlação entre a concentração sérica de E2 e a expressão de <i>Kiss1</i> mRNA.....	71
Fig. 29. Correlação entre a concentração sérica de leptina e <i>Kiss1</i> mRNA.....	72
Fig. 30. Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene <i>Lepr</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da Dieta de Cafeteria de acordo com a distribuição entre os grupos de alimentos.....	34
Tabela 2. Análise da composição de nutrientes de acordo com o grupo de alimentos.....	35
Tabela 3. Dados dos <i>primers</i> utilizados nas análises de expressão gênica.....	43
Tabela 4. Componentes utilizados na reação de qPCR.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Actb: Gene da β -actina

E2: 17 β -estradiol

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

Gnrh1: Gene do hormônio liberador de gonadotrofinas

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1

Kiss1: Gene da kisspeptina

KiSS1: kisspeptina

Kiss1r: Gene do receptor da kisspeptina

KiSS1R: receptor de kisspeptina

Lepr: Gene do receptor Ob-Rb da leptina

LH: hormônio luteinizante

mRNA: RNA mensageiro

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo-real

AVPV: Núcleo periventricular anteroventral

ARC: Núcleo arqueado do hipotálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E INÍCIO DA PUBERDADE.....	17
1.2	ATIVAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GÔNADA E O INÍCIO DA PUBERDADE.....	19
1.3	SISTEMA KISSPEPTINA E O INÍCIO DA PUBERDADE.....	21
1.4	ESTADO NUTRICIONAL, OBESIDADE E INÍCIO DA PUBERDADE.....	23
1.5	TECIDO ADIPOSO, LEPTINA E O RECEPTOR Ob-Rb DA LEPTINA.....	25
1.6	MODULAÇÃO DE NEURÔNIOS QUE SECRETAM GnRH E SISTEMA KISSPEPTINA PELA LEPTINA E IGF-1.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	HIPÓTESES.....	30
4	OBJETIVOS.....	31
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1	ANIMAIS.....	32
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
5.3	DIETA DE CAFETERIA.....	34
5.4	INGESTÃO ALIMENTAR.....	35
5.5	ABERTURA VAGINAL – INSTALAÇÃO DA PUBERDADE.....	35
5.6	DOSAGENS HORMONAIS – 17 β -ESTRADIOL, LH, IGF-1 E LEPTINA....	38
5.7	PESO DO TECIDO ADIPOSO INTRA-ABDOMINAL, OVÁRIOS, ÚTERO E ADRENAIS.....	38

5.8	DISSECAÇÃO DA AMOSTRA DO ENCÉFALO CONTENDO A BANDA DIAGONAL DE BROCA E HIPOTÁLAMO.....	39
5.9	EXPRESSÃO DOS GENES <i>Kiss1</i> , <i>Kiss1r</i> , <i>Gnrh1</i> , <i>Lepr</i>	40
5.9.1	Extração e Quantificação de RNA Total.....	41
5.9.2	Síntese de DNA Complementar (cDNA).....	42
5.9.3	Análise de Expressão Gênica – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	42
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6	RESULTADOS.....	48
6.1	INGESTÃO ALIMENTAR NO PERÍODO JUVENIL E PERIPUBERAL.....	48
6.2	IDADE DA ABERTURA VAGINAL, PESO DO ÚTERO E OVÁRIOS E CONCENTRAÇÃO DE LH E E2.....	51
6.3	PESO CORPORAL, TECIDO ADIPOSEO INTRA-ABDOMINAL E PESO DAS ADRENAIS NO DIA DA ABERTURA VAGINAL.....	54
6.4	CORRELAÇÃO ENTRE O PESO CORPORAL E A ABERTURA VAGINAL.....	56
6.5	CORRELAÇÃO ENTRE O PESO DO TECIDO ADIPOSEO INTRA-ABDOMINAL E A ABERTURA VAGINAL.....	58
6.6	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-1 (IGF-1) E LEPTINA NO DIA DA ABERTURA VAGINAL.....	59
6.7	CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LEPTINA E O DIA DA ABERTURA VAGINAL.....	59
6.8	CORRELAÇÃO ENTRE O PESO DO TECIDO ADIPOSEO INTRA-ABDOMINAL E A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LEPTINA NO DIA DA ABERTURA VAGINAL.....	60

6.9	EXPRESSÃO DOS GENES <i>Gnrh1</i> , <i>Kiss1</i> , <i>Kiss1r</i> E <i>Lepr</i> EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO NO DIA DA ABERTURA VAGINAL.....	62
6.10	ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE COMPONENTES DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE NA ABERTURA VAGINAL.....	63
6.10.1	Correlação entre a expressão do gene <i>Gnrh1</i> e a Abertura Vaginal.....	63
6.10.2	Correlação entre a expressão do gene <i>Gnrh1</i> e a concentração sérica de Hormônio Luteinizante (LH) no dia da Abertura Vaginal.....	64
6.11	ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATOR PERIFÉRICO E A EXPRESSÃO DE <i>Gnrh1</i> mRNA NA ABERTURA VAGINAL.....	65
6.11.1	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene <i>Gnrh1</i> no dia da Abertura Vaginal.....	65
6.12	ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATOR CENTRAL E A EXPRESSÃO DE <i>Gnrh1</i> mRNA NA ABERTURA VAGINAL.....	66
6.12.1	Correlação entre a expressão do gene <i>Kiss1</i> e o gene <i>Gnrh1</i> no dia da Abertura Vaginal.....	66
6.13	ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE COMPONENTES DO SISTEMA KISSPEPTINA E A ABERTURA VAGINAL.....	67
6.13.1	Correlação entre a expressão do gene <i>Kiss1</i> e a Abertura Vaginal.....	67
6.13.2	Correlação entre a expressão do gene <i>Kiss1r</i> e a Abertura Vaginal....	68
6.14	ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES PERIFÉRICOS E A EXPRESSÃO DE <i>Kiss1</i> mRNA e <i>Kiss1r</i> mRNA NA ABERTURA VAGINAL.....	69
6.14.1	Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene <i>Kiss1</i> no dia da Abertura Vaginal.....	69
6.14.2	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene <i>Kiss1</i> no dia da Abertura Vaginal.....	70

6.14.3	Correlação entre a concentração sérica de 17 β -estradiol (E2) e a expressão do gene <i>Kiss1</i> no dia da Abertura Vaginal.....	71
6.14.4	Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene <i>Kiss1r</i> no dia da Abertura Vaginal.....	72
6.15	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A SINALIZAÇÃO DAS RESERVAS DE ENERGIA E A EXPRESSÃO DE <i>Lepr</i> mRNA NO DIA DA ABERTURA VAGINAL.....	73
6.15.1	Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene <i>Lepr</i> no dia da Abertura Vaginal.....	73
7	DISCUSSÃO.....	74
8	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO - ARTIGO SUBMETIDO.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1. DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E INÍCIO DA PUBERDADE

A maturação sexual de um organismo é alcançada após longo processo de desenvolvimento somático e do sistema reprodutor que permite ao final a plena capacidade de procriar. Em humanos, o padrão de desenvolvimento somático é marcado por aumentos não lineares da estatura e do peso corporal durante a infância e próximo à puberdade (ROGOL, 2003). Na infância, a velocidade de crescimento linear é reduzida em relação ao período fetal, embora o crescimento seja um processo constante (GASSER *et al.*, 1990; VELDHUIS *et al.*, 2005). Da mesma maneira, o ganho de peso é reduzido até o início da puberdade. Nos primeiros três meses de vida há um aumento do ganho de peso, com reduções graduais que atingem um valor constante de 6-7 gramas por dia a partir dos 2 anos de idade, sendo que novas mudanças no padrão de ganho de peso são observadas a partir do início e curso da puberdade (VELDHUIS *et al.*, 2005).

O desenvolvimento dos órgãos reprodutores femininos apresentam mudanças estruturais que refletem o estado de maturação do organismo ao longo do período infantil e próximo da puberdade. Em meninas na faixa etária entre 1 e 12 anos de idade, o volume de ambos os ovários apresenta aumento até aproximadamente os 6 anos de idade, sendo que um novo aumento do volume ovariano é observado na faixa etária entre os 10 e 12 anos de idade (BADOURAKI *et al.*, 2008; HERTER *et al.*, 2002). Modificações das dimensões do útero também apresentam um padrão semelhante ao longo do desenvolvimento. Em meninas, observa-se um aumento do comprimento do útero até os 6 anos de idade, permanecendo nessas condições até os 10 anos de idade, quando novo aumento do comprimento do útero é observado (BADOURAKI *et al.*, 2008; HERTER *et al.*, 2002). Por outro lado, o volume uterino aumenta gradativamente a partir do primeiro ano de vida até aproximadamente os 12 anos de idade, por volta do início do processo puberal (BADOURAKI *et al.*, 2008; HERTER *et al.*, 2002). Nesses estudos, a avaliação morfológica dos ovários demonstrou elevada frequência de meninas entre 1 e 7 anos de idade com ausência

de visualização de folículos e baixa frequência de meninas com presença de folículos, enquanto que na faixa etária a partir dos 8 anos a frequência de meninas com ausência de visualização de folículos diminui e há o surgimento de meninas com visualização de número maior de folículos (HERTER *et al.*, 2002).

O desenvolvimento pós-natal em fêmeas de ratos pode ser dividido em 4 fases: o período neonatal, que inicia ao nascimento e termina no dia 7 pós-natal; o período infantil, que inicia no dia 8 pós-natal e estende-se até o dia 21 pós-natal; o período juvenil, que termina entre o dia 30 e 32 pós-natal; e o período peripuberal, que apresenta uma duração variável e termina no início da puberdade (OJEDA *et al.*, 1980). Durante as diferentes fases de desenvolvimento são observados padrões específicos de ganho de peso. A velocidade de ganho de peso corporal é acentuada até o dia 10 pós-natal, quando uma redução acentuada ocorre e um novo pico de crescimento ocorre no período juvenil (OŠT'ÁDALOVÁ; BABICKÝ, 2012). O peso dos órgãos do sistema reprodutor de fêmeas de rato mudam gradativamente ao longo do desenvolvimento. Os ovários apresentam um pequeno aumento do seu peso do período neonatal até aproximadamente a metade do período infantil, quando é observado um aumento acentuado que perdura até aproximadamente a metade do período juvenil (RAMIREZ; SAWYER, 1965; REITER *et al.*, 1972). O mesmo padrão ocorre com o diâmetro dos folículos ovarianos, que aumentam linearmente ao longo do período infantil e juvenil inicial (REITER *et al.*, 1972). Após uma ligeira estagnação no seu desenvolvimento, os ovários tornam a aumentar de peso no início do período peripuberal, mantendo esse padrão nos momentos iniciais da puberdade (OJEDA *et al.*, 1976). Da mesma maneira, o útero passa por mudanças no seu peso ao longo do desenvolvimento. Após um crescimento linear até a metade do período infantil, o peso do útero não se modifica durante a metade inicial do período juvenil (REITER *et al.*, 1972), vindo a apresentar um aumento acentuado no período peripuberal e um pico no início da puberdade (OJEDA *et al.*, 1976).

A puberdade é um período que marca a transição de uma condição infantil para o estado adulto, onde ocorre o desenvolvimento de características sexuais secundárias, um crescimento ponderal acentuado e a fertilidade é alcançada, culminando na plena capacidade reprodutiva (GRUMBACH, 2002). As mudanças físicas e hormonais associadas com a puberdade são utilizadas como sinais do

processo de maturação sexual e indicadores do início da puberdade. Em meninas, o aparecimento dos pelos pubianos, chamado de pubarca, e o desenvolvimento das mamas, chamado de telarca, ocorrem entre os 8 e 10 anos (HERMAN-GIDDENS *et al.*, 1997; STYNE; GRUMBACH, 2012). O surgimento de pelos pubianos é coordenado primariamente pelo aumento de androgênios adrenais e é chamado de adrenarca, enquanto que o desenvolvimento das mamas está sob regulação dos estrogênios produzidos pelas células da granulosa nos folículos ovarianos (GRUMBACH, 2002). Posteriormente, entre 11 e 13 anos, ocorre a primeira menstruação ou menarca, devido ao aumento da produção de estrogênios ovarianos (HERMAN-GIDDENS *et al.*, 1997; STYNE; GRUMBACH, 2012). A primeira ovulação ocorre anos depois da primeira menstruação, sendo que os ciclos menstruais após a menarca são anovulatórios em cerca de 55% dos casos nos 2 anos seguintes a menarca, diminuindo para 22% após cinco anos. Critérios baseados nos estágios de desenvolvimento das mamas e dos pelos pubianos foram propostos por Tanner (TANNER, 1962), sendo que estudos observacionais têm sido realizados para identificar o estágio de maturação sexual a partir do grau de desenvolvimento das mamas, do surgimento de pelos pubianos e pela idade da menarca (AKSGLAEDE *et al.*, 2009; HERMAN-GIDDENS *et al.*, 1997). Em fêmeas de rato, o início ou a instalação da puberdade pode ser estimada a partir da visualização externa da vagina, que antes da puberdade encontra-se completamente obstruída, sendo que pela ação gradual da estimulação estrogênica, tornar-se completamente canalizada (OJEDA *et al.*, 1976; OJEDA; SKINNER, 2006), sendo que a abertura vaginal ocorre normalmente no dia posterior ao primeiro pico ovulatório de liberação de hormônio luteinizante (LH) (OJEDA *et al.*, 1976).

1.2 ATIVAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GÔNADA E O INÍCIO DA PUBERDADE

O início da puberdade em fêmeas e as modificações corporais que caracterizam o início dessa fase do desenvolvimento são reflexos da maturação dos componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (H-H-G) e da ativação dos neurônios que formam a porção hipotalâmica do eixo H-H-G.

O componente hipotalâmico do eixo é formado por neurônios que secretam o decapeptídeo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e estão localizados no hipotálamo médio basal e núcleo arqueado em humanos (GRUMBACH, 2002), enquanto estão distribuídos de maneira difusa no sistema nervoso central de ratos em locais como a região septal, Banda Diagonal de Broca, área pré-óptica medial, área pré-óptica lateral, núcleo pré-óptico mediano, hipotálamo anterior e hipotálamo lateral (IRWIG *et al.*, 2004). O GnRH é sintetizado como parte de um pró-hormônio que sofre processamento enzimático em seus grânulos de secreção, sendo um produto do gene *Gnrh1* localizado no cromossomo 8p que apresenta em todos os mamíferos 4 exons (AIRES, 2012). O GnRH é liberado na eminência mediana e coletado pelo sistema vascular porta-hipofisário, permitindo a modulação da adeno-hipófise. Na adeno-hipófise, os gonadotrofos hipofisários secretam o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (AIRES, 2012) de maneira pulsátil quando estimulados pelo GnRH (GRUMBACH, 2002). Os hormônios LH e FSH agem fundamentalmente sobre os ovários, estimulando o crescimento e diferenciação tornando-os aptos para a reprodução. No ovário, o FSH estimula o crescimento e maturação dos folículos ovarianos, bem como a síntese de estrógenos pelas células da granulosa. O LH age sinergicamente com o FSH sobre a maturação dos folículos ovarianos e secreção de estrógenos, além de participar da ovulação (SISK; FOSTER, 2004). Os estrógenos secretados pelas gônadas, principalmente o E2, exercem *feedback* negativo sobre o eixo H-H-G quando este está plenamente maduro (SISK; FOSTER, 2004).

O início da puberdade é caracterizado pela ativação dos neurônios secretores de GnRH após relativa inatividade durante o período infantil em humanos (GRUMBACH, 2002). Durante o período peripuberal e puberal inicial, a concentração plasmática de GnRH se mantém estável, enquanto o conteúdo hipotalâmico diminui no dia da abertura vaginal em ratos (OJEDA *et al.*, 1976), indicando maior liberação do hormônio na eminência mediana. A ontogenia da expressão do gene *Gnrh1*, o qual é responsável pela tradução do peptídeo GnRH, demonstra que há um aumento da expressão de *Gnrh1* mRNA ao longo do desenvolvimento em fêmeas (GORE, 1998). Ao longo da maturação sexual, a frequência de liberação de GnRH aumenta de forma significativa entre o período peripuberal e logo após a abertura vaginal em fêmeas de rato (SISK *et al.*, 2001).

Além disso, a importância da liberação de GnRH para a deflagração da puberdade é demonstrada pelo adiantamento da abertura vaginal em fêmeas de rato juvenis estimuladas com GnRH exógeno (URBANSKI; OJEDA, 1987), demonstrando claramente a relevância dos neurônios GnRH para a instalação da puberdade em condições fisiológicas. O aumento da frequência de liberação de GnRH no início da puberdade está associado com o aumento da frequência de liberação de LH (URBANSKI; OJEDA, 1987), assim como o aumento da amplitude do pulso de LH e FSH observados na tarde do dia da abertura vaginal (OJEDA *et al.*, 1976). A maior frequência de liberação de LH observada próximo à abertura vaginal exerce efeito importante sobre a esteroidogênese ovariana. Em extratos de ovário, a manipulação *in vitro* da concentração de LH para um padrão semelhante ao observado próximo à abertura vaginal resulta em aumento da liberação de E2 e Progesterona (URBANSKI; OJEDA, 1985a). O E2 exerce efeitos importantes sobre o desenvolvimento uterino e abertura vaginal (RAMIREZ; SAWYER, 1965) e, ao longo do ciclo puberal, exerce *feedback* positivo sobre os gonadotrofos hipofisários causando aumento de pulsos de LH necessários para a ovulação (URBANSKI; OJEDA, 1985b). Assim, a ativação dos neurônios GnRH é um evento essencial para a instalação da puberdade, porém os fatores que modulam essa ativação são pouco conhecidos.

1.3 SISTEMA KISSPEPTINA E O INÍCIO DA PUBERDADE

A ativação e o padrão de liberação de GnRH observado no início da puberdade parece ser o resultado do predomínio de estímulos excitatórios sobre estímulos inibitórios exercidos diretamente sobre os neurônios GnRH (OJEDA *et al.*, 2006). Durante o período juvenil e peripuberal em ratos, os mecanismos de comunicação célula-célula no hipotálamo se estabelecem e a liberação de GnRH sofre influência de estímulos excitatórios e inibitórios. Entre os sistemas neuronais envolvidos com a excitação dos neurônios GnRH em ratos para o início da puberdade estão os neurônios que liberam o neurotransmissor glutamato (JEAN-PIERRE BOURGUIGNON *et al.*, 1990), a noradrenalina (OJEDA *et al.*, 1986) e o neuropeptídeo Y (NPY) (OJEDA; SKINNER, 2006). Por outro lado, as ações

excitatórias são contra-reguladas por agentes inibitórios como o ácido gama-aminobutírico (GABA) (DECAVEL; VAN DEN POL, 1990) e peptídeos opióides como as encefalinas (OJEDA; SKINNER, 2006).

Um sistema que emergiu nos últimos anos como elemento regulador essencial para a deflagração da puberdade foi o neuropeptídeo kisspeptina (KiSS-1) (NAVARRO *et al.*, 2004) e seu receptor KiSS-1r (KiSS1r), conhecido inicialmente como GPR54 (SEMINARA *et al.*, 2003). O peptídeo KiSS-1 é um produto do gene supressor de metástase-Kiss-1 (*Kiss1*) enquanto seu receptor é produto do gene *Kiss1r*. Neurônios produtores de KiSS-1 ocorrem em vários núcleos do hipotálamo, sendo as principais populações de neurônios localizadas na área pré-óptica (núcleo periventricular anteroventral – AVPV) e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo em ratos (CLARKSON *et al.*, 2009; KNOX *et al.*, 2009).

Resultados de investigações de vários grupos de pesquisa consolidaram o conceito de que a KiSS-1 é um elemento fundamental para a função reprodutiva. Neurônios hipotalâmicos produtores de kisspeptina projetam-se diretamente aos neurônios que secretam GnRH exercendo forte estímulo excitatório e causando sua ativação (CARATY; FRANCESCHINI, 2008; HAN *et al.*, 2005; KAUFFMAN; CLIFTON; STEINER, 2007; ROA *et al.*, 2008). Grande parte da população de neurônios que secretam GnRH expressam mRNA para os receptores KiSS1r que são essenciais para a sinalização exercida pela KiSS-1 sobre os neurônios que secretam GnRH (HAN *et al.*, 2005; IRWIG *et al.*, 2004; PIELECKA-FORTUNA; CHU; MOENTER, 2008). Estudos experimentais demonstram que o peptídeo KiSS-1 é capaz de estimular a liberação de LH quando injetado no ventrículo lateral e que essa liberação é mediada pela estimulação de neurônios que secretam GnRH (IRWIG *et al.*, 2004). Além disso, o peptídeo KiSS-1 também parece estar envolvido com o aumento da expressão de *Gnrh1* mRNA (IRWIG *et al.*, 2004) e ovulação em fêmeas de rato (MATSUI *et al.*, 2004). A importância da sinalização da KiSS-1 é um fator-chave na instalação da puberdade em humanos, roedores e macacos (DE ROUX *et al.*, 2003; FUNES *et al.*, 2003; NAVARRO, V M *et al.*, 2004; SEMINARA *et al.*, 2003; SHAHAB *et al.*, 2005). Esta afirmação é comprovada por resultados que demonstram que o peptídeo KiSS-1 não é observado nas fibras junto aos corpos celulares dos neurônios que secretam GnRH no período neonatal, vindo a se expressar somente em período muito próximo à instalação da puberdade

(CLARKSON; HERBISON, 2006). Além disso, estudos recentes demonstram que o início da puberdade e fertilidade em fêmeas é resultado da sinalização do peptídeo KiSS-1 via KiSS1r localizado em neurônios que secretam GnRH (KIRILOV *et al.*, 2013).

1.4 ESTADO NUTRICIONAL, OBESIDADE E INÍCIO DA PUBERDADE

A maturação e a função reprodutiva, incluindo a instalação da puberdade, são afetadas pelo estado das reservas energéticas do organismo (FERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2005, 2006; TENA-SEMPERE, 2007), sendo que alterações da homeostase energética são associadas a diferentes graus de distúrbios da função reprodutiva. Em fêmeas de rato, a restrição alimentar durante o período peripuberal (SÁNCHEZ-GARRIDO *et al.*, 2013) e no período pós-natal (IWASA *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-GARRIDO *et al.*, 2013) claramente afeta a maturação sexual e resulta em atraso da abertura vaginal e início da puberdade. Por outro lado, fêmeas de rato apresentam aceleração do processo de maturação sexual e adiantamento da abertura vaginal quando são submetidas a condições experimentais com aumento da disponibilidade de alimentos por meio da redução do número de filhotes no período pós-natal (SMITH; SPENCER, 2012).

Dados epidemiológicos sustentam a hipótese de que há uma tendência para o surgimento de sinais de puberdade em meninas cada vez mais cedo. Nos Estados Unidos, os dados obtidos a partir da década de 40 revelaram redução de aproximadamente um ano na idade em que as meninas apresentaram o estágio B2 de Tanner para desenvolvimento das mamas, o que é condizente com o início da puberdade (EULING *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram que o surgimento de desenvolvimento das mamas ocorreu antes das idades usualmente observadas, sendo que em alguns casos foram inferiores aos 9 anos de idade (HERMAN-GIDDENS *et al.*, 1997). Algumas hipóteses para o adiantamento da idade de início da puberdade recaem sobre o aumento da incidência de obesidade observada em meninas nas faixas etárias pré-puberes (OGDEN *et al.*, 2012). Evidências epidemiológicas sugerem que possuir um maior Índice de Massa Corporal (IMC)

aumenta as chances do adiantamento de aparecimento de sinais de puberdade como telarca, pubarca e menarca (ROSENFELD; LIPTON; DRUM, 2009).

O efeito da obesidade sobre a instalação da puberdade tem sido estudado por meio de modelos experimentais que utilizam dietas com elevado teor de lipídeos (*high-fat diet*) (BOUKOUVALAS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; LIE; OVERGAARD; MIKKELSEN, 2013; RAMALEY, 1981). Nesses estudos, fêmeas de roedores são submetidas à *high-fat diet* no período juvenil inicial e a abertura vaginal é verificada como indicador externo do início da puberdade. Em alguns grupos de pesquisa, a oferta de *high fat diet* logo após o desmame resulta em aumento de peso corporal e adiantamento da abertura vaginal (BOUKOUVALAS *et al.*, 2008; FRISCH, R E; HEGSTED; YOSHINAGA, 1977; LI *et al.*, 2012). Contudo, outros grupos de pesquisa revelam resultados divergentes, demonstrando que fêmeas alimentadas com *high fat diet* durante o período juvenil e peripuberal não evidenciam mudanças na instalação da puberdade (LIE; OVERGAARD; MIKKELSEN, 2013; RAMALEY, 1981). Algumas explicações sugerem que parte das divergências encontradas sejam decorrentes do teor de lipídeos utilizados nessas dietas. Esse fato parece importante, pois alguns trabalhos utilizando alimentação com macronutrientes isolados como carboidratos, proteínas e lipídeos sugerem que a ingestão de lipídeos está correlacionada com a instalação da puberdade em fêmeas e isso parece ser mediado pela ação sobre peptídeos orexigênicos e esteroides gonadais que atuam sobre o H-H-G (LEIBOWITZ *et al.*, 2009). Embora as bases para estes efeitos sobre a instalação da puberdade possam estar associadas a numerosas interações entre redes neuroendócrinas que controlam o balanço energético e a função gonadotrófica nos diversos níveis do eixo H-H-G (CASTELLANO *et al.*, 2009), ainda não estão claros os mecanismos pelos quais a maior quantidade de reservas de energia modularia os reguladores que determinam o aparecimento das características sexuais secundárias e o início da puberdade.

1.5 TECIDO ADIPOSEO, LEPTINA E O RECEPTOR Ob-Rb DA LEPTINA

O tecido adiposo é um órgão endócrino que sintetiza e libera proteínas conhecidas como adipocinas e citocinas, que exercem ações sobre diferentes sistemas biológicos e que são importantes reguladores do metabolismo energético e de processos inflamatórios (SCHERER, 2006). A leptina, um hormônio derivado do tecido adiposo (MASUZAKI *et al.*, 1995) e presente na circulação em quantidade proporcional à quantidade de tecido adiposo (MAFFEI *et al.*, 1995) é um peptídeo de 16-kDa, formado por 167 aminoácidos, conhecido por atuar sobre os reguladores centrais da ingestão alimentar produzindo saciedade, sendo um componente importante no processo de sinalização do estado nutricional ao H-H-G (IWASA *et al.*, 2010).

Inativações genéticas da leptina levam a alterações metabólicas, e também a alterações reprodutivas, tanto em roedores quanto em humanos (CASANUEVA; DIEGUEZ, 1999; TENA-SEMPERE; BARREIRO, 2002; TENA-SEMPERE, 2007). Algumas evidências sugerem que um determinado limiar de concentração plasmática de leptina é indispensável para a instalação da puberdade e a manutenção da capacidade reprodutiva, principalmente em fêmeas, embora algumas evidências sugiram que em condições fisiológicas a leptina não é um fator deflagrador da puberdade, mas sim atua como um fator permissivo para o curso normal da maturação sexual e início da puberdade (CHEUNG *et al.*, 1997; TENA-SEMPERE, 2007). Contudo, estudos experimentais demonstram que a injeção intraperitoneal de leptina é capaz de adiantar o início do processo puberal em fêmeas de camundongo (AHIMA *et al.*, 1997) além de exercer efeito importante sobre a maturação de órgãos do sistema reprodutor como útero, ovários e ovidutos (CHEHAB *et al.*, 1997).

As ações da leptina são mediadas pela ligação aos receptores ObR, sendo que o gene *Lepr* é capaz de codificar pelo menos 6 isoformas do peptídeo: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re e Ob-Rf (WADA *et al.*, 2014). Entre as diferentes isoformas dos receptores de leptina, a forma longa Ob-Rb possui ampla expressão em núcleos hipotalâmicos envolvidos com homeostase energética e reprodução, como por exemplo os núcleos arqueado, dorsomedial, ventromedial e pré-mamilar

ventral (ELMQUIST *et al.*, 1998; FEI *et al.*, 1997), sendo a principal via de sinalização para os efeitos da leptina sobre a regulação da ingestão alimentar (WADA *et al.*, 2014) e reprodução (DONATO *et al.*, 2011). O estado nutricional e a leptina parecem exercer efeitos importante sobre a expressão do receptor *Lepr*. Em condições de balanço energético positivo, ratos machos submetidos à *high-fat diet* por 12 (XU *et al.*, 2008) e 8 semanas (LIU *et al.*, 2007) apresentam aumento da concentração de leptina e um nível reduzido de *Lepr* mRNA no hipotálamo, sugerindo um efeito de *downregulation* sobre o receptor de leptina. Contudo, essas evidências não foram reproduzidas em outros trabalhos que não observaram mudanças na expressão de *Lepr* mRNA mesmo com elevação da leptina em 8 semanas de estudo (PAGE *et al.*, 2009). Embora as divergências possam ser decorrentes de diferentes desenhos experimentais, ainda não está claro o efeito do balanço energético positivo durante o período juvenil e puberal sobre a expressão do gene *Lepr* e o início da puberdade.

1.6 MODULAÇÃO DE NEURÔNIOS QUE SECRETAM GnRH E SISTEMA KISSPEPTINA PELA LEPTINA E IGF-1

A ação permissiva da leptina sobre o eixo H-H-G ocorre primariamente no hipotálamo, supostamente por meio da modulação dos neurônios que secretam GnRH (CUNNINGHAM; CLIFTON; STEINER, 1999). Entretanto, algumas evidências sustentam que os neurônios GnRH não apresentam receptores para leptina em condições fisiológicas (QUENNELL *et al.*, 2009), sugerindo a ação da leptina sobre fatores intermediários que se projetam para os neurônios GnRH.

Evidências experimentais indicam que a leptina, o hormônio sinalizador da suficiência energética, funciona como um regulador do sistema kisspeptina hipotalâmico. A expressão de mRNA para kisspeptina hipotalâmica é reduzida em animais deficientes de leptina e em diabéticos, e é restabelecida com a reposição de leptina (CASTELLANO *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006). Estudos de hibridização *in situ* demonstram que aproximadamente 40% dos neurônios que expressam *Kiss1* mRNA no núcleo arqueado co-expressam *Leprb* (SMITH *et al.*, 2006), enquanto

outros confirmam os achados, mas com menor percentual de co-localização (CRAVO *et al.*, 2011). Além disso, a expressão de *Leprb* mRNA em hipotálamo de fêmeas de rato aumenta gradativamente com a idade atingindo um pico após a puberdade (SMITH; WADDELL, 2003). Esses dados sugerem que a leptina participa do controle metabólico sobre os neurônios GnRH/eixo H-H-G e que pode ser um fator sinalizador do estado metabólico do organismo para os neurônios GnRH por meio dos neurônios KiSS1.

O estado de desenvolvimento somático também é um elemento importante de sinalização sobre diferentes sistemas envolvidos com a instalação da puberdade. Resultados recentes indicam a participação do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) no processo de sinalização que regula a secreção de GnRH no momento da instalação de puberdade (DIVALL *et al.*, 2010). O envolvimento de IGF-1 de origem central é considerado um fator importante de sinalização sobre neurônios que secretam GnRH e neurônios que secretam kisspeptina, pois a expressão de IGF-1 mRNA aumenta no hipotálamo de fêmeas no período pré-puberal (DAFTARY; GORE, 2003). No mesmo sentido, a concentração circulante de IGF-1 eleva-se logo antes da puberdade em roedores, ruminantes, primatas, incluindo humanos (HANDELSMAN *et al.*, 1987; HINEY *et al.*, 1996; ROBERTS *et al.*, 1990), sendo que em roedores a maior concentração plasmática de IGF-1 é acompanhada de maior expressão de IGF-1 mRNA no fígado (HINEY *et al.*, 1996). O IGF-1 atravessa a barreira sangue-cérebro e liga-se a seus receptores em diversas regiões do cérebro, inclusive na área pré-óptica, a qual expressa *Kiss1r* mRNA e *Gnrh1* mRNA. A administração de IGF-1 durante o desenvolvimento pré-puberal induz a secreção de GnRH e adianta o momento da instalação da puberdade em ratas (HINEY *et al.*, 1996) e em macacas (MARK E. WILSON, 1998). Recentemente, a geração de camundongos com ausência de expressão do receptor de IGF-1 seletivamente em neurônios que secretam GnRH promoveu desenvolvimento puberal tardio em fêmeas, o que não foi revertido pela administração exógena de IGF-1 (DIVALL *et al.*, 2010). Esta ação do IGF-1 ocorre, pelo menos em parte, por meio da estimulação da kisspeptina. A administração central ou sistêmica de IGF-1 no período pré-puberal aumentou a expressão de *Kiss1* mRNA na AVPV e ARC, aumento este que depende de uma adequada

concentração de E2, e é mediado pela fosforilação da proteína Akt (HINEY; SRIVASTAVA; LES DEES, 2010; HINEY *et al.*, 2009).

O conjunto dos dados mencionado anteriormente sugere que fatores periféricos que sinalizam o estado de energia e do desenvolvimento podem exercer influência sobre os diferentes níveis de controle central que são responsáveis pela instalação da puberdade. Assim, em condições de excesso de reservas de energia, a sinalização periférica precoce pode estimular o eixo H-H-G e o sistema kisspeptina para iniciar a puberdade.

2 JUSTIFICATIVA

Dados de estudos realizados em humanos sugerem haver nos últimos anos uma redução na idade de início da puberdade em meninas (EULING *et al.*, 2008; HERMAN-GIDDENS *et al.*, 1997), sendo este um tema relevante, visto que o adiantamento da puberdade parece estar associado com doenças cardiovasculares e câncer de mama na idade adulta (GOLUB *et al.*, 2008). Resultados de estudos epidemiológicos associam o aumento das reservas de energia com o adiantamento da instalação da puberdade em meninas (ROSENFELD; LIPTON; DRUM, 2009), sendo que os mecanismos envolvidos no adiantamento da puberdade em casos de obesidade são pouco conhecidos. O estado metabólico influencia a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e o início da puberdade, sendo que esses efeitos são mediados em parte pela ativação do sistema KiSS-1/KiSS1R. Contudo, ainda são necessários estudos que analisem a influência do estado metabólico em condições de balanço energético positivo, como na obesidade, sobre a expressão dos genes *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Lepr* em regiões do hipotálamo relacionadas com o GnRH na instalação da puberdade.

3 HIPÓTESES

A ingestão de alimentos palatáveis no período juvenil e peripuberal está associada com a obesidade e adiantamento do início da puberdade. A instalação precoce da puberdade associada com o excesso de tecido adiposo está relacionada com a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e com a expressão dos genes que compõem o sistema kisspeptina e gene *Lepr*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se a ingestão de uma dieta palatável pode alterar o consumo alimentar e o início da instalação da puberdade em ratas Wistar e se genes reguladores do GnRH podem estar sendo modulados por fatores sinalizadores do estado metabólico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a ingestão de ração padrão, ingestão de energia, carboidratos, proteína e lipídeos a partir do desmame até o dia da abertura vaginal de ratas submetidas à Dieta de Cafeteria e alimentação controle;
- 2) Avaliar o peso do tecido adiposo intra-abdominal, útero, ovários e adrenais no dia da abertura vaginal de ratas submetidas à Dieta de Cafeteria e alimentação controle desde o desmame;
- 3) Avaliar a concentração sérica de leptina, IGF-1, E2 e LH no dia da abertura vaginal de ratas submetidas à Dieta de Cafeteria e alimentação controle desde o desmame;
- 4) Avaliar a expressão dos genes *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Lepr* de amostra contendo a Banda Diagonal de Broca e hipotálamo em encéfalos coletados no dia da abertura vaginal de ratas submetidas à Dieta de Cafeteria e alimentação controle desde o desmame;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 40 fêmeas de ratos Wistar desmamadas com 21 dias de idade e provenientes de ninhadas padronizadas em 8 animais e com igual proporção de filhotes machos e fêmeas. Tal padronização teve por objetivo evitar que ninhadas com diferente número de animais e proporção de machos e fêmeas resultasse em variabilidade de peso corporal na época do desmame. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimental Animal (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Inicialmente, os animais foram distribuídos de forma aleatória em grupo Controle (n=20) e grupo Dieta de Cafeteria (n=20) e pesados em balança semi-analítica (SHIMADZU, SP, Brasil). O peso corporal no início do experimento foi semelhante entre os grupos (grupo Controle: $52,85 \pm 0,78$, n=20; grupo Dieta de Cafeteria: $52,53 \pm 0,90$, n=20; teste t de Student, $P > 0,05$). Os animais do grupo Controle tiveram acesso *ad libitum* à ração padrão de biotério (Nuvilab CR-1, NUVITAL, Brasil) e água, enquanto os animais do grupo Cafeteria tiveram acesso *ad libitum* a vários alimentos industrializados, ração padrão e água. A ração padrão apresentou densidade energética de 2,95 kcal/g e peso bruto distribuído em 55% de carboidratos, 22% de proteína e 4,5% de lipídeos. Ao longo dos experimentos, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (4 animais por caixa) com as seguintes dimensões (CxLXA) em mm: 410 x 340 x 160 (4 animais por caixa). Os animais foram mantidos condições controladas de temperatura (22-24° C), luminosidade (ciclo claro/escuro 12h/12h – luzes acessas às 6h) e umidade (40-60%) e independentemente do tratamento ao qual foram submetidos, todos os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração padrão de biotério e água ao longo dos experimentos. Ao final do protocolo experimental, os animais foram decapitados sem anestesia por guilhotina. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sendo a carta de aprovação identificada pelo número 21392.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental utilizado no presente estudo seguiu o disposto na Figura 1. A partir do desmame, a ingestão alimentar e o peso corporal dos animais foram avaliados diariamente entre 9h e 11h. A partir do dia 28 pós-natal, a ocorrência de abertura vaginal foi verificada diariamente das 7h às 9h e das 15h às 17h. No dia da abertura vaginal, os animais foram decapitados em guilhotina entre 18h e 20 h, visto que esse é o horário do pico de secreção de LH (OJEDA *et al.*, 1976). Foi coletado o sangue troncular para a separação do soro. O soro separado foi armazenado a -80° C até a realização das dosagens hormonais por ELISA de leptina, LH, E2 e IGF-1. Após a decapitação, os encéfalos foram imediatamente congelados e armazenados a -80° C para análises posteriores da expressão dos genes *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1*, *Lepr* e *Actb*. Após, procedeu-se a dissecação do tecido adiposo intra-abdominal, útero, ovário e adrenais. As carcaças e demais resíduos biológicos foram separados e encaminhados para descarte.

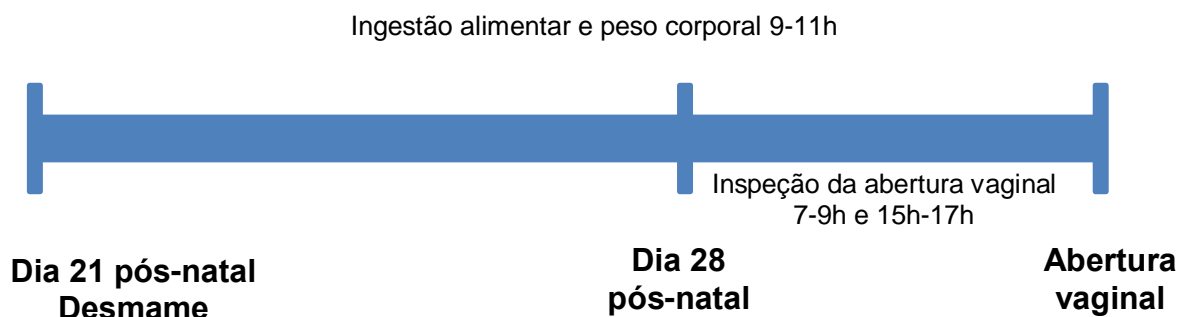


Fig.1. Desenho experimental.

5.3 DIETA DE CAFETERIA

A Dieta de Cafeteria empregada no presente estudo foi composta de alimentos industrializados usualmente ingeridos por humanos e adquiridos no comércio local. Os alimentos foram divididos em grupos (A, B e C, Tabela 1.) de maneira que a distribuição de nutrientes fosse semelhante entre os grupos (Tabela 2.). Para evitar que os mesmos alimentos fossem disponibilizados aos animais por mais de um dia consecutivo, cada grupo de alimentos foi ofertado ao longo do experimento seguindo o rodízio $A \rightarrow B \rightarrow C$. Dessa forma, cada grupo de alimentos foi repetido a cada quatro dias. Durante o experimento foram utilizados alimentos frescos e os valores nutricionais utilizados para as análises de ingestão de nutrientes foram obtidos dos rótulos dos produtos ou dos sites dos fabricantes.

Tabela 1 . Composição da Dieta de Cafeteria de acordo com a distribuição entre os grupos de alimentos. Os valores estão expressos por grama de alimento.

Alimento	Kcal	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lípido (g)	Sódio (mg)
Grupo A					
Salame (Majestade, Brasil)	3,38	0,00	0,32	0,24	12,48
Bisnaga Seven Boys (Seven Boys, Brasil)	3,10	0,55	0,11	0,05	4,73
Yokitos Bolinha Sabor Queijo (Yoki, Brasil)	4,84	0,60	0,06	0,24	8,96
Deliket Jelly Bean (Dori Alimentos, Brasil)	3,80	0,95	0,00	0,00	0,20
Coca-Cola (Coca-Cola, Brasil)	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05
Ração padrão (Nuvital, Brasil)	2,95	0,55	0,22	0,04	2,70
Grupo B					
Lingüiça (Sadia, Brasil)	3,20	0,00	0,18	0,28	15,74
Bolo de Chocolate (Nutrella, Brasil)	3,18	0,48	0,05	0,12	3,52
Bolacha Maria	4,46	0,73	0,09	0,13	3,23
Marshmallow Fini	3,35	0,79	0,05	0,00	0,33
Coca-Cola (Coca-Cola, Brasil)	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05
Ração padrão (Nuvital, Brasil)	2,95	0,55	0,22	0,04	2,70
Grupo C					
Presunto gordo Sadia	1,55	0,00	0,17	0,09	8,33
Salgadinho Fritello	5,08	0,52	0,08	0,29	6,40
Waffer chocolate (Bauducco, Brasil)	5,23	0,63	0,05	0,27	1,77
Bala de Goma (Dori Gomets)	3,60	0,90	0,00	0,00	0,50
Coca-Cola (Coca-Cola, Brasil)	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05
Ração padrão (Nuvital, Brasil)	2,95	0,55	0,22	0,04	2,70

Fonte: rótulo dos produtos e/ou site dos fabricantes.

Tabela 2. Análise da composição de nutrientes de acordo com o grupo de alimentos. Os valores são média \pm E.P.M.

Nutriente	Grupo A	Grupo B	Grupo C	P
Energia (kcal/g)	3,08 \pm 0,60	2,93 \pm 0,55	3,14 \pm 0,78	>0,05
Carboidratos (g)	0,46 \pm 0,14	0,44 \pm 0,13	0,45 \pm 0,14	>0,05
Proteína (g)	0,12 \pm 0,05	0,10 \pm 0,03	0,09 \pm 0,04	>0,05
Lipídeo (g)	0,10 \pm 0,05	0,10 \pm 0,04	0,12 \pm 0,05	>0,05
Sódio (mg)	5,85 \pm 2,04	4,26 \pm 2,37	3,30 \pm 1,37	>0,05

Fonte: elaborada pelo autor. Dados analisados por ANOVA.

5.4 INGESTÃO ALIMENTAR

A ingestão alimentar dos animais foi mensurada diariamente a partir da pesagem das sobras de cada alimento. Os alimentos foram pesados em balança semi-analítica (SHIMADZU do Brasil Comércio Ltda, SP, Brasil). Para a apresentação dos resultados de ingestão, dividiu-se a ingestão total de cada alimento em cada caixa pelo número de animais presente na caixa. Por meio dos valores de ingestão verificados em cada caixa em vinte quatro horas ao longo do experimento, calcularam-se os valores de ingestão de ração padrão (g), energia (kcal), carboidratos (g), proteínas (g) e lipídeos (g). Dessa forma, considerou-se a média da ingestão por caixa por dia em cada grupo entre o dia 21 e 36 pós-natal, com um “n” entre 4 e 5 caixas/grupo.

5.5 ABERTURA VAGINAL – INSTALAÇÃO DA PUBERDADE

A identificação da instalação da puberdade em fêmeas foi determinada pela ocorrência da abertura vaginal (NAVARRO *et al.*, 2004; OJEDA *et al.*, 1976). Por esse método, a aparência externa da genitália é monitorada diariamente a partir do desmame e o surgimento do orifício que caracteriza a abertura vaginal é então considerado um indicador externo do início do processo puberal. Com o objetivo de identificar o aparecimento da abertura vaginal, as regiões genitais de cinco fêmeas foram analisadas e fotografadas a partir do desmame (Fig. 2).

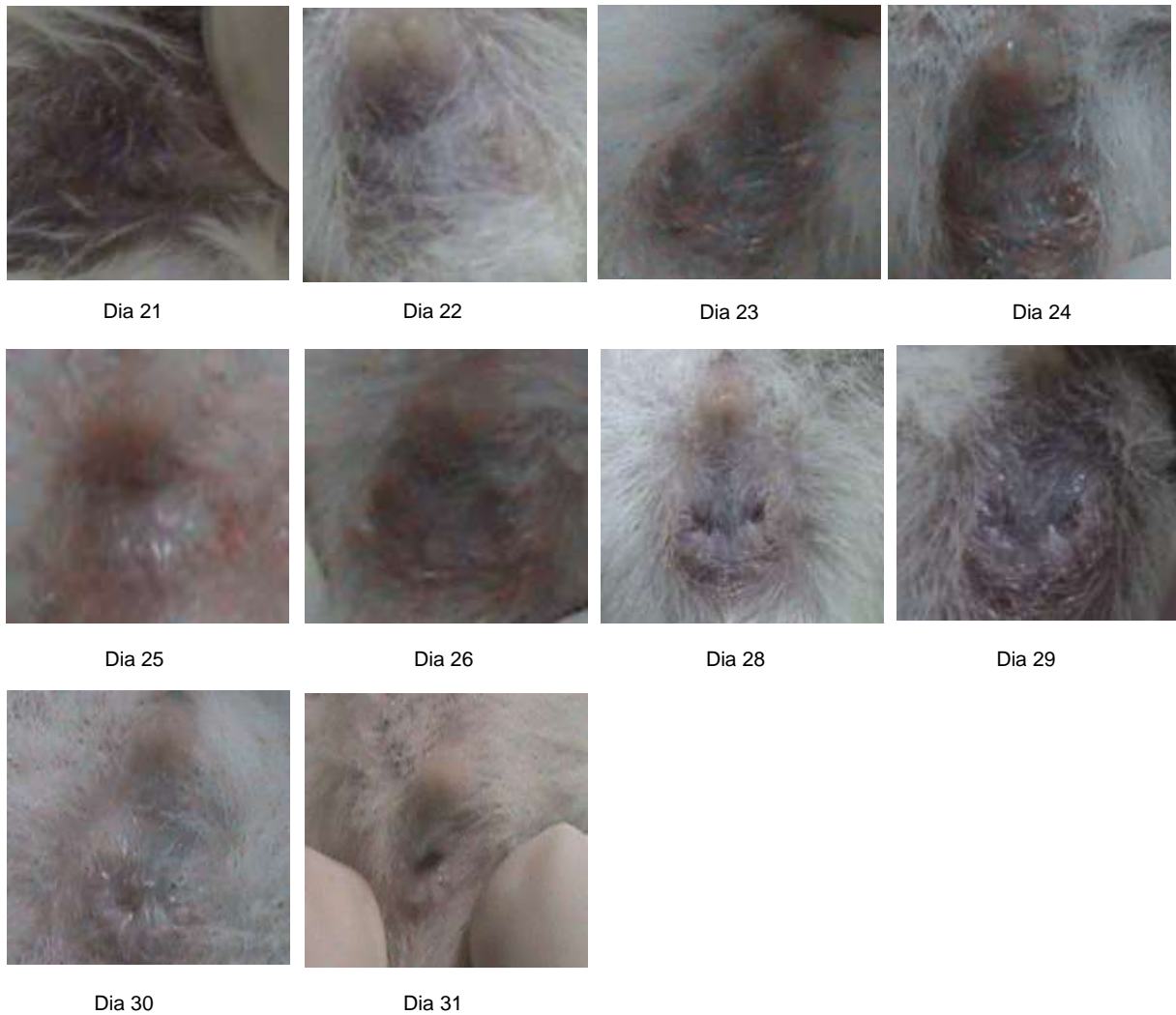


Fig.2. Imagens ilustrativas da região genital de uma fêmea de rata Wistar do desmame (dia 21) até a abertura vaginal (instalação da puberdade) no dia 31.

Visto que houve diferentes padrões de abertura vaginal, um grupo de trinta e nove fêmeas de rato Wistar foi acompanhado e fotografado para identificar as diferentes formas que seriam consideradas como suficientemente abertas para a classificação da instalação da puberdade (Fig. 3). Assim, as fotos na Fig. 3 foram utilizadas como padrões para a classificação de ocorrência de abertura vaginal das fêmeas utilizadas nos experimentos de instalação da puberdade. Nesses experimentos, as fêmeas foram monitoradas diariamente das 7 às 9h e das 15 às 17h.



Fig. 3. Imagens ilustrativas das diferentes apresentações do orifício vaginal de 18 fêmeas de rata Wistar no dia da abertura vaginal (instalação da puberdade).

5.6 DOSAGENS HORMONAIS – 17 β -ESTRADIOL, LH, IGF-1 E LEPTINA

As dosagens hormonais foram realizadas em soro pelo método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) a partir de *kits* comerciais prontos para o uso em amostras de rato. Para a dosagem sérica de 17 β -estradiol, utilizou-se um *kit* de ELISA ultrassensível (ALPCO, NH, EUA) com sensibilidade de detecção < 1,399 pg/mL. Para a dosagem sérica do hormônio luteinizante, utilizou-se um *kit* de ELISA (USCN Life Science Inc., Hubei, China) com sensibilidade de detecção de < 0,21 mUI/mL. Para a quantificação de fator de crescimento semelhante à insulina-1, utilizou-se um *kit* de ELISA (ALPCO, NH, EUA) com sensibilidade de detecção de 0,029 ng/mL. Para a dosagem de leptina, utilizou-se um *kit* de ELISA (Millipore, MO, EUA) com sensibilidade de detecção de 0,08 ng/mL. Em todas as amostras, as dosagens hormonais foram analisadas em duplicata e em um único ensaio.

5.7 PESO DO TECIDO ADIPOSEO INTRA-ABDOMINAL, OVÁRIOS, ÚTERO E ADRENAIS

Para a medida do peso bruto dos diferentes órgãos presentes na cavidade abdominal dos animais, realizou-se uma incisão longitudinal na linha média partindo da região pubiana até o diafragma. Inicialmente, dissecou-se o tecido adiposo presente ao redor do útero e ovários e, posteriormente, procedeu-se a dissecação do útero, a partir de uma incisão transversal na altura da porção final do ducto vaginal. Após, os ovários foram dissecados a partir do útero. Posteriormente, iniciou-se a dissecação do tecido adiposo retroperitoneal, perirrenal e mesentérico. Por último, dissecaram-se ambas as adrenais. A quantidade de tecido adiposo intra-abdominal foi considerada como sendo a soma do peso de cada tecido adiposo dissecado. Para o peso dos ovários e adrenais, consideraram-se a soma do peso de ambos os órgãos localizados à direita e à esquerda. Todos os dados foram expressos em gramas.

5.8 DISSECAÇÃO DA AMOSTRA DO ENCÉFALO CONTENDO A BANDA DIAGONAL DE BROCA E HIPOTÁLAMO

Inicialmente, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e imediatamente congelados pela imersão por 20-30 segundos em isopentano (Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil) resfriado por gelo seco. Posteriormente, os encéfalos foram embalados em Parafilm M[®] (Bemis Company, Inc., WI, EUA) e mantidos em -80° C. No dia da dissecação dos extratos contendo a Banda Diagonal de Broca, a Área Pré-óptica e o Núcleo Arqueado do hipotálamo, os encéfalos foram retirados do freezer -80° C e mantidos em gelo seco. Para o procedimento de dissecação, utilizou-se uma matriz de encéfalo de rato com divisões coronais de 1mm (RBM-4000C, ASI Instruments, Inc., MI, EUA), lâminas de corte, pinça curva, bisturi e placa de Petri resfriada em gelo. Todos os materiais utilizados foram previamente limpos com álcool 70% preparado em água livre de nucleases (Integrated DNA Technologies, Inc., IA, EUA), seguido por limpeza em solução para descontaminação de RNAses (RNaseZap[®] Solution, Applied Biosystems, Inc., EUA) e lavagem com água livre de nucleases. Entre a dissecação de cada amostra, seguiu-se a limpeza mencionada anteriormente com exceção do álcool 70%. Para a dissecação das amostras, realizaram-se dois cortes coronais (Fig. 4) utilizando a matriz para encéfalo de rato com intervalo de secção de 1 mm resfriada em gelo. Um corte foi realizado 1-2 mm anterior ao quiasma óptico (Fig. 4, linha 1) e outro corte foi realizado 1-2 mm posterior aos corpos mamilares (Fig. 4, linha 2) (BURCELIN *et al.*, 2003; QUENNELL *et al.*, 2011).

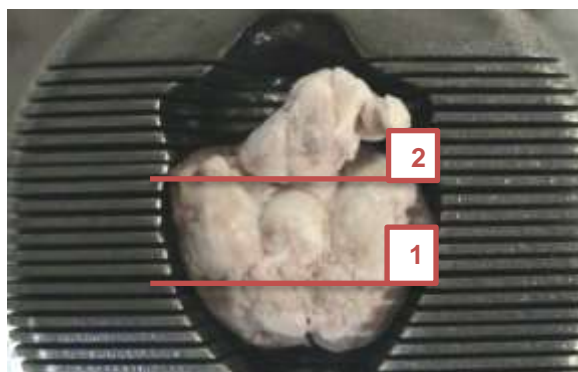


Fig. 4. Localização dos cortes coronais realizados em encéfalo de rato. Na linha (1) o corte foi realizado 1-2 mm anterior ao quiasma óptico. Na linha (2) o corte foi realizado 1-2 mm posterior aos corpos mamilares.

O corte coronal, com espessura de aproximadamente 6 mm e correspondendo as coordenadas entre +1,8 mm e - 4,90 mm relativas ao bregma (PAXINOS; WATSON, 2007), foi colocado sobre uma placa de petri resfriada em gelo (Fig. 5. A) para a realização de dois cortes sagitais bilaterais a 2 mm da linha média (Fig. 5. A, linhas 1 e 2) e um corte horizontal 2 mm a partir da superfície ventral (Fig. 5. A, linha 3). O material dissecado (Fig. 5. B) foi pesado e congelado em nitrogênio líquido para análises posteriores de expressão gênica. O peso (mg) da amostra dissecada foi similar entre os grupos (Controle: $65,81 \pm 3,25$, $n=16$; Cafeteria: $61,81 \pm 3,22$, $n=14$; teste t de Student, $P > 0,05$.)

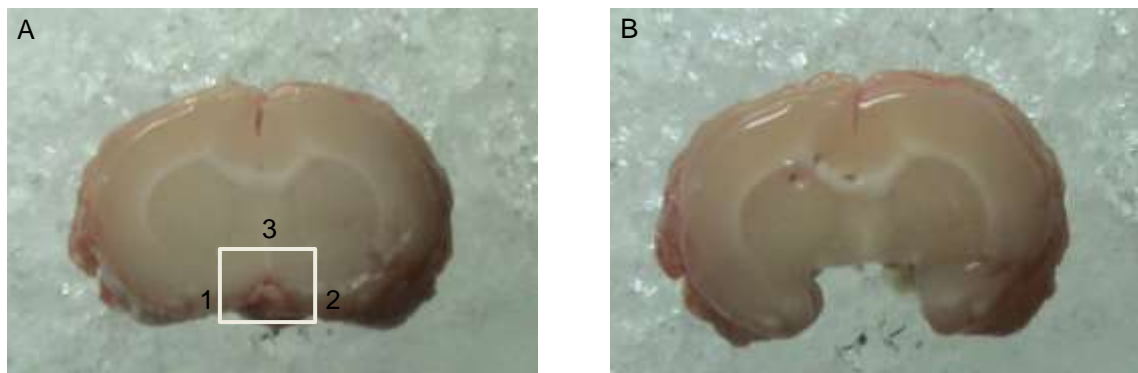


Fig. 5. Dissecção de amostra de encéfalo contendo a Banda Diagonal de Broca e hipotálamo. (A) Secção coronal e localização proposta para a dissecção (retângulo). (B) Corte coronal com a área dissecada (retângulo ausente).

5.9 EXPRESSÃO DOS GENES *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1*, *Lepr*

As análises de expressão dos genes *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1* e *Lepr* foram realizadas nas amostra contendo a Banda Diagonal de Broca e o hipotálamo. Inicialmente, procedeu-se à extração de RNA total, seguida pela síntese de DNA complementar (cDNA) e posterior análise da expressão dos genes pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).

5.9.1 Extração e Quantificação de RNA Total

Para a extração de RNA total das amostras, utilizou-se o método fenol-guanidina isotiocianato-clorofórmio. Primeiramente, adicionou-se 500 µL de reagente TRIzol[®] Reagent (Life Technologies, Corp., CA, EUA) às amostras para a homogeneização em homogeneizador mecânico (Omni International, GA, USA). Após a homogeneização inicial do tecido, adicionou-se 500 µL de TRIzol às amostras que foram então agitadas em vórtex por aproximadamente 15 segundos e permaneceram em temperatura ambiente por 5-10 minutos. Após, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merk KGaA, DA, DEU) em cada amostra e estas foram homogeneizadas em vórtex por aproximadamente 15 segundos, seguido de incubação em temperatura ambiente por 3-4 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x g em centrífuga refrigerada (Eppendorf, HH, DEU) a 4° C por 15 minutos para a separação das fases contendo proteínas, DNA e RNA total. A fase aquosa contendo RNA total (aproximadamente 550-600 µL) foi transferida para um novo microtubo e adicionou-se 1 mL de isopropanol 100% (Merk KGaA, DA, DEU). Após, cada amostra foi homogeneizada manualmente e conservada em -80° C por 2 horas. Após permanecer por 2 horas em -80°C, as amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos e então centrifugadas à velocidade de 12.000 x g por 15 minutos à temperatura de 4° C para permitir a precipitação do RNA, observado nas amostras como um precipitado branco. O sobrenadante foi desprezado com cuidado para não desprender o precipitado de RNA da parede do microtubo e adicionou-se 1 mL de Etanol 75% preparado em água livre de nucleases e realizou-se uma centrifugação em velocidade de 8.000 x g por 10 minutos entre 4° e 9° C. O sobrenadante foi desprezado com cuidado para não perder o precipitado de RNA. Nesse último passo, o excesso de etanol foi coletado com o uso de ponteira de 10 µL seguido por uma centrifugação em centrífuga (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, HH, DEU) acoplada a sistema à vácuo (VACUUBRAND GMBH + CO KG, NI, DEU) por 30 segundos. O excesso de etanol, quando observado, foi removido com o uso de ponteira de 10 µL e os microtubos contendo os precipitados de RNA foram mantidos abertos por 3-7 minutos para a secagem do etanol remanescente. As amostras foram então reconstituídas com 15-20 µL de água livre de nucleases e permaneceram em banho seco termobloco

(Nova Ética, SP, BRA) a 60° C por 15 minutos. Após, foram mantidas em gelo por 1-2 minutos e brevemente centrifugadas em microcentrífuga por 10 segundos e armazenadas em -80° C para a realização da quantificação do RNA no dia seguinte. Para a quantificação do RNA total nas amostras, utilizou-se o Quant-iT™ RNA Assay (Invitrogen, Corp., OR, USA). Esse kit contém reagentes com afinidade pelo RNA e que ao reagirem com este emitem fluorescência proporcional à concentração de RNA na faixa de concentração entre 5-100 ng. Inicialmente, as amostras foram diluídas na razão de 1:30 em água livre de nucleases e procedeu-se de acordo com o protocolo do fabricante. A fluorescência e a respectiva concentração de RNA total foram quantificadas no equipamento Qubit™ (Invitrogen, Corp., OR, USA). Após a quantificação, as amostras foram e armazenadas em -80° C.

5.9.2 Síntese de DNA Complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada por meio do *kit* SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR SuperScript II (Invitrogen, OR, USA) e de equipamento termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., MA, USA). Primeiramente, as amostras de RNA total foram retiradas do freezer -80° C e mantidas em gelo até estarem completamente descongeladas. Posteriormente, seguiram-se as etapas indicadas no protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA, utilizou-se 1 ng de RNA total de cada amostra e o *primer* oligo(DT) para a hibridização da cauda poli(A)⁺ do mRNA presente nas amostras. Ao final das reações para a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas em -20° C.

5.9.3 Análise de Expressão Gênica – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A análise da expressão dos genes *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1*, *Lerp* e *Actb* (gene da β-actina) foi realizada pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Inicialmente, localizou-se na literatura científica pares de *primers*

utilizados para o estudo da expressão do gene *Kiss1* (LIE et. al., 2013), *Kiss1r* (IWASA et. al., 2010), *Gnrh1* (IWASA et. al., 2010), *Lepr* (BIAN et. al., 2013) e *Actb* (IWASA et. al., 2010). Posteriormente, verificaram-se as sequências de nucleotídeos de cada par de *primers* na base de dados *online PRIMER - Basic Local Alignment Search Tool* (PRIMER-BLAST®; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome>) em relação à especificidade das sequências *forward* e *reverse* de cada *primer* para o respectivo gene, assim como em relação ao tamanho do produto esperado durante a reação de qPCR. Além disso, verificou-se na base de dados *online Ensembl* (<<http://www.ensembl.org/index.html>>) a localização dos pares de *primers* nos transcritos de cada gene, sendo escolhidas as sequências de *primers* localizadas em exons entre introns para permitir a diferenciação entre a amplificação de mRNA e a possível amplificação de DNA genômico. As informações referentes aos *primers* constam na Tabela 3.

Tabela 3. Dados dos *primers* utilizados nas análises de expressão gênica.

Número de acesso ^a	Gene	Sequência de nucleotídeos 5' → 3'	Produto esperado (pb) ^b
NM_181692.1	<i>Kiss1</i>	<i>Forward: AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT</i> <i>Reverse: GCATACCGCGGGCCCTTTT</i>	139
NM_023992.1	<i>Kiss1r</i>	<i>Forward: GCAGACCGTCACCAATTTCT</i> <i>Reverse: GGGAACACAGTCACGTACCA</i>	222
NM_012767.2	<i>Gnrh1</i>	<i>Forward: GCAGAACCCCAGAACTTCGA</i> <i>Reverse: TGCCCAGCTTCTTCAAT</i>	101
NM_012596.1	<i>Lepr</i>	<i>Forward: TGTTCTGGGCACAAGGACTTA</i> <i>Reverse: ACCATAGCTGCTGGTACCATCTCA</i>	179
NM_031144.3	<i>Actb</i>	<i>Forward: ACCTTCAACACCCAGCCATG</i> <i>Reverse: GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC</i>	309

^a Número de Acesso de acordo com a base de dados PRIMER-BLAST.

^b pb = pares de bases

Foram realizados experimentos prévios para a verificação de amplificação do DNA genômico, especificidade do produto amplificado pelos *primers* e condições de temperatura e tempo das reações de qPCR. Para isso, utilizaram-se inicialmente amostras piloto contendo a Banda Diagonal de Broca e hipotálamo de fêmeas de rata Wistar adulta (aproximadamente 120 dias) e na idade da instalação da puberdade que receberam tratamento controle ou experimental. Para a amplificação e detecção dos genes de interesse em qPCR, utilizou-se o *kit* Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, OR, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 4).

Tabela 4. Componentes utilizados na reação de qPCR.

Componente	Volume (µL)
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	6,25
<i>Primer Forward</i>	0,20
<i>Primer Reverse</i>	0,20
ROX <i>reference dye</i>	1,00
cDNA	1,00
Água livre de nucleases	3,85

Fonte: Invitrogen, OR, EUA.

Inicialmente, preparou-se uma solução de acordo com a tabela Tabela 4. contendo os *primers* específicos para cada gene e amostra de cDNA diluída na razão de 1:10 em água livre de nucleases. Após, a solução (11,5 µL) contendo o par de *primers* específico e a amostra de cDNA (1,00 µL) foram pipetadas em placa de 96 poços (Applied Biosystems®, EUA) e coberta com filme adesivo (Applied Biosystems®, EUA). Após, a placa foi centrifugada na velocidade de 606 x g por 1 minuto. Para a reação de qPCR, utilizou-se o sistema operacional e termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems®, EUA) programado para uma etapa de incubação da placa a 50° C por 2 minutos, seguida por desnaturação a 95° C por 10 minutos e 45 ciclos de 95° C por 15 segundos (desnaturação) e 60° C por 60 segundos (anelamento e extensão). Ao final, o sistema realizou a análise da especificidade do produto amplificado pela curva de *Melt*. A especificidade do

produto amplificado, o tamanho do produto esperado para cada par de *primer* de acordo com as análises estimadas pelo PRIMER-BLAST e as condições de ciclo foram confirmadas pela curva de *Melt* e pela análise do produto amplificado por meio de gel de Agarose 1,5% (Laboratorios Conda, Madri, Espanha), respectivamente para os genes *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1*, *Lepr* e *Actb*. (Fig. 6). Para o cálculo da expressão de cada gene, utilizou-se uma curva padrão a partir do *pool* de cDNA das amostras Controle diluída na razão de 1:5. O nível de expressão foi obtido pela interpolação na curva padrão do valor do *Cycle threshold* (*Ct*) de cada gene durante a amplificação por qPCR. Os valores obtidos para cada gene foram normalizados pelos valores de expressão do gene *Actb*, utilizado como gene de referência. Assim, os valores de expressão foram expressos como unidades relativas.

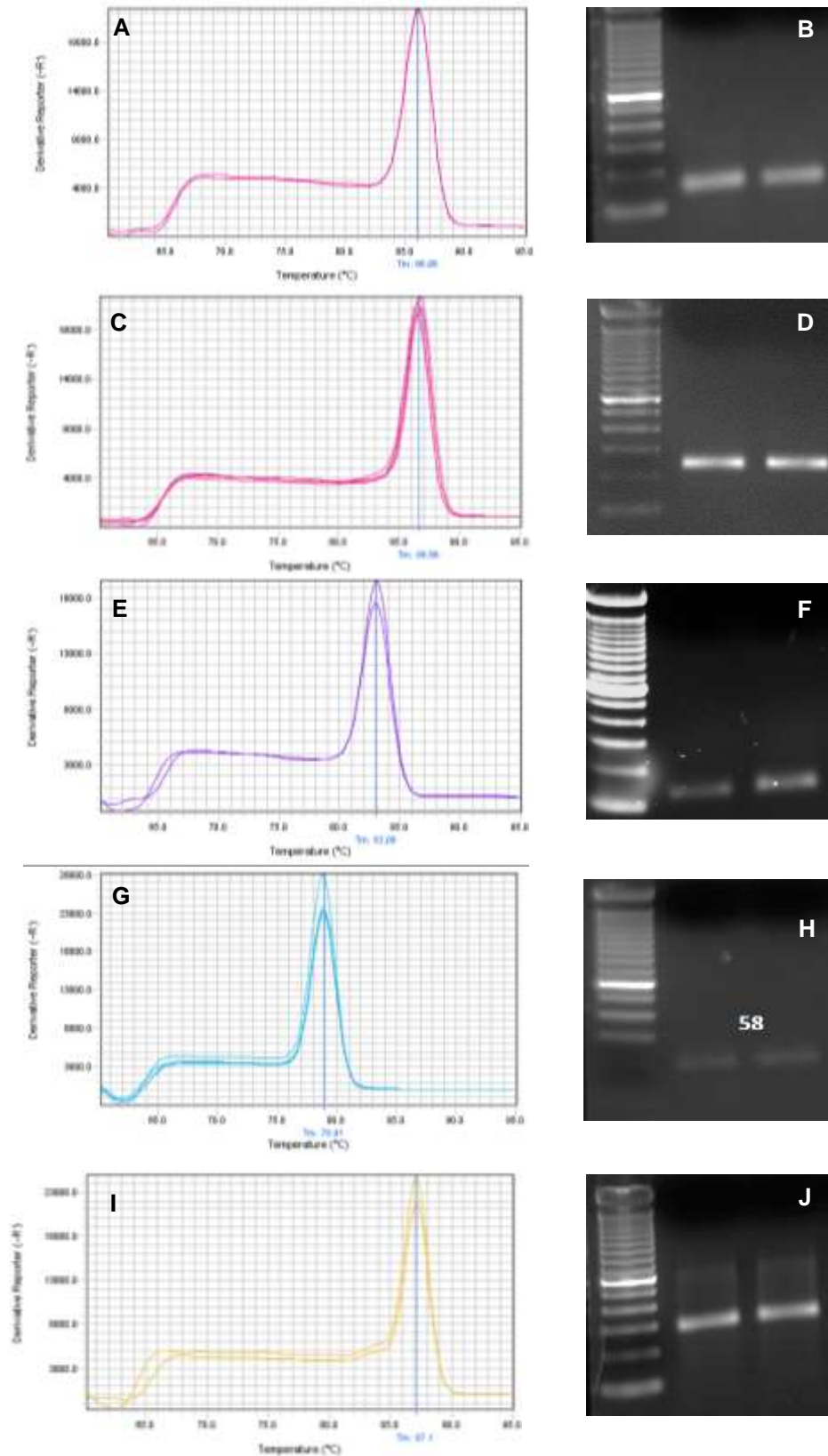


Fig. 6. Curva de *Melt* e gel de agarose dos produtos amplificados por qPCR. A, C, E, G e I são as curvas de *Melt* dos produtos amplificados e B, D, F, H e J fotos de géis de agarose com as bandas verticais à esquerda representando o marcador em escala de 100 pares de base (pb) e à direita as amostras em duplicata. A e B = Kiss1 (139 pb); C e D= Kiss1r (222 pb); E e F= Gnrh1(101 pb); G e H= Lepr (179 pb); I e J= Actb (309 pb).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inicialmente analisados em relação à distribuição normal e homogeneidade da variância. Os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade da variância foram submetidos às análises inferenciais por meio dos testes paramétricos teste T de Student, teste T de Welch e ANOVA Fatorial de Medidas Repetidas, enquanto os dados que não cumpriram os requisitos de normalidade e homogeneidade da variância foram analisados por testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Mantel-Cox. As análises inferenciais em relação ao peso corporal, ganho de peso corporal, peso do útero, peso das adrenais, peso do tecido adiposo intra-abdominal, concentração sérica de leptina e E2 foram analisadas pelo teste t de Student e os valores representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M), enquanto que as análises inferenciais da concentração de LH e do peso dos ovários foram analisados pelo teste t de Welch e os resultados também representados como média \pm E.P.M. Os dados de ingestão de ração padrão, ingestão de energia, ingestão de carboidratos, ingestão de proteína e ingestão de lipídeo foram analisados pela ANOVA Fatorial de Medida Repetidas e os resultados representados como média \pm E.P.M. As análises inferenciais da concentração sérica de IGF-1, a relação da expressão gênica *Kiss1/Actb* mRNA, *Kiss1r/Actb* mRNA, *Gnrh1/Actb* mRNA e *Lep1/Actb* mRNA foram realizadas pelo teste de Man-Whitney e representados como mediana e intervalos quartílicos 25 e 75. Para os dados de abertura vaginal, utilizou-se o teste de Mantel-Cox para a análise inferencial. Os dados de abertura vaginal foram apresentados graficamente em curvas de sobrevida de Kaplan-Meier como o percentual de animais com abertura vaginal para determinada idade pós-natal. Para as análises de correlação utilizou-se o teste de correlação de Spearman, com os resultados sendo apresentados como coeficiente de correlação de Spearman (r_s) ou teste de correlação de Pearson, sendo os resultados apresentados como o coeficiente de correlação de Pearson (r). Em todos os casos, consideraram-se diferenças significativas quando $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 INGESTÃO ALIMENTAR NO PERÍODO JUVENIL E PERIPUBERAL

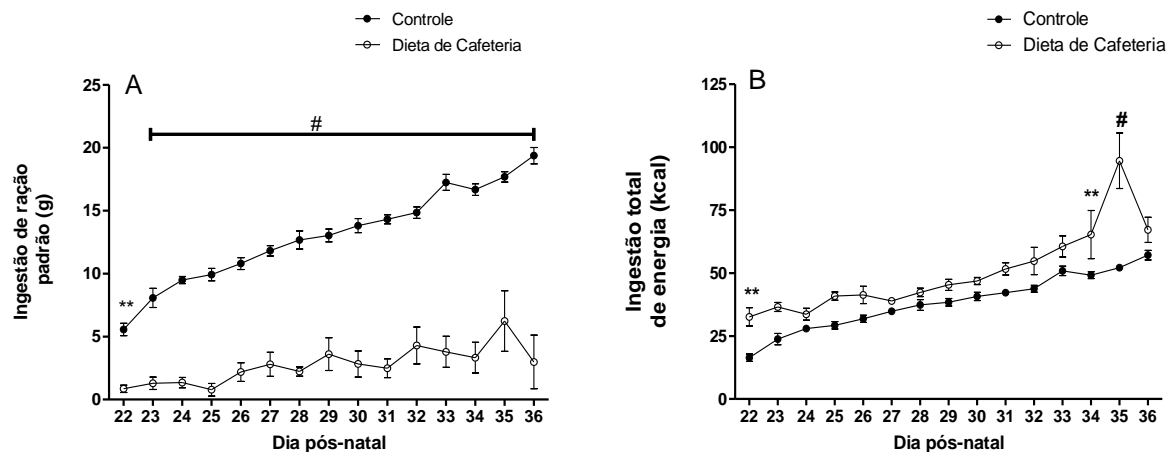
A ingestão de ração padrão sofreu efeito significativo da interação entre o tempo de tratamento e o tratamento, $F(14,98) = 9,46$ (Fig. 7. A, $P < 0,0001$). A mesma análise demonstrou haver um efeito significativo do tempo do tratamento sobre a ingestão de ração padrão, $F(14, 98) = 23,91$ (Fig. 7. A, $P < 0,0001$), e um efeito significativo do tratamento sobre a ingestão de ração padrão, $F(1,98) = 167,90$ (Fig. 7. A, $P < 0,0001$). A análise de pós-teste utilizando o método de Bonferroni demonstrou que o grupo Dieta de Cafeteria ingeriu uma quantidade significativamente menor de ração padrão durante o período juvenil e peripuberal em relação ao grupo Controle (Fig. 7. A, $P < 0,01$ no dia 22 e $P < 0,001$ nos demais dias pós-natal).

A ingestão de energia sofreu um efeito significativo da interação entre o tempo de tratamento e o tratamento, $F(14,98) = 4,54$ (Fig. 7. B, $P < 0,0001$). A mesma análise demonstrou haver um efeito significativo do tempo do tratamento, $F(14, 98) = 37,83$ (Fig. 7. B, $P < 0,0001$), e do tratamento sobre a ingestão de energia $F(1,98) = 48,02$ (Fig. 7. B, $P < 0,0001$). A análise de pós-teste utilizando o método de Bonferroni demonstrou que a ingestão total de energia do grupo Dieta de Cafeteria foi significativamente maior em relação ao grupo Controle nos dias 22 (Fig. 7. B, $P < 0,01$), 34 (Fig. 7. B, $P < 0,01$) e 35 pós-natal (Fig. 7. B, $P < 0,001$).

A ingestão de carboidratos sofreu significativo da interação entre o tempo de tratamento e o tratamento, $F(14,98) = 4,29$ (Fig. 7. C, $P < 0,0001$). A mesma análise demonstrou haver efeito significativo do tempo do tratamento, $F(14, 98) = 30,71$ (Fig. 7. C, $P < 0,0001$), e do tratamento sobre a ingestão de carboidratos, $F(1,98) = 37,62$ (Fig. 7. C, $P = 0,0005$). A análise de pós-teste utilizando o método de Bonferroni demonstrou que a ingestão de carboidratos do grupo Dieta de Cafeteria foi significativamente menor em relação ao grupo Controle nos dias 28, 31, 32, 34 e 36 pós-natal (Fig. 7. C, $P < 0,05$ no dia 32 e $P < 0,001$ nos demais dias).

A ingestão de proteína sofreu efeito significativo da interação entre o tempo de tratamento e o tratamento, $F(14,98) = 5,61$ (Fig. 7. D, $P < 0,0001$). A mesma análise demonstrou haver um efeito significativo do tempo do tratamento $F(14, 98) = 51,70$ (Fig. 7. D, $P < 0,0001$) e do tratamento sobre a ingestão de proteína $F(1,98) = 39,74$ (Fig. 7. D, $P = 0,0004$). A análise de pós-teste utilizando o método de Bonferroni demonstrou que a ingestão de proteína do grupo dieta de Cafeteria foi significativamente menor em relação ao grupo Controle nos dias 24, 27, 29, 30, 33 e 34 pós-natal (Fig. 7. D, $P < 0,001$ nos dias 24 e 30 pós-natal, $P < 0,01$ no dia 27 pós-natal e $P < 0,05$ nos demais dias).

A ingestão de lipídeo sofreu efeito significativo da interação entre o tempo de tratamento e o tratamento, $F(14,98) = 7,39$ (Fig. 7. E, $P < 0,0001$). A mesma análise demonstrou haver um efeito significativo do tempo do tratamento, $F(14, 98) = 12,64$ (Fig. 7. E, $P < 0,0001$), e do tratamento sobre a ingestão de lipídeo, $F(1,98) = 104,50$ (Fig. 7. E, $P < 0,0001$). A análise de pós-teste utilizando o método de Bonferroni demonstrou que a ingestão de lipídeo do grupo Dieta de Cafeteria foi significativamente maior em relação ao grupo Controle ao longo do tratamento, exceto nos dias 24 e 27 pós-natal (Fig. 7. E, $P < 0,01$ nos dias 22 e 30 pós-natal, $P < 0,001$ nos dias 23, 25, 26, 28, 29 e 31-36 pós-natal).



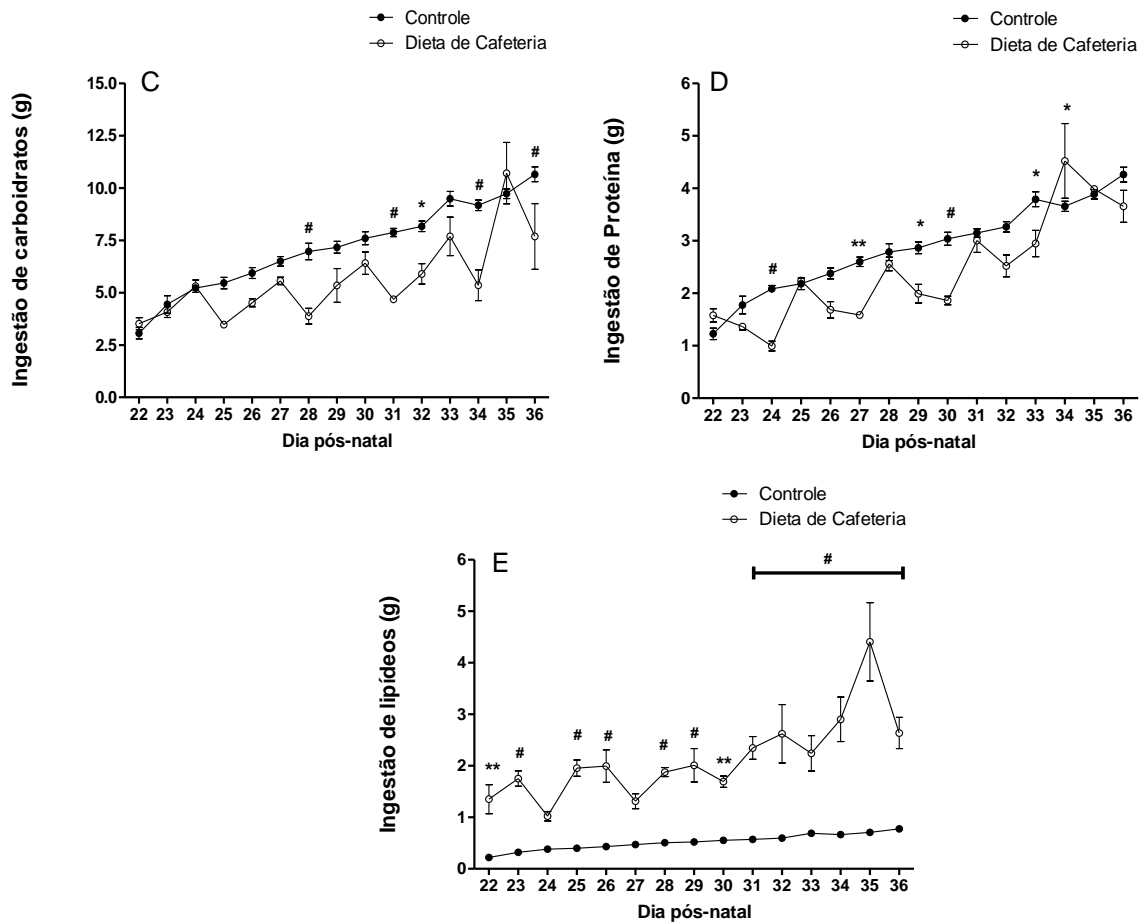


Fig. 7. Ingestão alimentar no período juvenil e puberal. (A) Evolução da ingestão de ração padrão do desmame (21 dias) a instalação da puberdade. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle $n=5$ caixas e Dieta de Cafeteria $n=4$ caixas. ANOVA fatorial de medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$. (B) Evolução da ingestão total de energia do desmame (dia 21 pós-natal) a instalação da puberdade. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle $n=5$ caixas e Dieta de Cafeteria $n=4$ caixas. ANOVA fatorial de medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$. (C) Evolução da ingestão de carboidratos do desmame (dia 21 pós-natal) à instalação da puberdade. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle $n=5$ caixas e Dieta de Cafeteria $n=4$ caixas. ANOVA fatorial de medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; # $P < 0,001$. (D) Evolução da ingestão de proteína do desmame (dia 21 pós-natal) à instalação da puberdade. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle $n=5$ caixas e Dieta de Cafeteria $n=4$ caixas. ANOVA fatorial de medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$. (E) Evolução da ingestão de lipídeos do desmame (dia 21 pós-natal) à instalação da puberdade. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle $n=5$ caixas e Dieta de Cafeteria $n=4$ caixas. ANOVA fatorial de medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. ** $P < 0,01$; # $P < 0,001$.

6.2 IDADE DA ABERTURA VAGINAL, PESO DO ÚTERO E OVÁRIOS E CONCENTRAÇÃO DE LH E E2

Para a determinação da instalação da puberdade, o presente estudo utilizou o critério da abertura vaginal. A análise das curvas de sobrevida para o evento idade da abertura vaginal revelou que o grupo Dieta de Cafeteria apresentou a ocorrência da abertura vaginal com idade menor comparada com o grupo Controle (Fig. 8, $P < 0,01$).

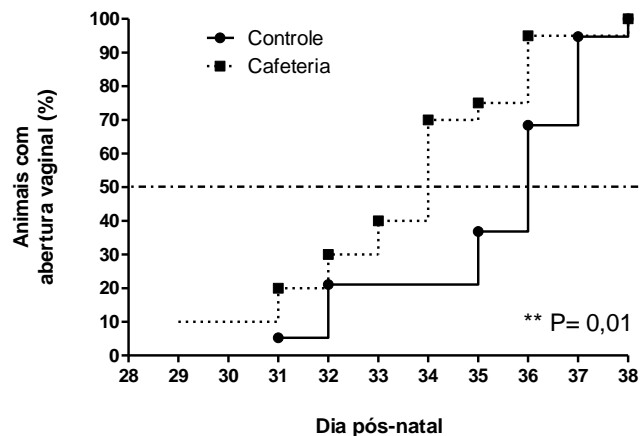


Fig. 8. Curvas de Kaplan-Meier da proporção de animais com abertura vaginal. A linha horizontal pontilhada representa o ponto em que 50% dos animais apresentaram abertura vaginal. Controle $n=19$ e Dieta de Cafeteria $n=20$. Teste de Mantel-Cox. ** $P = 0,01$.

No dia da abertura vaginal, o peso do útero e o peso dos ovários foram semelhantes entre os grupos (Fig. 9. A, $P = 0,94$ e B, $P = 0,08$, respectivamente). A análise do peso do útero/peso corporal não demonstrou diferença entre os grupos (Fig. 9. C, $P = 0,65$). Contudo, quando normalizado pelo peso corporal, o peso do ovário no dia da abertura vaginal foi significativamente maior no grupo Cafeteria comparado ao grupo Controle (Fig. 9. D, $P = 0,03$).

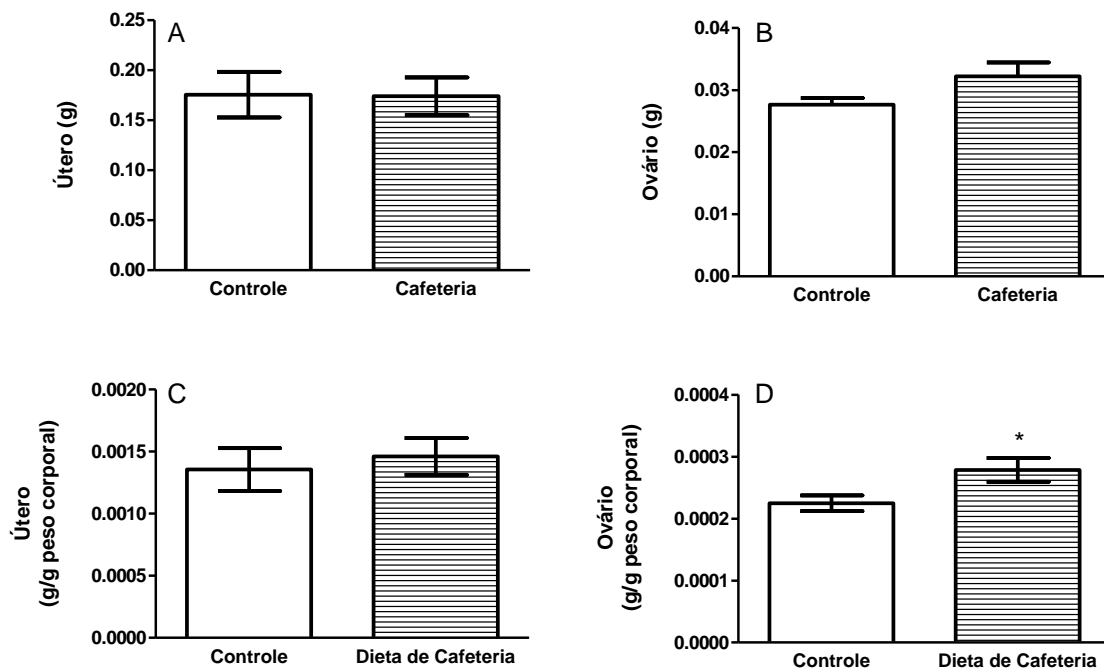


Fig. 9. Peso de órgãos do sistema reprodutor no dia da abertura vaginal. (A) Peso do útero no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 18 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t Student. (B) Peso do ovário no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 17 e Dieta de Cafeteria n=18. Teste t de Welch. (C) Peso do útero/peso corporal no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n=18 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t Student. (D) Peso do ovário/corporal no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n=19 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t Student. *P= 0,03

A concentração sérica de LH quantificada na tarde do dia da abertura vaginal foi semelhante entre o grupo Controle e o Grupo Dieta de Cafeteria (Fig. 10. A, P= 0,52). A concentração sérica de E2 também foi semelhante entre os grupos na tarde do dia da abertura vaginal (Fig. 10. B, P= 0,11).

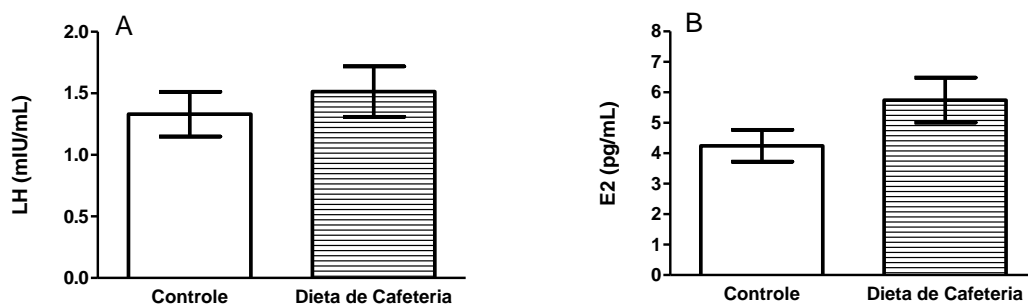


Fig. 10. Concentração sérica de hormônios do eixo HHG no dia da abertura vaginal. (A) Concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 15 e Dieta de Cafeteria n=19. Teste t de Student. (B) Concentração sérica de E₂ no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 17 e Dieta de Cafeteria n=18. Teste t de Student.

Embora as concentrações de LH e de E2 não tenham sofrido modificações frente ao tratamento utilizado, optou-se por analisar a existência de correlação entre ambos os hormônios. Quando separadas por grupo, as análises de correlação não identificaram correlação significativa entre a concentração sérica de LH e a concentração sérica de E2 no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r = -.05$, $P = 0,88$ (Fig. 11. A) e no grupo Dieta de Cafeteria $r = -.11$, $P = 0,67$ (Fig. 11. B). A análise dos dados agrupados não identificou correlação entre a concentração sérica de LH e a concentração sérica de E2 no dia da abertura vaginal, $r = -.03$, $P = 0,87$ (Fig. 11. C).

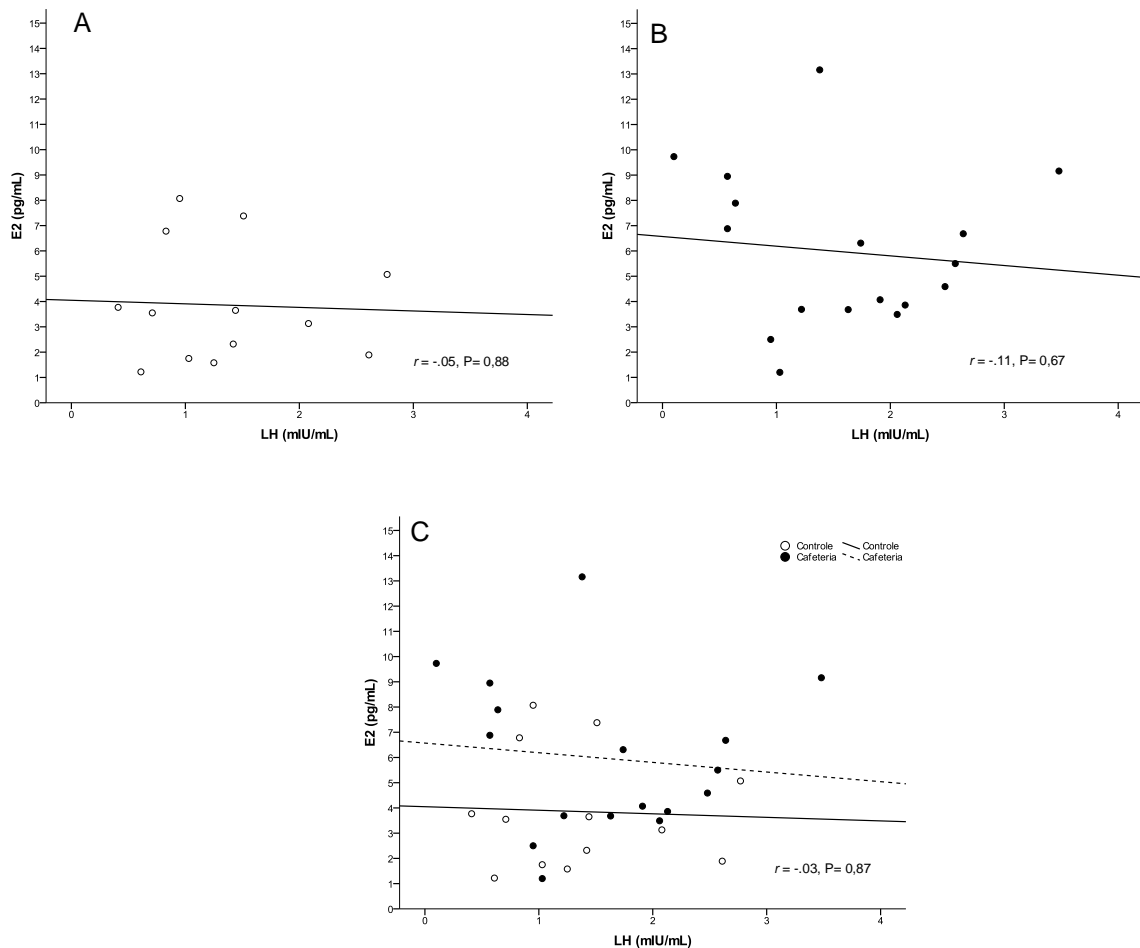
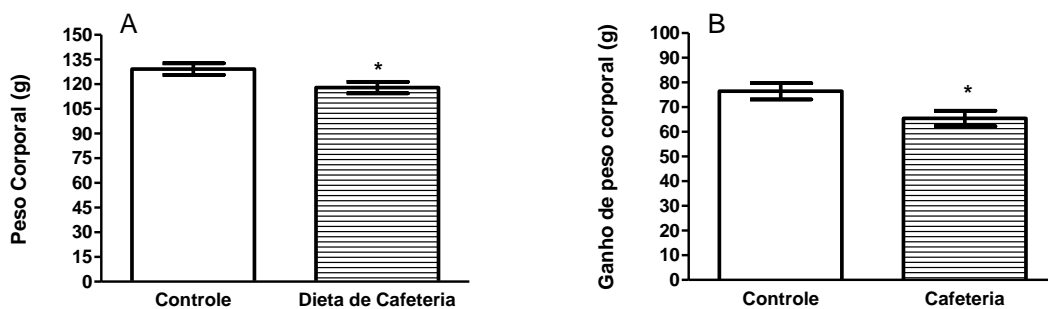


Fig. 11. Correlação entre LH e E2 no dia da abertura vaginal. (A) Correlação entre a concentração sérica de LH e a concentração sérica de E2 no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 13). (B) Correlação entre a concentração sérica de LH e a concentração sérica de E2 no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=17). (C) Correlação entre a concentração sérica de LH e a concentração sérica de E2 no dia da abertura vagina (n=30). Teste de correlação de Pearson (r).

6.3 PESO CORPORAL, TECIDO ADIPOSEO INTRA-ABDOMINAL E PESO DAS ADRENAIS NO DIA DA ABERTURA VAGINAL

No dia da abertura vaginal, o peso corporal do grupo Dieta de Cafeteria foi significativamente menor em relação ao grupo Controle (Fig. 12. A, $P= 0,03$). Da mesma maneira, o ganho de peso total do desmame ao dia da abertura vaginal foi significativamente menor no grupo Dieta de Cafeteria em relação ao grupo Controle (Fig. 12. B, $P= 0,02$). Contudo, devido ao fato do grupo Dieta de Cafeteria apresentar a instalação da puberdade em idade menor que o grupo Controle (Fig. 8.), realizou-se análise de ganho de peso do desmame até os dias 33 e 35 pós-natal. Do desmame até o dia 33 pós-natal e do desmame até o dia 35 pós-natal, o ganho de peso foi semelhante entre os grupos (Fig. 12. C, $P= 0,28$ e D, $P= 0,10$, respectivamente). Embora o menor peso corporal no dia da abertura vaginal, o peso do tecido adiposo intra-abdominal foi significativamente maior no grupo Dieta de Cafeteria em relação ao grupo Controle (Fig. 12. E, $P= 0,001$). Visto que houve diferença significativa em relação ao peso corporal do animais no dia da abertura vaginal, optou-se por analisar o peso do tecido adiposo intra-abdominal considerando o peso corporal. Como esperado, o peso do tecido adiposo intra-abdominal/peso corporal no dia da abertura vaginal foi significativamente maior no grupo Cafeteria em relação ao grupo Controle (Fig. 12. F, $P < 0,0001$). No dia da abertura vaginal o peso das adrenais foi significativamente menor no grupo Cafeteria comparado ao grupo Controle (Fig. 12. G, $P= 0,003$). Porém, quando o peso das adrenais foi normalizado pelo peso corporal no dia da abertura vaginal, essa diferença não foi significativa (Fig. 12. H, $P= 0,06$).



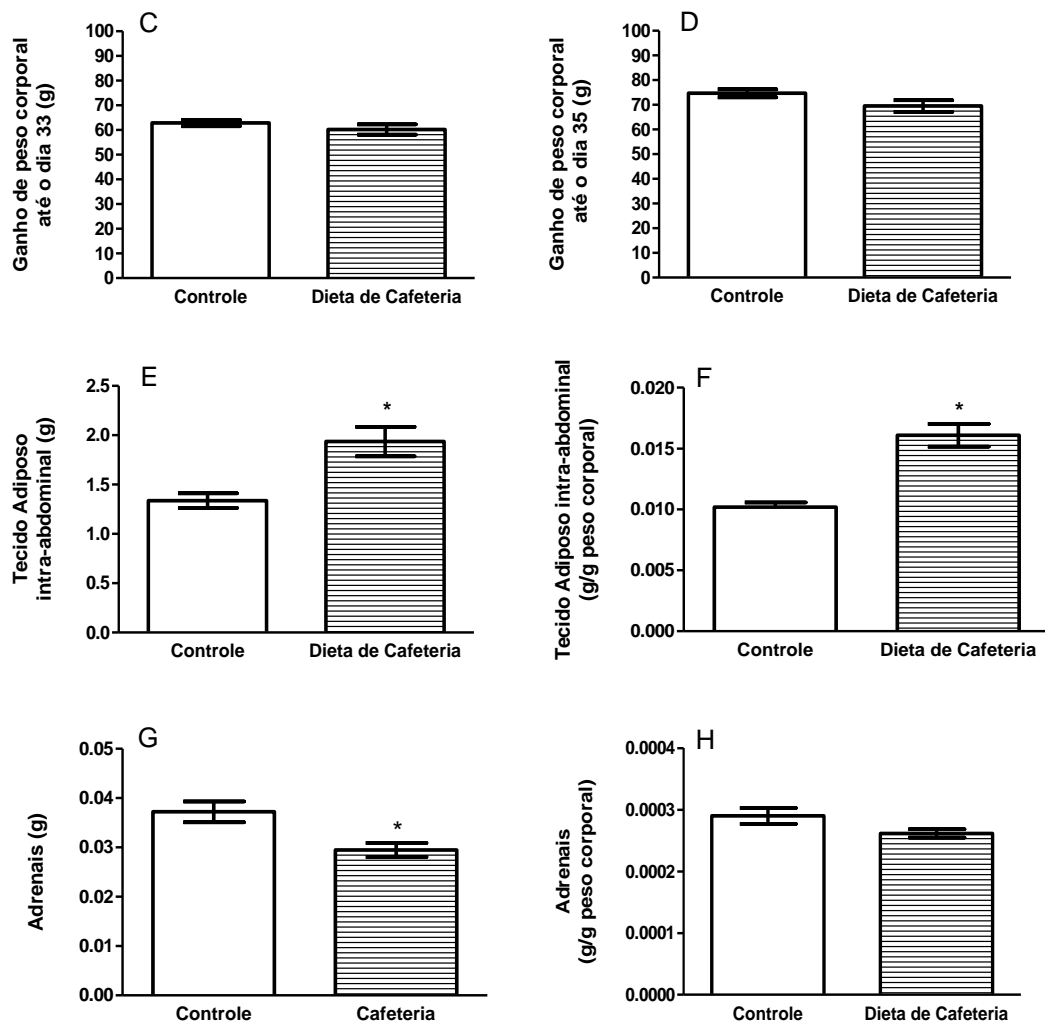


Fig. 12. Peso corporal, ganho de peso e peso do tecido adiposo intra-abdominal e adrenais no dia da abertura vaginal. (A) Peso corporal no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 19 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t Student. *P= 0,03. (B) Ganho de peso corporal do desmame (dia 21 pós-natal) até o dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 19 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t Student. *P= 0,02. (C) Ganho de peso corporal do desmame (dia 21 pós-natal) até o dia 33 pós-natal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 15 e Dieta de Cafeteria n=14. Teste t de Student. P= 0,28. (D) Ganho de peso corporal do desmame (dia 21 pós-natal) até o dia 35 pós-natal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 15 e Dieta de Cafeteria n= 6. Teste t de Student. P= 0,10. (E) Peso do tecido adiposo intra-abdominal no dia da abertura vaginal. O tecido adiposo intra-abdominal compreende tecidos adiposos localizados nas seguintes regiões intra-abdominais: mesentérica, perigonadal, perirrenal e retroperitoneal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 18 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t de Welch. *P= 0,001. (F) Peso do tecido adiposo intra-abdominal/peso corporal no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n=18 e Dieta de Cafeteria n=20. Teste t de Welch. *P< 0,0001. (G) Peso das adrenais no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 18 e Dieta de Cafeteria n=19. Teste t Student. *P= 0,003. (H) Peso das adrenais em relação ao corporal no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n= 18 e Dieta de Cafeteria n=19. Teste t de Welch. P= 0,06.

6.4 CORRELAÇÃO ENTRE O PESO CORPORAL E A ABERTURA VAGINAL

A análise de dados por grupos revelou correlação significativa entre o peso corporal e a idade da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .82$, $P < 0,001$ (Fig. 13. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .67$, $P = 0,01$ (Fig. 13. B). Com os dados agrupados, a análise também revelou correlação significativa entre o peso corporal e o dia da abertura vaginal, $r_s = .79$, $P < 0,001$ (Fig. 13. C).

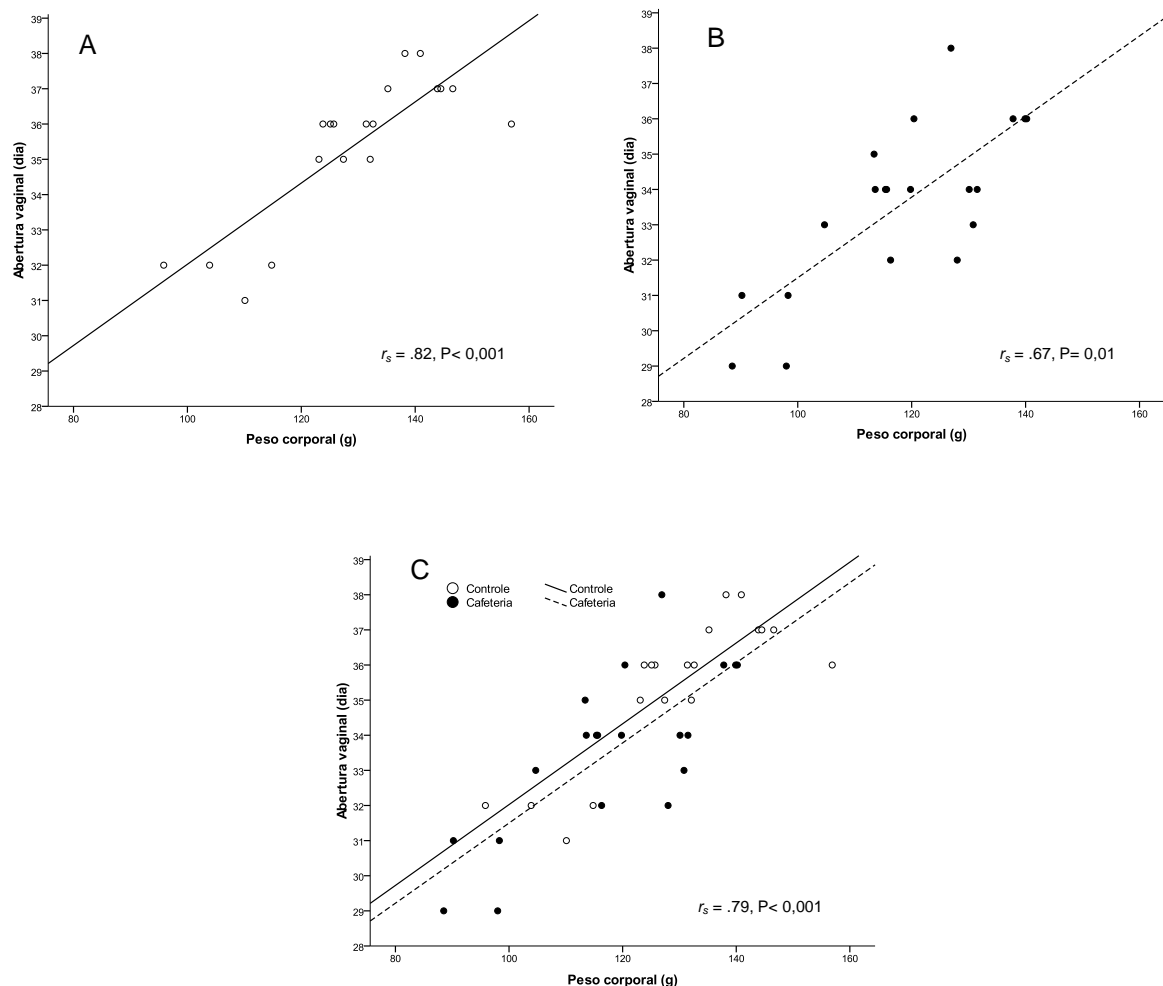


Fig. 13. Correlação entre o peso corporal no dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal. (A) Correlação entre o peso corporal no dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal no grupo Controle ($n = 19$). (B) Correlação entre o peso corporal no dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria ($n = 20$). (C) Correlação entre o peso corporal no dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal. Teste de correlação de Spearman (r_s).

A análise por grupo demonstrou correlação significativa entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .84$, $P < 0,001$ (Fig. 14. A). Da mesma forma, houve correlação significativa entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .82$, $P < 0,001$ (Fig. 14. B). A análise com os dados agrupados também resultou correlação significativa entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal, $r_s = .90$, $P < 0,001$ (Fig. 14. C).

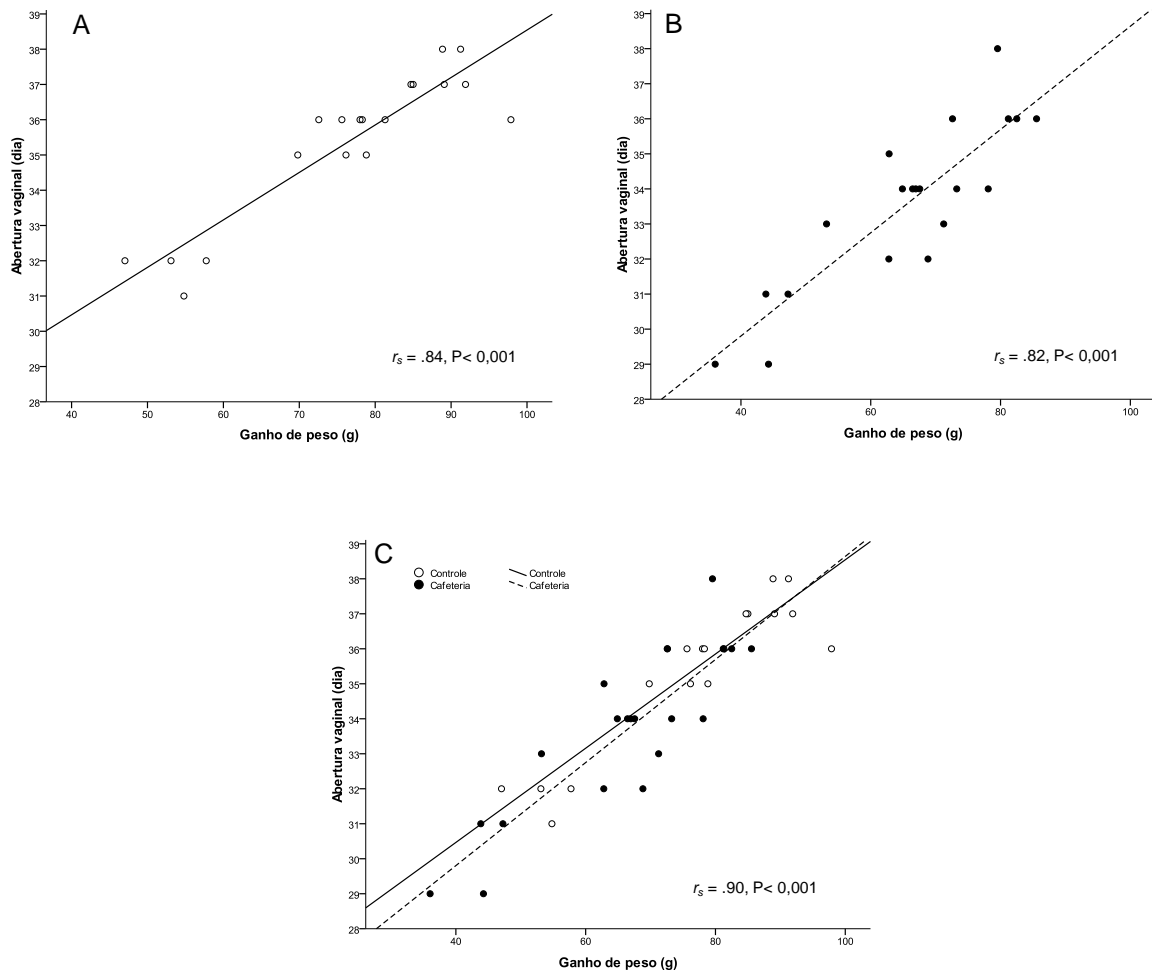


Fig. 14. Correlação entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal. (A) Correlação entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal no grupo Controle ($n = 19$). (B) Correlação entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria ($n = 20$). (C) Correlação entre o ganho de peso corporal até o dia da abertura vaginal e o dia da abertura vaginal ($n = 39$). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.5 CORRELAÇÃO ENTRE O PESO DO TECIDO ADIPOSEO INTRA-ABDOMINAL E A ABERTURA VAGINAL

A análise de dados por grupo identificou correlação significativa entre o tecido adiposo intra-abdominal e o dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .61$, $P = 0,007$ (Fig. 15. A). Da mesma forma, houve correlação significativa entre o tecido adiposo intra-abdominal e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .86$, $P < 0,001$ (Fig. 15. B). A análise com dados agrupados revelou correlação significativa entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a idade da abertura vaginal, $r_s = .37$, $P < 0,02$ (Fig. 15. C). Não houve diferença entre a correlação do grupo Controle e a correlação do grupo Dieta de Cafeteria, $\text{escore-z} = -1,64$, $P > 0,05$.

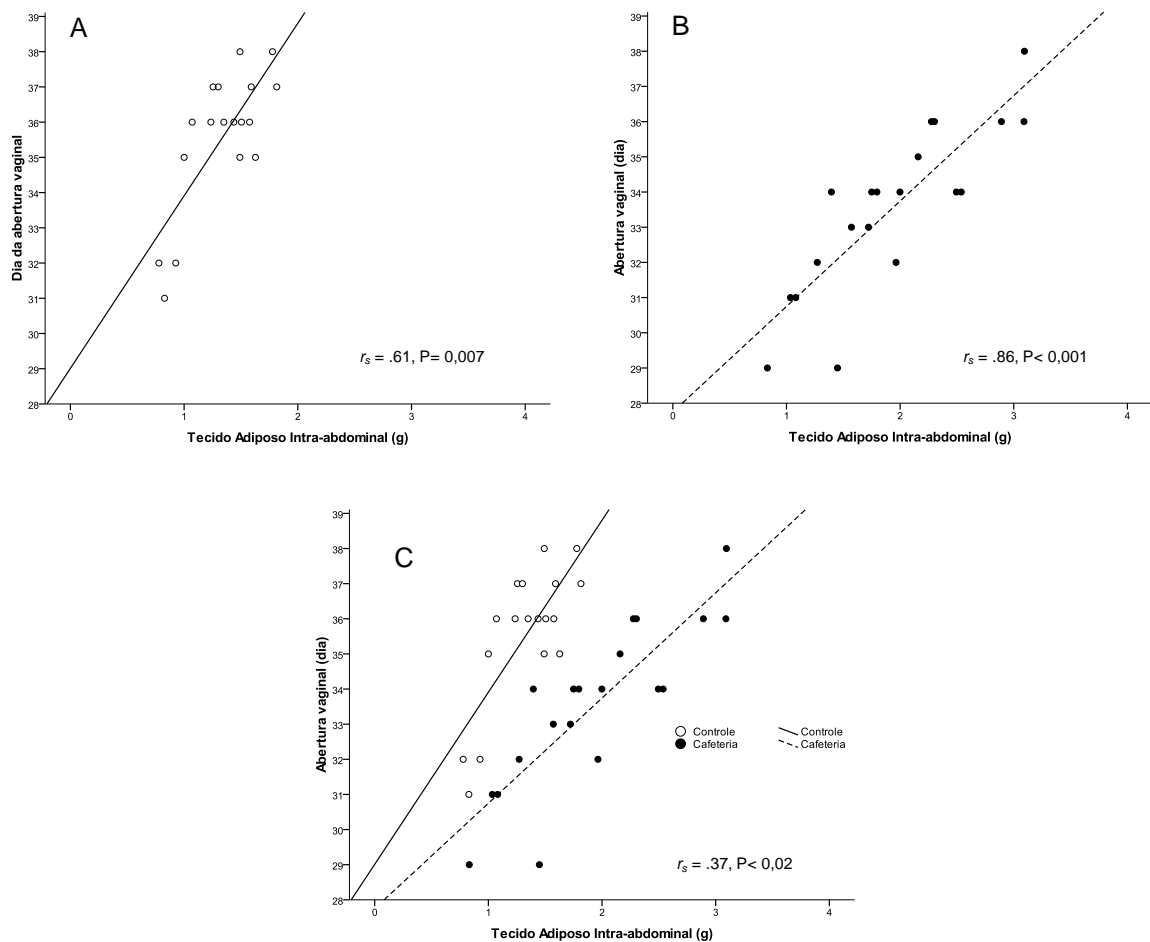


Fig. 15. (A) Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e o dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 18). (B) Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=20). (C) Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e o dia da abertura vaginal (n=38). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.6 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-1 (IGF-1) E LEPTINA NO DIA DA ABERTURA VAGINAL

A concentração sérica de IGF-1 no dia da abertura vaginal foi semelhante entre os grupos (Fig. 16. A, $P= 0,07$). No dia da abertura vaginal a concentração sérica de leptina foi significativamente maior no grupo Dieta de Cafeteria em relação ao grupo Controle (Fig. 16. B, $P= 0,04$).

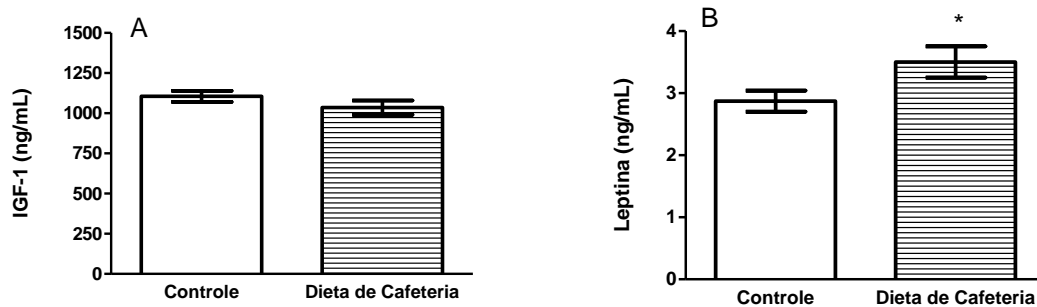


Fig. 16. Concentração de hormônios IGF-1 e leptina no dia da abertura vaginal. (A) Concentração sérica de IGF-1 no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Optou-se pela representação gráfica em média e erro padrão da média ao invés de mediana e intervalos quartílicos (IQ) 25 e 75. Grupo Controle: mediana= 1132 ng/mL, IQ25= 1011 ng/mL, IQ75=1212 ng/mL; Grupo Dieta de Cafeteria: mediana= 1008 ng/mL, IQ25= 928,90 ng/mL, IQ75= 1124 ng/mL. Controle n= 17 e Dieta de Cafeteria n=19. Teste de Mann-Whitney. $P= 0,07$. (B) Concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal. Os valores são média e as barras verticais são erro padrão da média. Controle n=18 e Dieta de Cafeteria n=19. Teste t Student. * $P= 0,04$.

6.7 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LEPTINA E O DIA DA ABERTURA VAGINAL

As análises dos dados de concentração de leptina e o dia da abertura vaginal identificaram ausência de correlação entre a concentração sérica de leptina e o dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .04$, $P= 0,86$ (Fig. 17. A). Contudo, houve correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .51$, $P= 0,02$ (Fig. 17. B). A análise dos dados agrupados não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e o dia da abertura vaginal, $r_s = .17$, $P= 0,31$ (Fig. 17. C).

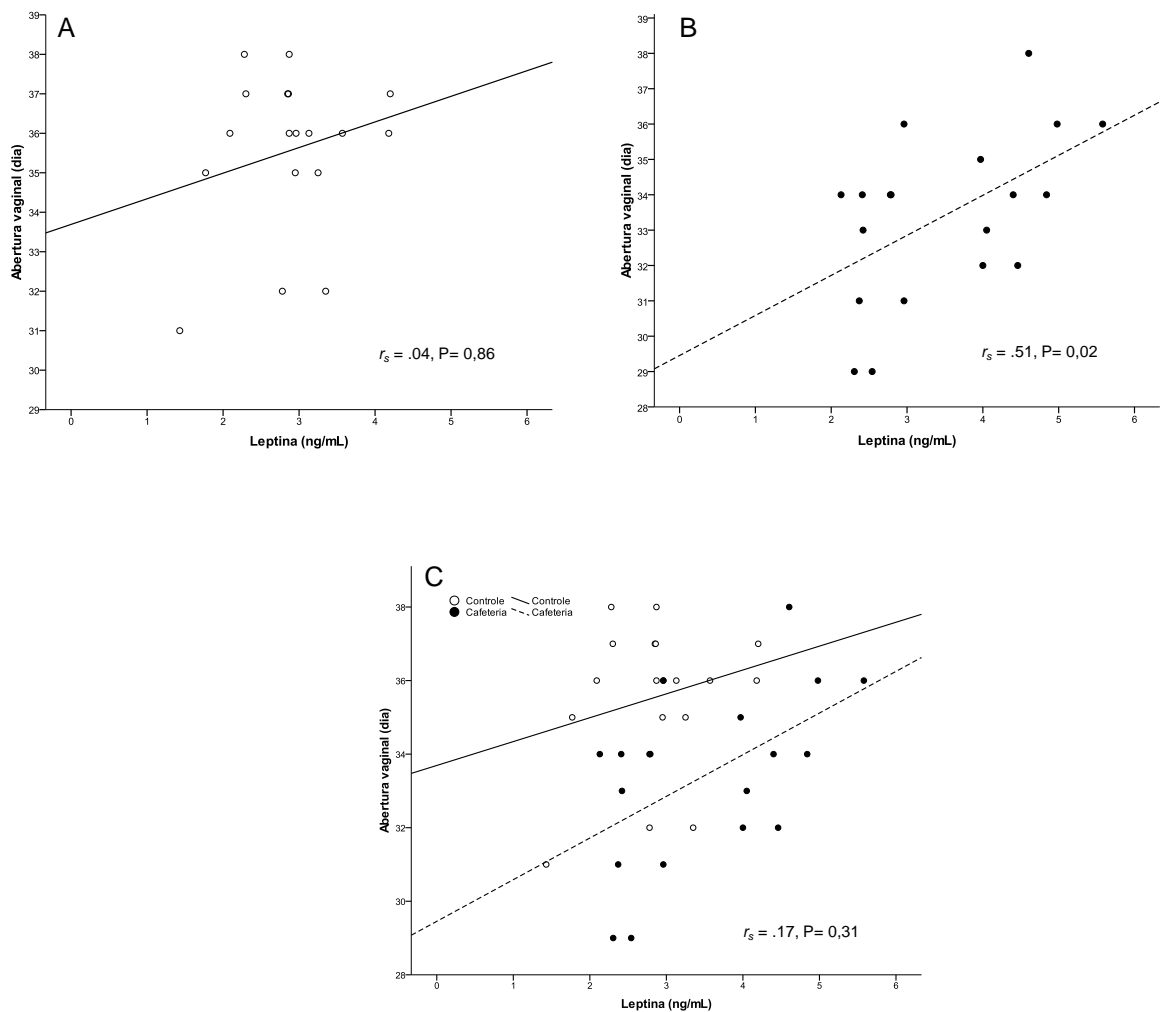


Fig. 17. Correlação entre a concentração sérica de leptina e a abertura vaginal. (A) Correlação entre concentração sérica de leptina e o dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 18). (B) Correlação entre concentração sérica de leptina e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=19). (C) Correlação entre concentração sérica de leptina e o dia da abertura vaginal (n=37). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.8 CORRELAÇÃO ENTRE O PESO DO TECIDO ADIPOSITO INTRA-ABDOMINAL E A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LEPTINA NO DIA DA ABERTURA VAGINAL

A análise dos dados por grupos não identificou correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r = .38$, $P = 0,11$ (Fig. 18. A). Contudo, houve correlação significativa entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica

de leptina no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria, $r = .69$, $P = 0,001$ (Fig. 18. B). A análise dos dados agrupados identificou correlação significativa entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal, $r = .67$, $P < 0,001$ (Fig. 18. C).

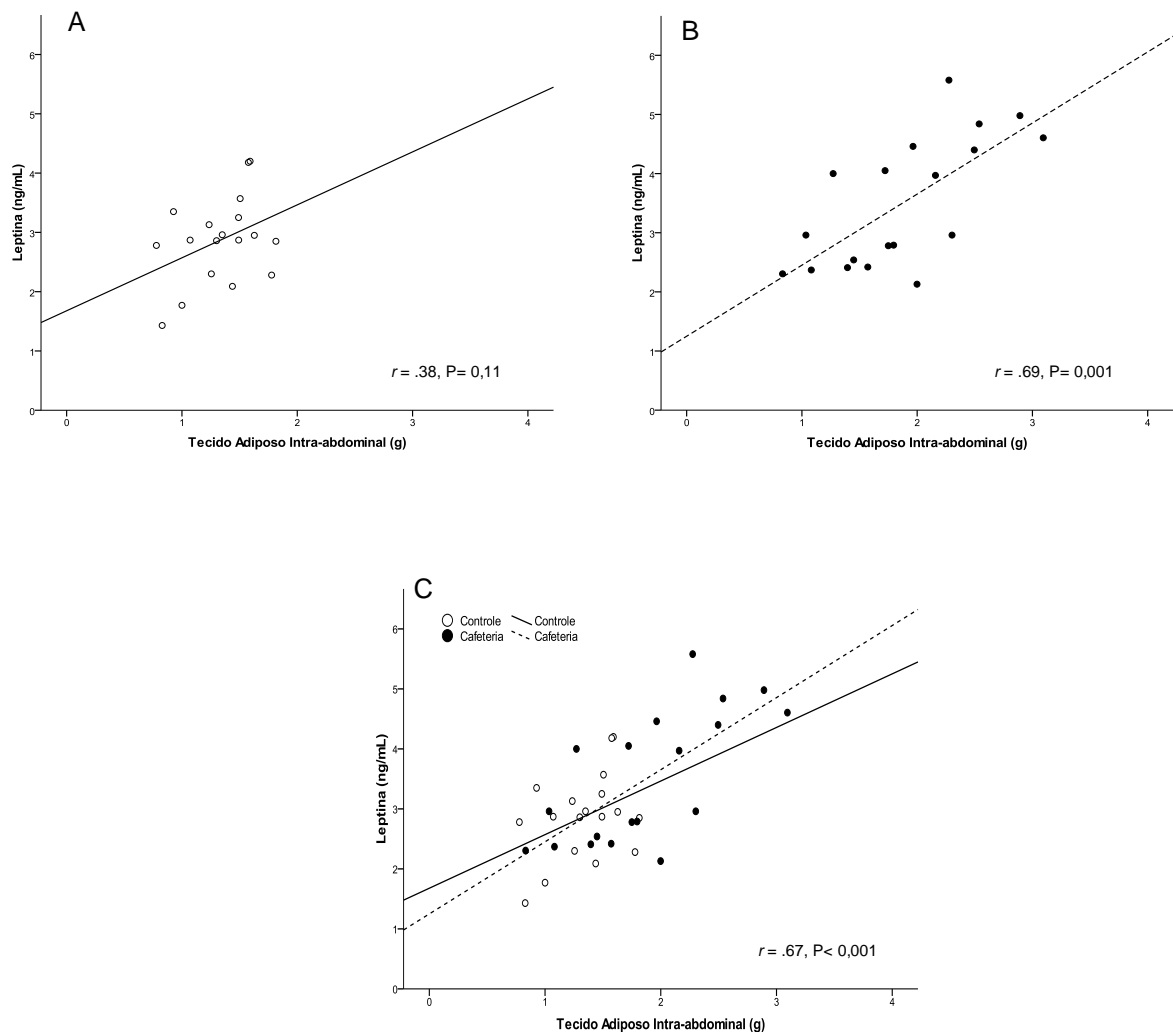


Fig. 18. Correlação entre o tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal. (A) Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 18). (B) Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=19). (C) Correlação entre o peso do tecido adiposo intra-abdominal e a concentração sérica de leptina no dia da abertura vaginal (n=37). Teste de correlação de Pearson (r).

6.9 EXPRESSÃO DOS GENES *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* E *Lepr* EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO NO DIA DA ABERTURA VAGINAL

A partir dos encéfalos dissecados na tarde do dia da abertura vaginal, procedeu-se às análises de expressão dos genes *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* e *Lepr* pelo método de qPCR. Os resultados de qPCR revelaram que a expressão de *Gnrh1/Actb* mRNA, *Kiss1/Actb* mRNA e *Kiss1r/Actb* mRNA foi semelhante entre os grupos (Fig. 19. A, P= 0,22, Fig. 19. B, P= 0,06 e Fig. 19. C, P= 0,37, respectivamente) no dia da abertura vaginal. A expressão de *Lepr/Actb* mRNA foi significativamente maior no grupo Dieta de Cafeteria em relação ao grupo Controle no dia da abertura vaginal Fig.19. D, P= 0,04).

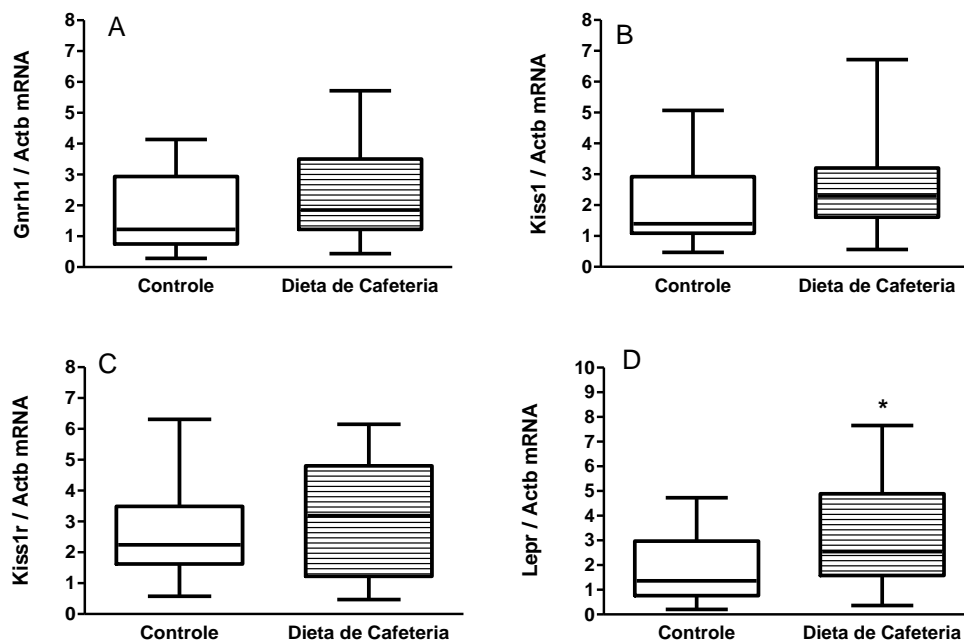


Fig.19. Expressão de genes do sistema kisspeptina e do gene *Gnrh1*. (A) Expressão do gene *Gnrh1* em amostra de encéfalo de ratas no dia da abertura vaginal. O valor das medianas está representado pela barra horizontal dentro do *box plot* e os intervalos quartílicos 25 e 75 pelo limite inferior e superior, respectivamente, do *box plot*. Controle n= 16 e Cafeteria n=14. Teste de Mann-Whitney. (B) Expressão do gene *Kiss1* em amostra de encéfalo de ratas no dia da abertura vaginal. O valor das medianas está representado pela barra horizontal dentro do *box plot* e os intervalos quartílicos 25 e 75 pelo limite inferior e superior, respectivamente, do *box plot*. Controle n= 16 e Dieta de Cafeteria n=14. Teste de Mann-Whitney. (C) Expressão do gene *Kiss1r* em amostra de encéfalo de ratas no dia da abertura vaginal. O valor das medianas está representado pela barra horizontal dentro do *box plot* e os intervalos quartílicos 25 e 75 pelo limite inferior e superior, respectivamente, do *box plot*. Optou-se pela representação gráfica em mediana e intervalos quartílicos ao invés de média e erro padrão da média. Grupo Controle (n =16): média= 1,87 ± 0,36; Grupo Dieta de Cafeteria (n=14): média= 3,26 ± 0,60. Teste t de Student. (D) Expressão do gene *Lepr* em amostra de encéfalo de ratas no dia da abertura vaginal. O valor das medianas está representado pela barra horizontal dentro do *box plot* e os intervalos quartílicos 25 e 75 pelo limite inferior e superior, respectivamente, do *box plot*. Controle n=16 e Dieta de Cafeteria n=14. Teste de Mann-Whitney. *P= 0,04.

6.10 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE COMPONENTES DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE NA ABERTURA VAGINAL

6.10.1 Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e a Abertura Vaginal

A análise de correlação por grupo não identificou correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e o dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .39$, $P = 0,16$ (Fig. 20. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .22$, $P = 0,43$ (Fig. 20. B). Também não houve correlação quando os dados foram analisados em conjunto, $r_s = .17$, $P = 0,35$ (Fig. 20. C).

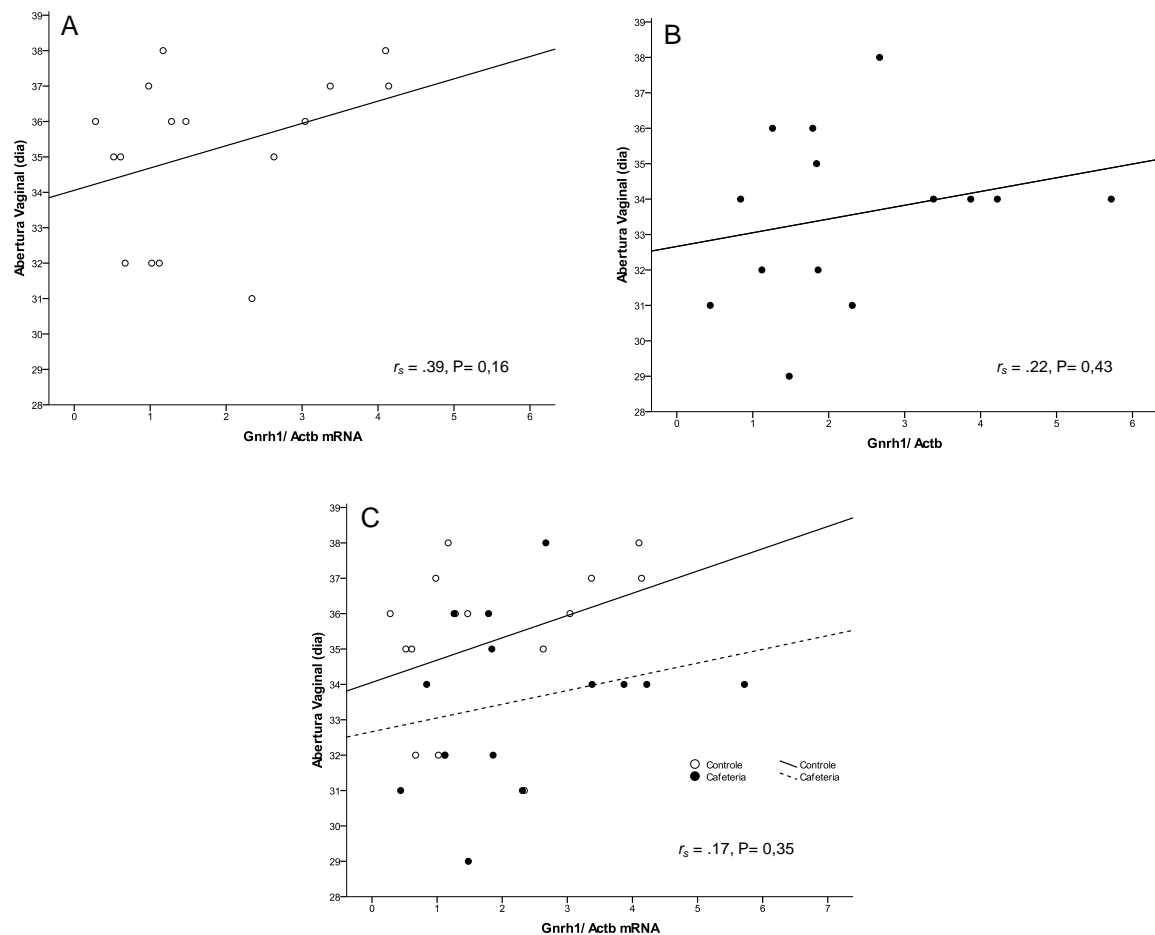


Fig. 20. Correlação entre a expressão de *Gnrh1* mRNA e a abertura vaginal. (A) Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e o dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 16). (B) Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n= 14). (C) Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e o dia da abertura vaginal (n= 30). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.10.2 Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de Hormônio Luteinizante (LH) no dia da Abertura Vaginal

A análise por grupo identificou correlação significativa entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal no grupo controle, $r_s = .76$, $P = 0,003$ (Fig. 21. A). Contudo, não houve correlação significativa entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal no grupo dieta de cafeteria, $r_s = .05$, $P = 0,87$ (Fig. 21. B). Houve correlação significativa entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal, $r_s = .45$, $P = 0,02$ (Fig. 21. C).

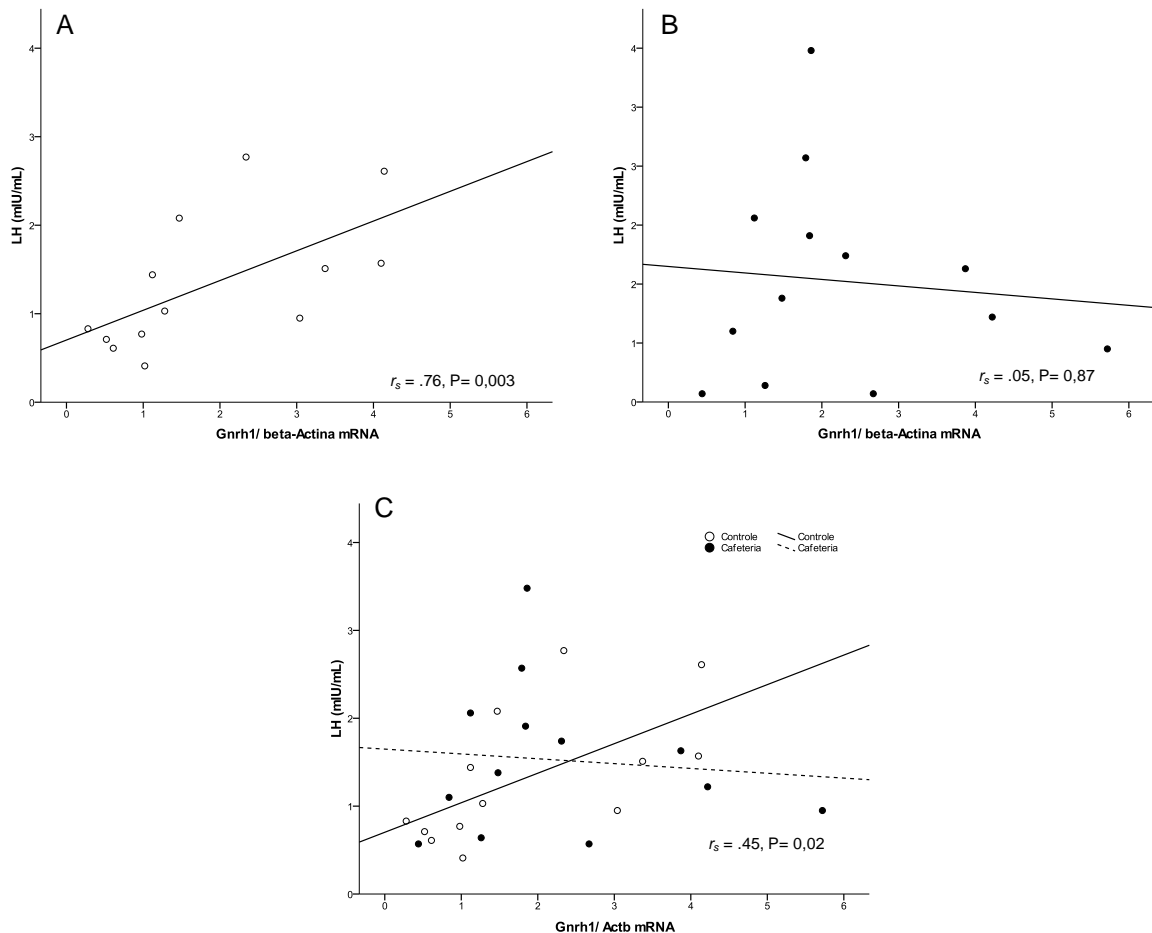


Fig. 21. Correlação entre a expressão de *Gnrh1* mRNA e LH no dia da abertura vaginal. (A) Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 13). (B) Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n= 12). (C) Correlação entre a expressão do gene *Gnrh1* e a concentração sérica de LH no dia da abertura vaginal (n= 25). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.11 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATOR PERIFÉRICO E A EXPRESSÃO DE *Gnrh1* mRNA NA ABERTURA VAGINAL

6.11.1 Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Gnrh1* no dia da Abertura Vaginal

A análise dos dados não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = -.15$, $P = 0,58$ (Fig. 22. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .25$, $P = 0,41$ (Fig. 22. B). A análise dos resultados agrupados também não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal, $r_s = -.14$, $P = 0,49$ (Fig. 22. C).

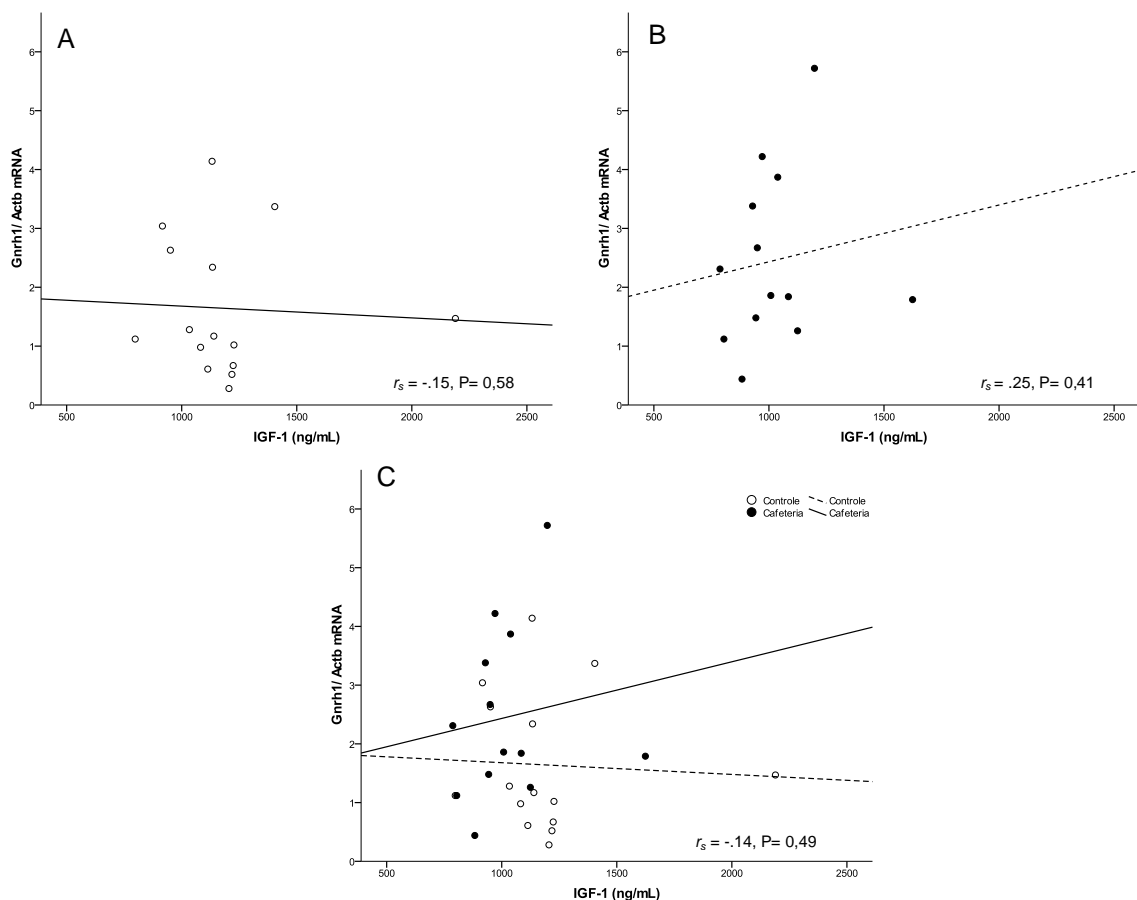


Fig. 22. Correlação entre IGF-1 e a expressão de *Gnrh1* mRNA. (A) Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 15). (B) Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=13). (C) Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal (n=28). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.12 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATOR CENTRAL E A EXPRESSÃO DE *Gnrh1* mRNA NA ABERTURA VAGINAL

6.12.1 Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e o gene *Gnrh1* no dia da Abertura Vaginal

A análise por grupos revelou correlação significativa entre a expressão do gene *Kiss1* e o gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .88$, $P < 0,001$ (Fig. 23. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .78$, $P = 0,001$ (Fig. 23. B). Em análise dos dados agrupados, os resultados também evidenciaram correlação significativa entre a expressão do gene *Kiss1* e gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal, $r_s = .87$, $P < 0,001$ (Fig. 23. C).

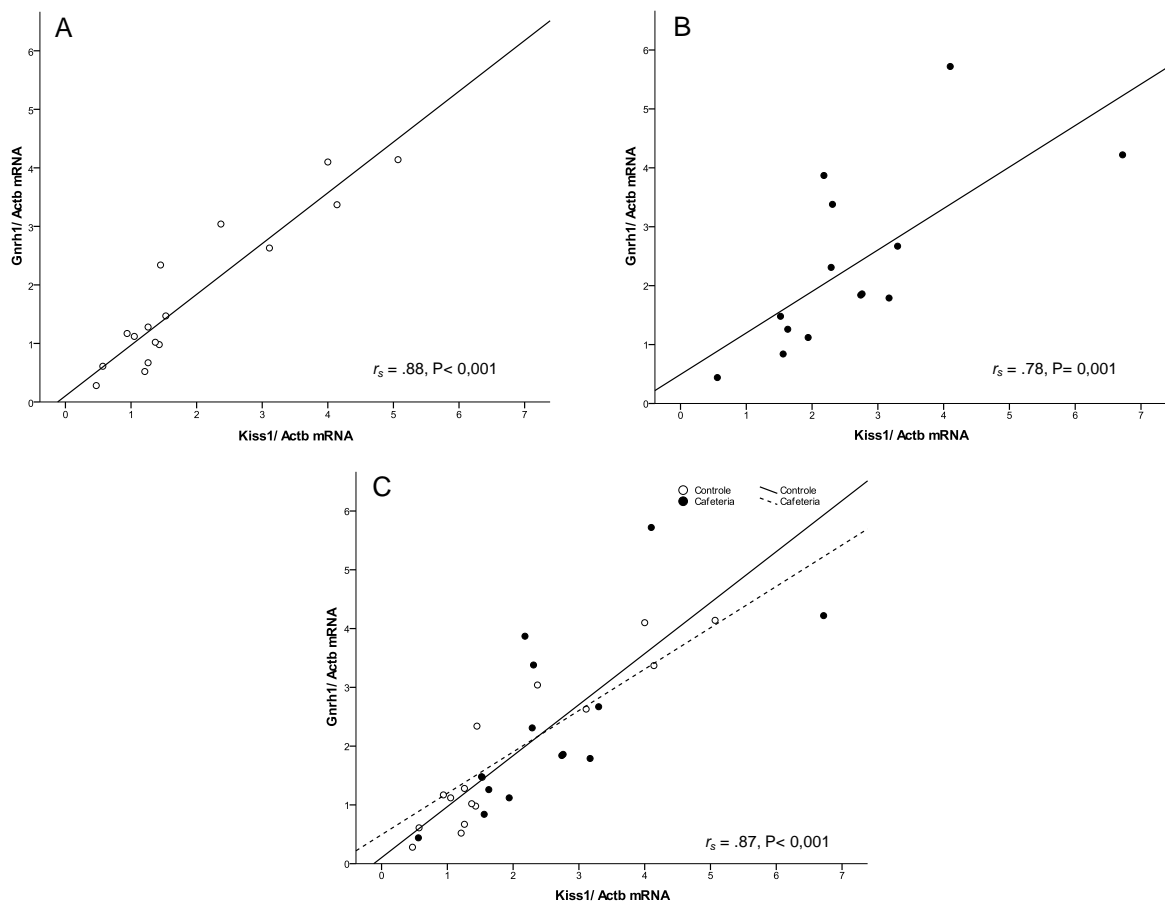


Fig. 23. Correlação entre *Kiss1* mRNA e *Gnrh1* mRNA. A) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e o gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 16). (B) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e o gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n= 14). (C) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e gene *Gnrh1* no dia da abertura vaginal (n= 30). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.13 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE COMPONENTES DO SISTEMA KISSPEPTINA E A ABERTURA VAGINAL

6.13.1 Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e a Abertura Vaginal

A análise por grupos não revelou correlação significativa entre a expressão do gene *Kiss1* e o dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .30$, $P = 0,24$ (Fig. 24. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .48$, $P = 0,07$ (Fig. 24. B). Da mesma maneira, a análise com dados agrupados não demonstrou correlação significativa entre a expressão do gene *Kiss1* e o dia da abertura vaginal, $r_s = .24$, $P = 0,19$ (Fig. 24. C).

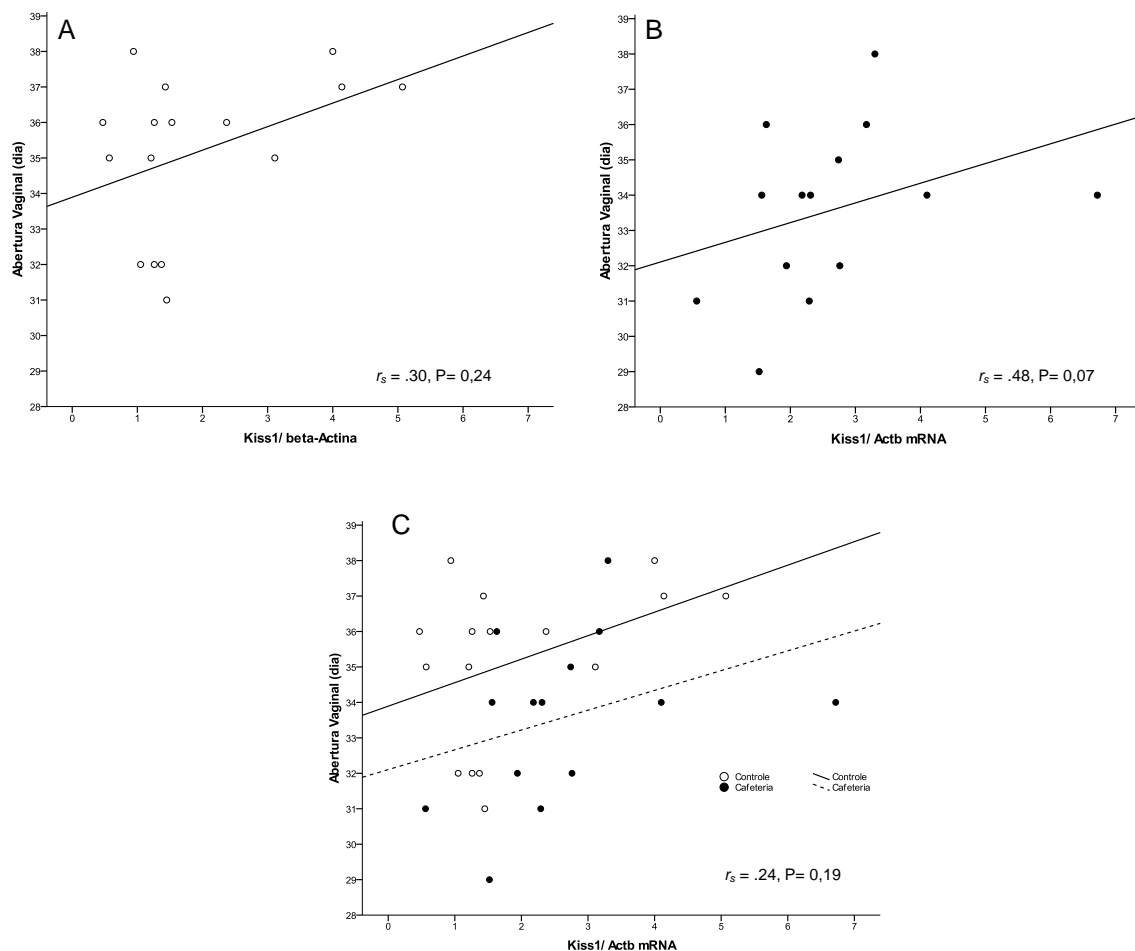


Fig. 24. Correlação entre *Kiss1* mRNA e a abertura vaginal. (A) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e o dia da abertura vaginal no grupo Controle ($n = 16$). (B) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria ($n = 14$). (C) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1* e o dia da abertura vaginal ($n = 30$). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.13.2 Correlação entre a expressão do gene *Kiss1r* e a Abertura Vaginal

Os resultados não evidenciaram correlação significativa entre a expressão do gene *Kiss1r* e o dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = -.04$, $P = 0,88$ (Fig. 25. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .34$, $P = 0,22$ (Fig. 25. B). A análise por grupos não revelou correlação significativa entre a expressão do gene *Kiss1r* e o dia da abertura vaginal, $r_s = .10$, $P = 0,59$ (Fig. 25. C).

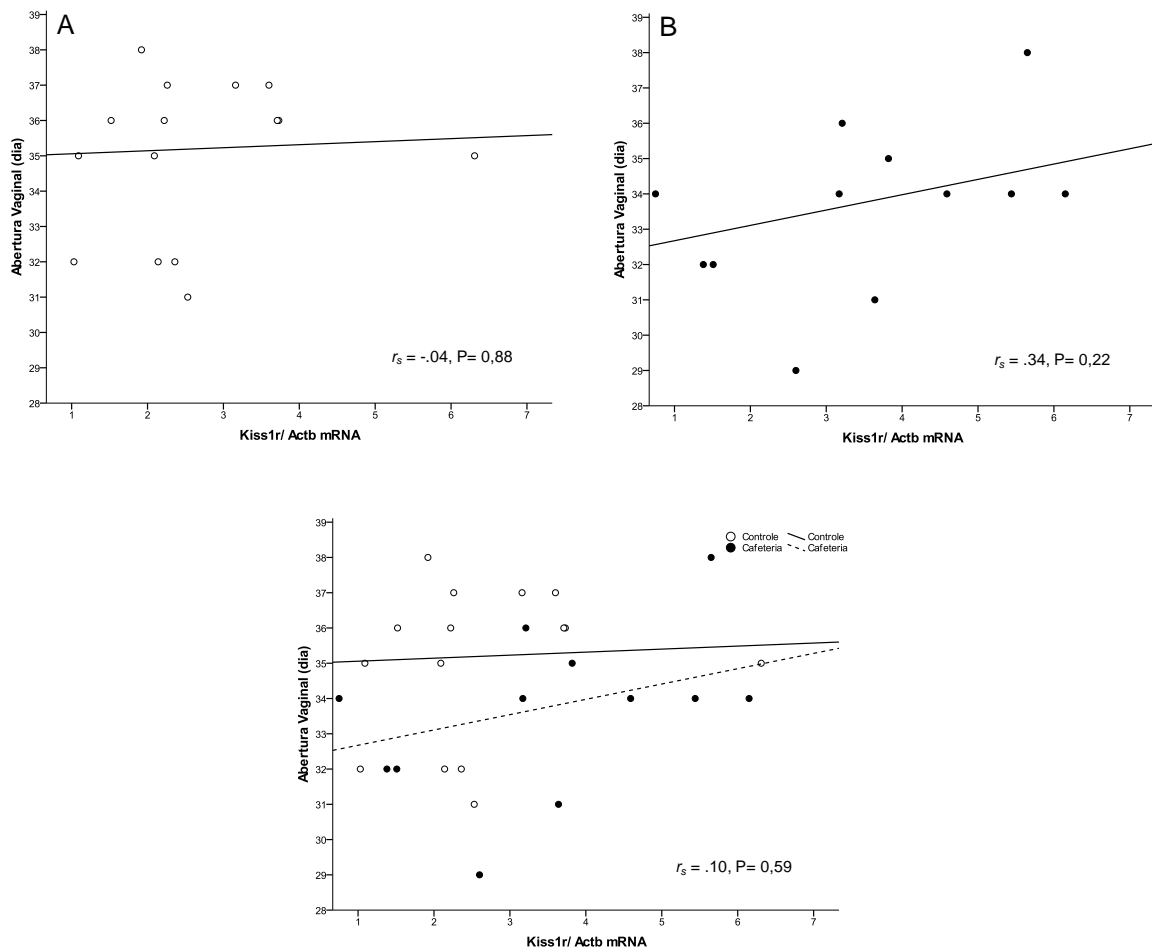


Fig. 25. Correlação entre *Kiss1r* mRNA e Abertura vaginal. (A) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1r* e o dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 16). (B) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1r* e o dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n= 14). (C) Correlação entre a expressão do gene *Kiss1r* e o dia da abertura vaginal (n= 30). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.14 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES PERIFÉRICOS E A EXPRESSÃO DE *Kiss1* mRNA e *Kiss1r* mRNA NA ABERTURA VAGINAL

6.14.1 Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1* no dia da Abertura Vaginal

A análise de correlação não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .06$, $P = 0,82$ (Fig. 26. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .13$, $P = 0,65$ (Fig. 26. B). Da mesma maneira, a análise dos dados agrupados não demonstrou correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1*, $r_s = .34$, $P = 0,07$ (Fig. 26. C).

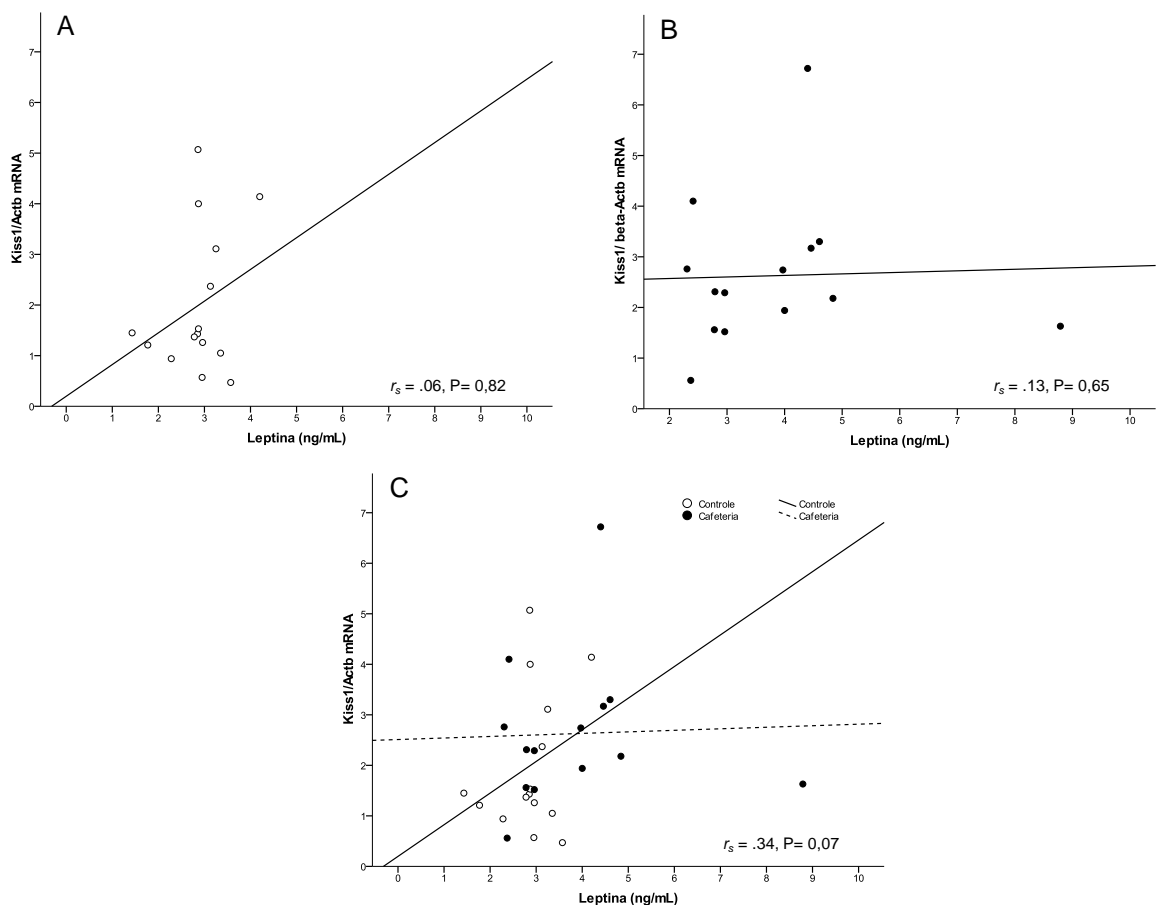


Fig. 26. Correlação entre a concentração sérica de leptina e *Kiss1* mRNA. (A) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle ($n = 15$). (B) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria ($n = 14$). (C) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal ($n = 29$). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.14.2 Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da Abertura Vaginal

A análise realizada não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .04$, $P = 0,89$ (Fig. 27. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .43$, $P = 0,13$ (Fig. 27. B). Os mesmos resultados foram obtidos quando analisados em grupo, pois não houve correlação significativa entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal, $r_s = -.04$, $P = 0,84$ (Fig. 27. C).

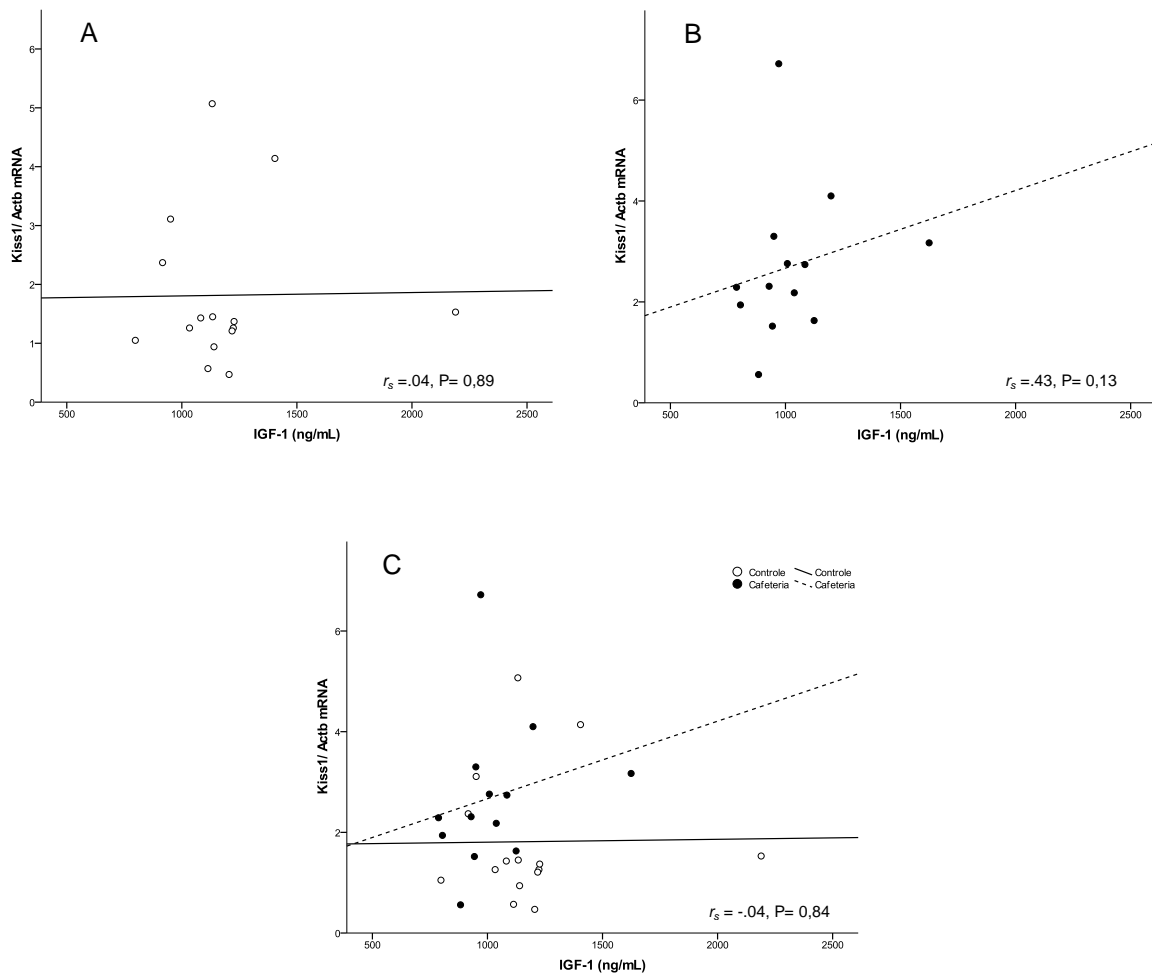


Fig. 27. Correlação entre IGF-1 e a expressão de *Kiss1* mRNA. (A) Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 15). (B) Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=13). (C) Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal (n=28). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.14.3 Correlação entre a concentração sérica de 17 β -estradiol (E2) e a expressão do gene *Kiss1* no dia da Abertura Vaginal

A análise não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de E2 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .11$, $P = 0,69$ (Fig. 28. A) e no grupo Dieta de Cafeteria $r_s = -.38$, $P = 0,20$ (Fig. 28. B). A análise de dados agrupados também não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de E2 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal, $r_s = .01$, $P = 0,97$ (Fig. 28. C).

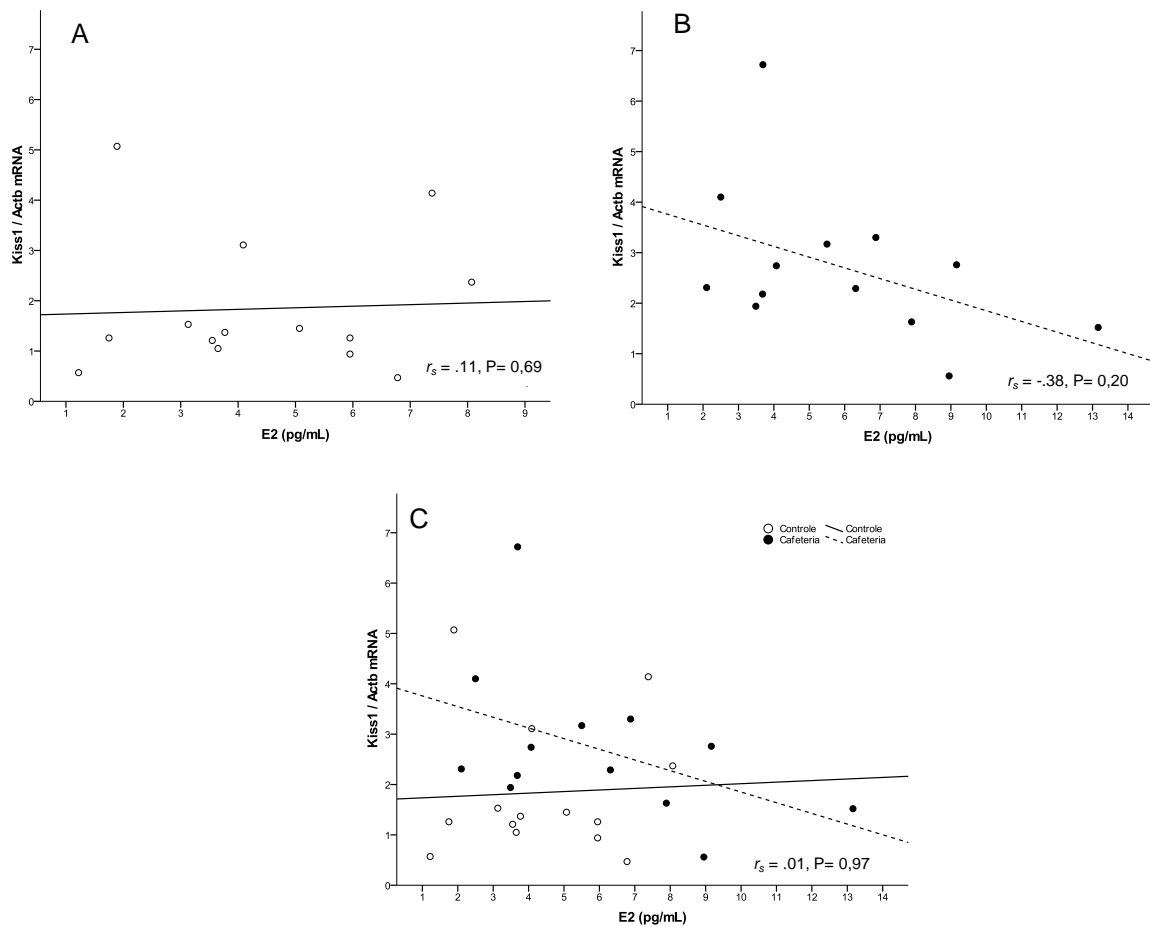


Fig. 28. Correlação entre a concentração sérica de E2 e a expressão de *Kiss1* mRNA. (A) Correlação entre a concentração sérica de E2 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 14). (B) Correlação entre a concentração sérica de E2 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=13). (C) Correlação entre a concentração sérica de E2 e a expressão do gene *Kiss1* no dia da abertura vaginal (n=27). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.14.4 Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1r* no dia da Abertura Vaginal

A análise realizada por grupo não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1r* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r_s = .05$, $P = 0,87$ (Fig. 29. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r_s = .39$, $P = 0,16$ (Fig. 29. B). A análise dos resultados demonstrou ausência de correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1r* no dia da abertura vaginal quando os dados foram agrupados, $r_s = .33$, $P = 0,08$ (Fig. 29. C).

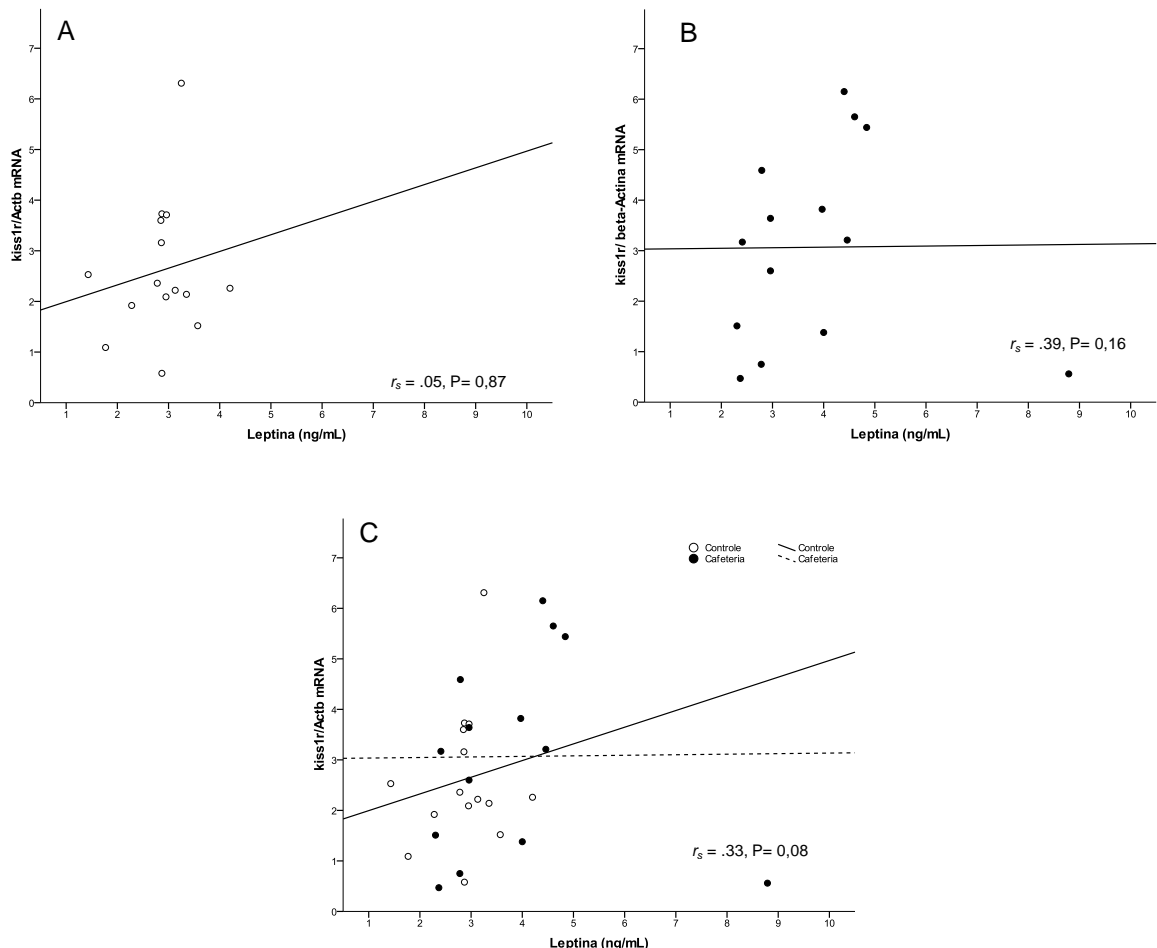


Fig. 29. Correlação entre a concentração de leptina e *Kiss1r* mRNA. (A) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1r* no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 15). (B) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1r* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=14). (C) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Kiss1r* no dia da abertura vaginal (n=29). Teste de correlação de Spearman (r_s).

6.15 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A SINALIZAÇÃO DAS RESERVAS DE ENERGIA E A EXPRESSÃO DE *Lepr* mRNA NO DIA DA ABERTURA VAGINAL

6.15.1 Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Lepr* no dia da Abertura Vaginal

A análise realizada por grupo não identificou correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Lepr* no dia da abertura vaginal no grupo Controle, $r = .26$, $P = 0,34$ (Fig. 30. A) e no grupo Dieta de Cafeteria, $r = -.03$, $P = 0,92$ (Fig. 30. B). A análise dos resultados demonstrou ausência de correlação significativa entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Lepr* no dia da abertura vaginal, $r = .16$, $P = 0,42$ (Fig. 30. C).

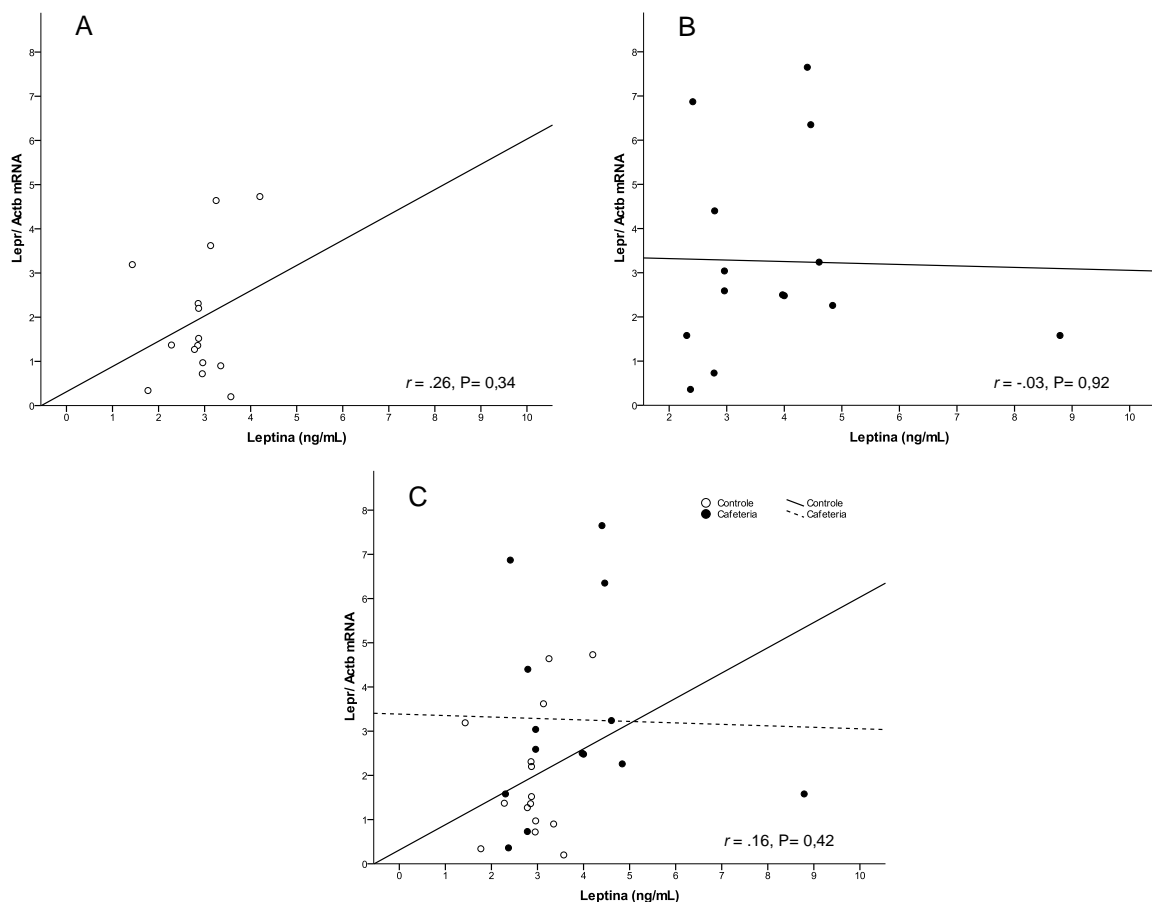


Fig. 30. (A) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Lepr* no dia da abertura vaginal no grupo Controle (n= 15). (B) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Lepr* no dia da abertura vaginal no grupo Dieta de Cafeteria (n=14). (C) Correlação entre a concentração sérica de leptina e a expressão do gene *Lepr* no dia da abertura vaginal (n=29). Teste de correlação de Pearson (r).

7 DISCUSSÃO

O estado de nutrição exerce efeito importante sobre o processo de maturação sexual do organismo (CASTELLANO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; SAGAE *et al.*, 2013; SÁNCHEZ-GARRIDO *et al.*, 2013; SMITH; SPENCER, 2012; TERASAWA *et al.*, 2012), embora os mecanismos sejam pouco compreendidos. Assim, o presente estudo investigou o efeito de uma dieta palatável com alimentos ricos em energia consumidos por humanos sobre a ingestão alimentar e início da puberdade em ratos fêmeas e a possível alteração de fatores metabólicos e centrais envolvidos com a maturação sexual. Os principais resultados revelaram que a Dieta de Cafeteria no período peripubertal altera o padrão de ingestão alimentar, promovendo redução da ingestão de ração padrão, carboidratos e proteína e aumento da ingestão de lipídeos, levando ao aumento da ingestão de energia. O padrão de ingestão alimentar estabelecido no período peripubertal pela Dieta de Cafeteria acelerou o processo de maturação sexual, culminado no adiantamento da instalação da puberdade e no desenvolvimento dos ovários. Contudo, não houve alteração em relação ao desenvolvimento corporal, como evidenciado pelos resultados de peso corporal, ganho de peso e IGF-1. Por outro lado, o padrão alimentar estabelecido modulou a expansão do tecido adiposo intra-abdominal e elevação da concentração de leptina, ambos correlacionados positivamente entre si e com a abertura vaginal nos animais alimentados com Dieta de Cafeteria. Além disso, a alimentação com elevado conteúdo de energia modulou a expressão da forma longa do receptor de leptina, com o aumento da expressão em regiões envolvidas com a homeostase energética e reprodução. Contudo, o estado metabólico de elevado conteúdo de energia não modulou a liberação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise gônada, como o hormônio luteinizante e o 17β -estradiol, assim como não modulou a expressão dos genes-chave envolvidos com a maturação sexual e instalação da puberdade, como os genes *Gnrh1*, *Kiss1* e *Kiss1r*.

O conjunto de mudanças observadas pela introdução da Dieta de Cafeteria desde o desmame sobre a ingestão de ração padrão e de nutrientes provavelmente reflete a condição experimental utilizada. O aumento da ingestão de energia observada no presente estudo é confirmada por experimentos realizados em ratos

machos e fêmeas submetidos ao modelo de Dieta de Cafeteria no período pós-desmame. No período pós-desmame há aumento da ingestão de energia no período puberal em ratos machos (MUCELLINI *et al.*, 2014) e no período peripuberal em fêmeas (SAGAE, 2010). A redução da ingestão de carboidratos e proteínas observada no presente estudo difere do observado em fêmeas adultas expostas à Dieta de Cafeteria e em fêmeas na puberdade expostas à alimentação palatável desde o desmame, embora confirme o aumento da ingestão de lipídeos. Fêmeas adultas apresentam aumento da ingestão de carboidratos e lipídeos e menor ingestão de proteínas na idade adulta (GOULARTE; FERREIRA; SANVITTO, 2012). Por outro lado, algumas evidências demonstram que em fêmeas durante a puberdade (após a abertura vaginal), a ingestão de alimentos palatáveis aumenta apenas a ingestão de energia e de carboidratos (ONG; MUHLHAUSLER, 2014).

A elevada ingestão de energia e lipídeos observado nos animais submetidos à Dieta de Cafeteria foi acompanhada pela aceleração da maturação sexual e o adiantamento da abertura vaginal e desenvolvimento dos ovários indicando um início precoce da puberdade, embora sem alterações no peso do útero. O estado nutricional é reconhecido como um elemento fundamental para o curso da maturação sexual e início da puberdade em fêmeas, como observado em condições experimentais com redução ou aumento de acesso à alimentação em diferentes fases do desenvolvimento. A redução da disponibilidade de alimentos para ratas prenhas ao longo do período gestacional atrasa o início da puberdade nos filhotes fêmea (IWASA *et al.*, 2010). Além disso, manipulações no período pós-natal que reduzem o acesso à amamentação atrasam a instalação da puberdade, enquanto que manipulações experimentais para aumentar a oferta de alimentos adiantam o início do processo puberal em fêmeas (CASTELLANO *et al.*, 2011; SMITH; SPENCER, 2012). Em alguns modelos de obesidade, a puberdade é adiantada em animais alimentados com ração rica em lipídeos (*high-fat diet*) (BOUKOUVALAS *et al.*, 2008; FRISCH, ROSE E.; HEGSTED; YOSHINAGA, 1975; LI *et al.*, 2012), enquanto outros não observaram adiantamento da puberdade relacionada com dieta *high fat* (LIE; OVERGAARD; MIKKELSEN, 2013; RAMALEY, 1981). Parece que a diferença nos teores de lipídeos em cada uma dessas dietas explica as divergências encontradas. Embora seja difícil determinar qual o nutriente ingerido pelos animais pode ter influenciado o adiantamento da abertura vaginal no presente estudo, os

experimentos com dietas hiperlipídicas e a elevada ingestão de lipídeos observada nos animais com Dieta de Cafeteria no presente estudo sugerem que os lipídeos possam ser um fator modulador da maturação sexual. Algumas evidências demonstram que a ingestão de lipídeos no período peripuberal regula o início da puberdade em fêmeas de rato (LEIBOWITZ *et al.*, 2009), sendo que o mecanismo de ação proposto é pela modulação de peptídeos orexigênicos e de hormônios esteroides. Contudo, cabe determinar a influência direta dos lipídeos sobre os centros reguladores da instalação da puberdade.

O processo de maturação sexual é acompanhado pelo desenvolvimento somático e adiposidade corporal (VELDHUIS *et al.*, 2005), onde ambos são influenciados pelo estado metabólico. Embora a maior ingestão de energia e lipídeos, o tratamento com Dieta de Cafeteria resultou em menor peso corporal no dia da abertura vaginal e menor ganho de peso até o dia da abertura vaginal. Contudo, o ganho de peso foi semelhante quando analisado em dias iguais no período peripuberal e puberal inicial, sugerindo que as diferenças de peso corporal e no ganho de peso corporal foram decorrentes do adiantamento em média de dois dias na abertura vaginal das fêmeas que receberam Dieta de Cafeteria, sugerindo que não foi necessário atingir determinado peso para a abertura vaginal e início da puberdade. Além disso, houve correlação positiva entre o peso corporal e o ganho de peso corporal com o dia da abertura vaginal, sugerindo que os fatores metabólicos envolvidos com o desenvolvimento somático estavam sob regulação fisiológica no grupo Dieta de Cafeteria. Isso é reforçado pela ausência de efeito da Dieta de Cafeteria sobre a concentração sérica de IGF-1, que é modulador do crescimento ósseo e muscular (VELDHUIS *et al.*, 2005). Contudo, esses resultados contrariam estudos prévios onde o peso corporal é indicador mais importante para prever o início da puberdade em fêmeas do que a idade do animal (CASTELLANO *et al.*, 2011; IWASA *et al.*, 2010; KENNEDY; MITRA, 1963), sugerindo que outros fatores presentes ao longo do desenvolvimento foram modulados pela Dieta de Cafeteria poderiam ter influenciado a instalação da puberdade.

Estudos epidemiológicos sugerem que diminuiu a idade de aparecimento de sinais de puberdade em meninas nos últimos anos (EULING *et al.*, 2008; HERMANGIDDENS *et al.*, 1997), sendo que há um risco aumentado para o surgimento de sinais precoce de puberdade com o aumento da adiposidade corporal no período

pré-pubere (ROSENFELD; LIPTON; DRUM, 2009). Nesse sentido, além de demonstrar um adiantamento da abertura vaginal, o presente estudo demonstrou que o tratamento com Dieta de Cafeteria no período peripuberal estimulou o aumento do tecido adiposo intra-abdominal. Esses achados confirmam estudos prévios, onde há um aumento do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal no início do período puberal (SAGAE, 2010). Além disso, houve correlação positiva da adiposidade visceral com a instalação da puberdade em ambos os grupos, sugerindo o tecido adiposo visceral como um sinalizador das reservas de energia e possível regulador da função reprodutiva. Esse dados de correlação indicam que o tecido adiposo intra-abdominal pode estar envolvido com a instalação da puberdade e que a rápida expansão do tecido adiposo nos animais tratados com Dieta de Cafeteria sinalizou antecipadamente um nível ótimo de reserva de energia para o início da puberdade. O menor peso observado nas adrenais no grupo Dieta de Cafeteria pode ser explicado pelo adiantamento do dia da abertura vaginal, uma vez que quando o peso das adrenais foi normalizado pelo peso corporal não houve diferença evidente. O desenvolvimento das adrenais parece sofrer influência de dietas ricas em lipídeos (BOUKOUVALAS *et al.*, 2008) e estar envolvida com a maturação sexual em ratas (PIGNATELLI *et al.*, 2006), embora o presente experimento não tenha conseguido identificar alterações nesse órgão frente as condições experimentais utilizadas.

O tecido adiposo é um órgão endócrino que sintetiza e libera proteínas conhecidas como adipocinas e citocinas, que exercem ações sobre diferentes sistemas biológicos e que são importantes reguladores do metabolismo energético e de processos inflamatórios (SCHERER, 2006). No que se refere aos aspectos reprodutivos, o hormônio leptina secretado pelos adipócitos (MASUZAKI *et al.*, 1995) em proporção a quantidade de tecido adiposo (MAFFEI *et al.*, 1995), é um importante regulador da maturação sexual e fertilidade em fêmeas (BARASH *et al.*, 1996), sendo um elo entre o estado energético do organismo e o início da puberdade. No presente estudo, o dia da abertura vaginal foi marcado por aumento da concentração de leptina nos animais que receberam a Dieta de Cafeteria. Além disso, a elevação de leptina foi correlacionada com a adiposidade com o dia da abertura vaginal somente nos animais com Dieta de Cafeteria, sugerindo a leptina proveniente do tecido adiposo intra-abdominal como um sinal metabólico dos

estoques de energia para os elementos reguladores da instalação da puberdade. Estudos farmacológicos demonstram que a injeção intraperitoneal (i.p.) de leptina adianta a abertura vaginal (AHIMA *et al.*, 1997) e a maturação de órgãos do sistema reprodutor como útero, ovários e ovidutos (CHEHAB *et al.*, 1997), sugerindo um mecanismo para explicar o aumento do peso dos ovários no dia da abertura vaginal no grupo deita de Cafeteria. Em animais submetidos à dieta hiperlipídica (*high-fat diet*) a concentração de leptina aumenta gradativamente entre o período peripuberal e puberal em fêmeas (LI *et al.*, 2012). Porém, evidências sugerem que a leptina é um fator permissivo para a maturação sexual ao invés de ser o fator que deflagra a puberdade (CHEUNG *et al.*, 1997). Assim, é provável que os animais no presente estudo tenham desenvolvido um aumento gradual de tecido adiposo intra-abdominal e de leptina. Dessa forma, a concentração elevada de leptina foi suficiente para atingir o limiar necessário para sinalizar ao eixo H-H-G um estado adequado de reservas de energia e permitir o curso normal do desenvolvimento puberal. Contudo, devido ao desenho experimental não foi possível identificar o início do curso dessas modificações.

A leptina sinaliza para o sistema nervoso central o estado de reservas de energia do organismo pela ligação a receptores de membrana Ob-Rb. O gene *Lepr*, que codifica a proteína Ob-Rb, possui elevada expressão em neurônios localizados em regiões hipotalâmicas envolvidas com a homeostase energética e reprodução, incluindo neurônios localizados nos núcleos arqueado, dorsomedial, dorsoventral e pré-mamilar ventral (ELMQUIST *et al.*, 1998). Estudos recentes de expressão proteica confirmaram a localização dos estudos de expressão de mRNA para a isoforma longa Ob-Rb, confirmando o hipotálamo como local de elevada concentração de neurônios com receptores Ob-Rb (PATTERSON *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo revelaram aumento da expressão de *Lepr* mRNA em amostras de encéfalos contendo as regiões mencionadas anteriormente no dia da abertura vaginal frente à exposição à Dieta de Cafeteria. No entanto, a elevada concentração de leptina sérica observada nos animais com Dieta de Cafeteria não apresentou associação com o *Lepr* mRNA no presente estudo, sugerindo a possibilidade de modulação por outros fatores nas condições estudadas. Em ratos machos submetidos à *high-fat diet* por 12 (XU *et al.*, 2008) e 8 semanas (LIU *et al.*, 2007), o nível de *Lepr* mRNA no hipotálamo foi reduzido e a concentração de leptina

foi elevada, enquanto outros trabalhos não observaram mudanças na expressão de *Lepr* mRNA mesmo com elevação da leptina em 8 semanas de estudo (PAGE *et al.*, 2009). Além disso, ratos machos mantidos em condições com elevada oferta de alimento no período juvenil desenvolvem aumento da concentração de leptina e redução da expressão de *Lepr* mRNA no hipotálamo no período juvenil (ARCHER; RAYNER; MERCER, 2004), sugerindo que o estado metabólico e possivelmente a leptina exerça *downregulation* na expressão do receptor, que pode resultar em resistência à leptina e obesidade. Por outro lado, estudo utilizando metodologia semelhante não identificou mudança na expressão de *Lepr* mRNA na idade adulta, sugerindo que a idade é um fator modulador da expressão do receptor de leptina (LÓPEZ *et al.*, 2007). Assim, a elevação da expressão do gene *Lepr* no presente estudo pode ser o resultado da modulação por outros fatores metabólicos de origem periférica ou por fatores de origem central.

Além da leptina, outros fatores periféricos parecem sinalizar o estado metabólico (ROA *et al.*, 2010) e de desenvolvimento do organismo para os centros reguladores da função reprodutiva para deflagrar o início do processo puberal. No presente estudo, avaliou-se a concentração sérica de IGF-1 como um possível sinalizador do estado de desenvolvimento somático para o eixo H-H-G no dia da abertura vaginal, pois alguns estudos demonstram um adiantamento da instalação da puberdade em animais após a injeção intraperitoneal de IGF-1 no período peripuberal (DIVALL *et al.*, 2010). O resultado obtido no presente estudo não revelou aumento da concentração sérica de IGF-1 no dia da abertura vaginal em animais submetidos à Dieta de Cafeteria. Contudo, fêmeas de macaco rhesus submetidas à alimentação hipercalórica no período juvenil e peripuberal apresentam um aumento evidente da concentração de IGF-1 no início do tratamento (TERASAWA *et al.*, 2012). Da mesma maneira, camundongos adultos em tratamento com *high fat diet* também apresentam elevação na concentração de IGF-1 (MAH *et al.*, 2014). Assim, é possível que as condições experimentais empregadas no presente estudo não tenham exercido efeito importante sobre a regulação da liberação de IGF-1 ao longo do período peripuberal.

Para verificar a possível modulação dos componentes do eixo H-H-G pelo estado metabólico, o presente estudo analisou a concentração sérica dos hormônios LH e E2 na tarde da abertura vaginal. Embora as evidentes alterações do

desenvolvimento do tecido adiposo e secreção de leptina, associados com o adiantamento do processo puberal em virtude da alimentação com Dieta de Cafeteria, o estado metabólico resultante não produziu modificações adicionais nas concentrações séricas de LH e de E2. Contudo, dados na literatura científica suportam a hipótese da influência do estado metabólico sobre a atividade dos diferentes níveis do eixo H-H-G no período peripuberal. O balanço energético negativo causado pelo jejum de 48 horas em fêmeas de rato Wistar no período peripuberal reduz a concentração de LH em relação a animais alimentados (GARCÍA-GALIANO *et al.*, 2010). Da mesma forma, animais submetidos ao protocolo de restrição alimentar apresentam redução das concentrações de LH e de E2 (CASTELLANO *et al.*, 2005). Por outro lado, animais submetidos à alimentação hiperlipídica (*high-fat diet*) desde o desmame (dia 21 pós-natal) apresentam aumento da frequência dos pulsos de secreção de LH nos dias 28 e 32 pós-natal e aumento da concentração sérica de E2 nos dias 28, 32 e 36 pós-natal (LI *et al.*, 2012). Contudo, alguns trabalhos não identificaram mudanças na concentração sérica de LH e E2 no dia da abertura utilizando um modelo de *high-fat diet* (LIE; OVERGAARD; MIKKELSEN, 2013). A divergência dos resultados obtidos no presente estudo em relação a outros trabalhos pode ser explicada pela diferença nos desenhos experimentais utilizados, uma vez que as análises aqui realizadas foram obtidas em amostras no dia da abertura vaginal, enquanto em outros trabalhos as amostras foram obtidas ao longo do período puberal e anterior à abertura vaginal. Assim, possíveis mudanças na concentração de LH e de E2 ocorridas no período peripuberal não foram identificadas. Além disso, os dados de correlação não evidenciaram associação entre a concentração de LH e E2 na tarde do dia da abertura vaginal, o que seria esperado visto que o LH aumenta a liberação de E2 em condições fisiológicas (URBANSKI; OJEDA, 1985a). Contudo, como a secreção de LH dá-se em pulsos (URBANSKI; OJEDA, 1985b), a análise em apenas um momento pode ter sido insuficiente para identificar o fenômeno, pois alguns animais com baixa concentração de LH apresentaram elevada concentração de E2.

Do ponto de vista neuroendócrino, a puberdade em fêmeas inicia com a ativação dos neurônios que secretam GnRH (OJEDA; SKINNER, 2006), assim o presente estudo optou por analisar a expressão *Gnrh1* mRNA em amostras de encéfalo contendo neurônios que secretam GnRH no dia da abertura vaginal. Os

resultados obtidos não evidenciaram modificações da expressão de *Gnrh1* mRNA no dia da abertura vaginal. Além disso, não houve associação entre a expressão de *Gnrh1* mRNA com a abertura vaginal, embora em condições controle tenha ocorrido correlação positiva entre a expressão de *Gnrh1* mRNA e a concentração sérica de LH, sugerindo modulação do peptídeo GnRH sobre os gonadotrofos hipofisários e secreção de LH. As evidências científicas em relação à modulação da expressão de *Gnrh1* mRNA decorrente do estado metabólico são divergentes. Em estudo realizado em macaco reshus, a indução de balanço energético negativo por jejum de 48 horas não exerceu efeito adicional sobre a expressão de *Gnrh1* mRNA (WAHAB *et al.*, 2011). Contudo, trabalhos utilizando técnicas de imunohistoquímica demonstraram redução da imunoreatividade para GnRH em hipotálamo de fêmeas de rato Wistar adultas sob jejum (KUMAR; KAUR, 2013). Assim, seria importante determinar a modulação da formação do peptídeo GnRH frente ao estado metabólico em animais alimentados com Dieta de Cafeteria. A ausência de associação entre a concentração de LH e a expressão de *Gnrh1* mRNA no grupo Dieta de Cafeteria pode refletir a dispersão dos dados de três animais, visto que há visualmente um padrão de associação positiva entre essas variáveis. Assim, é plausível que as alterações metabólicas produzidas pela Dieta de Cafeteria tenham exercido efeito sobre os neurônios que secretam GnRH, porém o desenho experimental ou os métodos utilizados não foram adequados para identificar as alterações. A ativação dos neurônios que secretam GnRH no início do processo puberal parece ser o resultado do predomínio de estímulos excitatórios sobre estímulos inibitórios exercido sobre os neurônios que secretam GnRH (SISK; FOSTER, 2004). O IGF-1 de origem periférica parece estimular os neurônios que secretam GnRH durante o início da puberdade, pois a inibição seletiva da expressão de receptores de IGF-1 (IGF1R) em neurônios que secretam GnRH retarda a abertura vaginal (DIVALL *et al.*, 2010). Contudo, o presente estudo não identificou uma correlação positiva entre a concentração de IGF-1 e a expressão de *Gnrh1* mRNA no dia da abertura vaginal em condição controle, sugerindo que a expressão de *Gnrh1* não apresenta padrão de expressão dependente de concentração sérica de IGF-1 no dia da abertura vaginal.

Atualmente, há grande interesse no estudo do sistema kisspeptina, composto pelo neuropeptídeo KiSS-1 e seu receptor KiSS1R, que é reconhecido como um

elemento indispensável para ativação dos neurônios que secretam GnRH e a deflagração do processo puberal em fêmeas (KIRILOV *et al.*, 2013; NAVARRO *et al.*, 2004; SEMINARA *et al.*, 2003). Dessa forma, o presente estudo procurou identificar modulações do sistema kisspeptina pelo estado metabólico no início do processo puberal em fêmeas. Embora os animais com Dieta de Cafeteria tenham apresentado uma alteração do estado metabólico, esse efeito não resultou em modificações do padrão de expressão de *Kiss1* mRNA e de *Kiss1r* mRNA no dia da abertura vaginal, além de não haver correlação positiva da expressão de *Kiss1* mRNA e de *Kiss1r* com a instalação da puberdade. Esses dados confirmam resultados prévios de outros grupos de pesquisa que demonstraram não haver modulação do estado metabólico sobre o sistema kisspeptina no dia da instalação da puberdade (LIE; OVERGAARD; MIKKELSEN, 2013; SMITH; SPENCER, 2012). Contudo, outros trabalhos demonstram que o estado de nutrição exerce efeitos importantes sobre a expressão gênica dos componentes do sistema kisspeptina. Em condições de restrição alimentar, fêmeas de rato Wistar possuem diminuição da expressão de *Kiss1* mRNA e atraso na abertura vaginal, enquanto que fêmeas mantidas em condições com disponibilidade aumentada de alimento possuem elevação da expressão de *Kiss1* mRNA no período peripuberal e adiantamento da abertura vaginal (CASTELLANO *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento com *high fat diet* aumenta a expressão de *Kiss1* mRNA no período anterior à instalação da puberdade (LI *et al.*, 2012). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que as modificações necessárias para a maturação já foram atingidas nas condições experimentais utilizadas e indicam que a análise de expressão realizada ao longo do período peripuberal poderia ser mais precisa para identificar mudanças no sistema kisspeptina. Por outro lado, a expressão de *Kiss1* mRNA foi associada com a expressão de *Gnrh1* mRNA em condições controle, sugerindo que a modulação dos neurônios que secretam GnRH pela kisspeptina possa ter influenciado a abertura vaginal.

A leptina é um fator periférico que sinaliza o estado metabólico do organismo e parece modular do sistema kisspeptidérgico. Contudo, o presente estudo, não evidenciou associação entre a concentração sérica de leptina e a expressão de *Kiss1* mRNA e *Kiss1r* mRNA no dia da abertura vaginal em ambas as condições experimentais, sugerindo que a leptina não atua como um fator determinante sobre o

sistema kisspeptidérgico no dia da abertura vaginal. Embora evidências sugiram que a leptina estimula a expressão de *Kiss1* mRNA em modelos de deficiência de leptina (SMITH *et al.*, 2006), a inativação seletiva da expressão de receptores Ob-Rb de leptina em neurônios que secretam kisspeptina não retarda a abertura vaginal e não causa prejuízo à fertilidade (DONATO *et al.*, 2011), indicando que embora a leptina seja importante para a maturação sexual em fêmeas, sua ação seja mediada pela ligação em receptores em outros grupos neuronais além dos neurônios que secretam kisspeptina. Além da leptina, o IGF-1 periférico parece ser um importante regulador do sistema kisspeptina. Contudo, o presente estudo não evidenciou associação entre a concentração de IGF-1 e a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* mRNA nas condições experimentais utilizadas. Alguns estudos demonstram que o IGF-1 administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.) ou por via intraperitoneal no período juvenil em fêmeas de rato estimula a expressão de *Kiss1* mRNA em amostras contendo a área periventricular anteroventral (AVPV) e núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (HINEY *et al.*, 2009). Embora seja um modulador da atividade do sistema kisspeptidérgico, o IGF-1 não parece ser um determinante da expressão de *Kiss1* mRNA no dia da instalação da puberdade. Da mesma forma, o E2 parece ser um regulador positivo do sistema kisspeptina em condições fisiológicas para o curso da maturação sexual (CLARKSON *et al.*, 2009). Porém, os dados observados nos animais no presente estudo não demonstraram uma associação entre a concentração de E2 e a expressão de *Kiss1* mRNA e *Kiss1r* mRNA no dia da abertura vaginal. O E2 exerce efeito positivo sobre a expressão do peptídeo KiSS1 na região AVPV, sendo que esse efeito não é observado no núcleo arqueado (CLARKSON *et al.*, 2009). No presente estudo, a expressão de *Kiss1* mRNA foi analisada em amostra contendo a região AVPV e o núcleo arqueado, impedindo uma análise acurada da ação do E2 em diferentes populações de neurônios que secretam kisspeptina. Assim, uma análise da expressão em amostras de regiões específicas seria mais precisa em relação ao método utilizado no presente estudo. Essa proposição é reforçada pelo aumento da expressão de *Kiss1* mRNA no núcleo arqueado do hipotálamo no dia 28 pós-natal e na área pré-óptica medial no dia 32 pós-natal em animais com acesso à *high-fat diet* (LI *et al.*, 2012). Embora o estudo anterior não tenha identificado diferença em relação à expressão de *Kiss1r* mRNA (LI *et al.*, 2012) nos dias anteriores à abertura vaginal, a realização de um experimento com animais submetidos à dieta de Cafeteria para o estudo da

expressão dos genes *Kiss1* e *Kiss1r* em dias anteriores à abertura vaginal adicionaria informações importantes sobre a evolução da expressão dos genes que compõem o sistema kisspeptina.

8 CONCLUSÃO

A exposição precoce a uma alimentação industrializada e de alta palatabilidade alterou o padrão de ingestão alimentar resultando em elevada ingestão de lipídeos e energia, o que foi acompanhado de adiantamento do processo de maturação sexual e instalação da puberdade. Essa alteração do padrão de ingestão foi acompanhada por obesidade intra-abdominal e aumento de leptina. Aparentemente, a leptina foi um importante sinalizador das reservas de energia para os reguladores centrais da instalação da puberdade. Em condições controle, a leptina parece exercer efeito permissivo sobre o curso do processo puberal, enquanto no estado de aumento de reservas de energia, observado com o tratamento com Dieta de Cafeteria, a leptina parece atuar como fator determinante para o curso da puberdade. Contudo, os componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gônada não foram modulados pela estado metabólico no dia da abertura vaginal. Além disso, o IGF-1 de origem periférica também não foi modulado pelo estado metabólico nas condições estudadas. A expressão de genes-chave envolvidos com a deflagração da puberdade como o *Gnrh1*, *Kiss1* e *Kiss1r* não foram afetada pelo estado nutricional no presente estudo e, aparentemente, não sofreram modulações de componentes do estado metabólico como a leptina e o IGF-1. Futuros experimentos serão necessários para determinar a influência dos lipídeos da dieta e da leptina secretada pelo tecido adiposo intra-abdominal sobre a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e sistema kisspeptina durante o período peripuberal e o início da puberdade em animais tratados com Dieta de Cafeteria.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, Rexford S. *et al.* Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **Journal of Clinical Investigation** v. 99, n. 3, p. 391–395 , 1997.0021-9738.
- AIRES, Margarida de Melo. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1336 p. .
- AKSGLAEDE, Lise *et al.* Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. **Pediatrics** v. 123, n. 5, p. e932–e939 , 2009.1098-4275 (Electronic)r0031-4005 (Linking).
- ARCHER, Zoe A.; RAYNER, D. Vernon; MERCER, Julian G. Hypothalamic Gene Expression Is Altered in Underweight but Obese Juvenile Male Sprague-Dawley Rats Fed a High-Energy Diet. **J. Nutr.** v. 134, n. 6, p. 1369–1374 , 1 jun. 2004. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/134/6/1369.long>>. Acesso em: 3 maio 2015.
- BADOURAKI, Maria *et al.* Sonographic assessment of uterine and ovarian development in normal girls aged 1 to 12 years. **Journal of clinical ultrasound : JCU** v. 36, n. 9, p. 539–44 , jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18726968>>. Acesso em: 9 maio 2015.
- BARASH, I A *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology** v. 137, n. 7, p. 3144–7 , jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770941>>. Acesso em: 9 abr. 2015.
- BOUKOUVALAS, G. *et al.* Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. **Neuroscience** v. 153, n. 2, p. 373–382 , 2008.1873-7544 (Electronic)r0306-4522 (Linking).
- BURCELIN, Rémy *et al.* Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: Stimulation by insulin and potentiation by leptin. **Endocrinology** v. 144, n. 10, p. 4484–4491 , 2003.0013-7227.
- CARATY, Alain; FRANCESCHINI, Isabelle. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene** v. 43 Suppl 2, p. 172–8 , jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638120>>. Acesso em: 4 maio 2015.
- CASANUEVA, Felipe F.; DIEGUEZ, Carlos. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. **Frontiers in neuroendocrinology** v. 20, n. 4, p. 317–63 , out. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569281>>. Acesso em: 4 maio 2015.
- CASTELLANO, Juan M. *et al.* KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: Physiologic roles and putative physiopathological implications. **Peptides** v. 30, n. 1, p. 139–145 , jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634841>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

CASTELLANO, Juan M. *et al.* Early metabolic programming of puberty onset: Impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. **Endocrinology** v. 152, n. 9, p. 3396–3408 , 2011.1945-7170 (Electronic)r0013-7227 (Linking).

CASTELLANO, Juan M. *et al.* Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. **Diabetes** v. 55, n. 9, p. 2602–2610 , 2006.0012-1797 (Print).

CASTELLANO, Juan M. *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. **Endocrinology** v. 146, n. 9, p. 3917–3925 , set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932928>>. Acesso em: 9 abr. 2015.0013-7227 (Print)r0013-7227 (Linking).

CHEHAB, Farid F. *et al.* Early Onset of Reproductive Function in Normal Female Mice Treated with Leptin. **Science** v. 275, n. 5296, p. 88–90 , 1997.

CHEUNG, Clement C. *et al.* Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology** v. 138, n. 2, p. 855–858 , 1997.0013-7227 (Print).

CLARKSON, Jenny *et al.* Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. **Endocrinology** v. 150, n. 7, p. 3214–3220 , 2009.1945-7170 (Electronic).

CLARKSON, Jenny; HERBISON, Allan E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology** v. 147, n. 12, p. 5817–5825 , 2006.0013-7227 (Print)n0013-7227 (Linking).

CRAVO, Roberta M. *et al.* Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. **Neuroscience** v. 173, p. 37–56 , 26 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210015137>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

CUNNINGHAM, Matthew J.; CLIFTON, Donald K.; STEINER, Robert A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of reproduction** v. 60, n. 2, p. 216–222 , 1999.0006-3363 (Print)r0006-3363 (Linking).

DAFTARY, Shabrine S.; GORE, Andrea C. Developmental changes in hypothalamic insulin-like growth factor-1: Relationship to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology** v. 144, n. 5, p. 2034–2045 , 2003.

DAVID J. HANDELSMAN *et al.* Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. **Endocrinology** v. 120, n. 2, p. 491–6 , fev. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542504>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

DE ROUX, Nicolas *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America v. 100, n. 19, p. 10972–10976 , 2003.0027-8424 (Print).

DECAVEL, C; VAN DEN POL, A N. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **The Journal of comparative neurology** v. 302, n. 4, p. 1019–37 , 22 dez. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081813>>. Acesso em: 17 maio 2015.

DIVALL, Sara A *et al.* Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. **The Journal of clinical investigation** v. 120, n. 8, p. 2900–9 , 2 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/41069>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

DONATO, Jose *et al.* Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **Journal of Clinical Investigation** v. 121, n. 1, p. 355–368 , 2011.1558-8238 (Electronic)n0021-9738 (Linking).

ELMQUIST, Joel K. *et al.* Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **The Journal of comparative neurology** v. 395, n. 4, p. 535–47 , 15 jun. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619505>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

EULING, Susan Y *et al.* Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. **Pediatrics** v. 121 Suppl, p. S172–91 , fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245511>>. Acesso em: 8 abr. 2015.

FEI, HONG *et al.* Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 94, n. 13, p. 7001–5 , 24 jun. 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 abr. 2015.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, R *et al.* Effects of polypeptide YY(3-36) upon luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropin secretion in prepubertal rats: in vivo and in vitro studies. **Endocrinology** v. 146, n. 3, p. 1403–10 , mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564330>>. Acesso em: 4 maio 2015.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, Ricardo *et al.* Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. **Molecular and cellular endocrinology** v. 254-255, p. 127–32 , 25 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720706002310>>. Acesso em: 26 mar. 2015.

FRISCH, R E; HEGSTED, D M; YOSHINAGA, K. Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body water, protein, and fat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 74, n. 1, p. 379–383 , 1977.

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

FUNES, Sandrine *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 312, n. 4, p. 1357–1363 , 2003.0006-291X (Print)r0006-291X (Linking).

GARCÍA-GALIANO, David *et al.* The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** v. 30, n. 23, p. 7783–92 , 9 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/30/23/7783.long>>. Acesso em: 30 abr. 2015.

GASSER, Thomas *et al.* A method for determining the dynamics and intensity of average growth. **Annals of human biology** v. 17, n. 6, p. 459–74 , jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2281938>>. Acesso em: 9 maio 2015.

GOLUB, Mari S *et al.* Public health implications of altered puberty timing. **Pediatrics** v. 121 Suppl , p. S218–30 , fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245514>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

GORE, Andrea C. Diurnal rhythmicity of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat. **Neuroendocrinology** v. 68, n. 4, p. 257–63 , out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9772340>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

GOULARTE, Jéferson F; FERREIRA, Maria B C; SANVITTO, Gilberto L. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. **The British journal of nutrition** v. 108, n. 8, p. 1511–8 , 28 out. 2012. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0007114511006933>. Acesso em: 14 abr. 2015.

GRUMBACH, Melvin M. The neuroendocrinology of human puberty revisited. **Hormone Research** v. 57, n. SUPPL. 2, p. 2–14 , 2002.0301-0163 (Print)r0301-0163 (Linking).

HAN, Seong-Kyu *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** v. 25, n. 49, p. 11349–11356 , 2005.1529-2401 (Electronic).

HERMAN-GIDDENS, Marcia E. *et al.* Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. **Pediatrics** v. 99, n. 4, p. 505–512 , 1997.1098-4275 (Electronic)r0031-4005 (Linking).

HERTER, Liliane Diefenthaler *et al.* Ovarian and uterine sonography in healthy girls between 1 and 13 years old: correlation of findings with age and pubertal status. **AJR. American journal of roentgenology** v. 178, n. 6, p. 1531–6 , 23 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ajronline.org/doi/abs/10.2214/ajr.178.6.1781531>>. Acesso em: 9 maio 2015.

HINEY, J K *et al.* Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. **Endocrinology** v. 137, n. 9, p. 3717–28 , set. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756538>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

HINEY, Jill K. *et al.* Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. **Endocrinology** v. 150, n. 1, p. 376–384 , 2009.

HINEY, Jill K.; SRIVASTAVA, Vinod K.; LES DEES, William. Insulin-like growth factor-1 stimulation of hypothalamic KiSS-1 gene expression is mediated by Akt: Effect of alcohol. **Neuroscience** v. 166, n. 2, p. 625–632 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.030>>.1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking).

IRWIG, Michael S. *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology** v. 80, n. 4, p. 264–272 , 2004.0028-3835 (Print).

IWASA, T *et al.* Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. **The Journal of physiology** v. 588, n. Pt 5, p. 821–829 , 2010.0022-3751.

JEAN-PIERRE BOURGUIGNON *et al.* Maturation of the hypothalamic control of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion at onset of puberty. I. Increased activation of N-methyl-D-aspartate receptors. **Endocrinology** v. 127, n. 2, p. 873–81 , ago. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164923>>. Acesso em: 17 maio 2015.

KAUFFMAN, Alexander S.; CLIFTON, Donald K.; STEINER, Robert a. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. **Trends in Neurosciences** v. 30, n. 10, p. 504–511 , 2007.0166-2236 (Print).

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

KIRILOV, Milen *et al.* Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. **Nature communications** v. 4, p. 2492 , jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051579>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

KNOX, A. M I *et al.* Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters hypothalamic kiss1 and kiss1r mRNA expression in the female rat. **Journal of Neuroendocrinology** v. 21, n. 8, p. 683–689 , 2009.1365-2826 (Electronic)n0953-8194 (Linking).

KUMAR, Sushil; KAUR, Gurcharan. Intermittent fasting dietary restriction regimen negatively influences reproduction in young rats: a study of hypothalamo-hypophysial-gonadal axis. **PloS one** v. 8, n. 1, p. e52416 , 29 jan. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052416>>. Acesso em: 30 abr. 2015.

LEIBOWITZ, Sarah F *et al.* Puberty onset in female rats: relationship with fat intake, ovarian steroids and the peptides, galanin and enkephalin, in the paraventricular and medial preoptic nuclei. **Journal of neuroendocrinology** v. 21, n. 6, p. 538–49 , jun. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2782789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 maio 2015.

LI, Xiao Feng *et al.* High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats. **Endocrinology** v. 153, n. 9, p. 4422–4431 , 2012.1945-7170 (Electronic)r0013-7227 (Linking).

LIE, Maria E K; OVERGAARD, Agnete; MIKKELSEN, Jens D. Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats. **Reproductive Biology** v. 13, n. 4, p. 298–308 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2013.08.001>>.

LIU, Z-J *et al.* Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme** v. 39, n. 7, p. 489–94 , jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611900>>. Acesso em: 2 maio 2015.

LÓPEZ, M *et al.* Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. **International journal of obesity (2005)** v. 31, n. 2, p. 371–7 , fev. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801924>>. Acesso em: 2 maio 2015.

MAFFEI, M *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature medicine** v. 1, n. 11, p. 1155–61 , nov. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584987>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

MAH, Amanda T *et al.* Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells: hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires insulin/IGF1. **Endocrinology** v. 155, n. 9, p. 3302–14 , set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914941>>. Acesso em: 2 maio 2015.

MARK E. WILSON. Premature elevation in serum insulin-like growth factor-I advances first ovulation in rhesus monkeys. **The Journal of endocrinology** v. 158,

n. 2, p. 247–57 , ago. 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771469>>. Acesso em: 4 maio 2015.

MASUZAKI, H *et al.* Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. **Diabetes** v. 44, n. 7, p. 855–8 , jul. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789654>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

MATSUI, Hisanori *et al.* Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. **Biochemical and biophysical research communications** v. 320, n. 2, p. 383–8 , 23 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219839>>. Acesso em: 4 maio 2015.

MUCELLINI, Amanda Brondani *et al.* Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. **The British journal of nutrition** v. 111, n. 8, p. 1499–506 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330855>>.

NAVARRO, V M *et al.* Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. **The Journal of physiology** v. 561, n. Pt 2, p. 379–386 , 2004.0022-3751.

NAVARRO, V. M. *et al.* 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** v. 145, n. 10, p. 4565–4574 , 2004.0013-7227 (Print).

OGDEN, Cynthia L *et al.* Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. **JAMA : the journal of the American Medical Association** v. 307, n. 5, p. 483–90 , 1 fev. 2012. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=1104932#RESULTS>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

OJEDA, S R *et al.* Activation of estradiol-positive feedback at puberty: estradiol sensitizes the LHRH-releasing system at two different biochemical steps. **Neuroendocrinology** v. 43, n. 2, p. 259–65 , jan. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3523279>>. Acesso em: 17 maio 2015.

OJEDA, S R *et al.* Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrine reviews** v. 1, n. 3, p. 228–57 , jan. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6112144>>. Acesso em: 17 maio 2015.

OJEDA, Sergio R *et al.* Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? **Endocrinology** v. 147, n. 3, p. 1166–74 , 1 mar. 2006. Disponível em: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2005-1136?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 30 abr. 2015.

OJEDA, Sergio R; SKINNER, Michael K. Puberty in the rat. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction** p. 2061–2126 , 2006.9780125154000.

OJEDA, Sergio R. *et al.* The onset of puberty in the female rat: changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), and hypothalamic LHRH content. **Endocrinology** v. 98, n. 3, p. 630–8 , mar. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/770154>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

ONG, Z Y; MUHLHAUSLER, B S. Consuming a low-fat diet from weaning to adulthood reverses the programming of food preferences in male, but not in female, offspring of “junk food”-fed rat dams. **Acta physiologica (Oxford, England)** v. 210, n. 1, p. 127–41 , jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746329>>. Acesso em: 1 maio 2015.

OŠT’ÁDALOVÁ, I; BABICKÝ, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca** v. 61 Suppl 1, p. S1–7 , jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827866>>. Acesso em: 9 maio 2015.

PAGE, Kathleen C *et al.* Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology** v. 297, n. 4, p. R1049–57 , out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657097>>. Acesso em: 2 maio 2015.

PATTERSON, Christa M *et al.* Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin receptor-expressing cells. **Brain research** v. 1378, p. 18–28 , 10 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899311000217>>. Acesso em: 2 maio 2015.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The rat brain in Stereotaxic Coordinates**. 6th. ed. [S.l.]: Academic Press-Elsevier, 2007. .

PIELECKA-FORTUNA, Justyna; CHU, Zhiguo; MOENTER, Suzanne M. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. **Endocrinology** v. 149, n. 4, p. 1979–86 , abr. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2276721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

PIGNATELLI, Duarte *et al.* Adrenarche in the rat. **Journal of Endocrinology** v. 191, n. 1, p. 301–308 , 2006.

QUENNELL, Janette H. *et al.* Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. **Endocrinology** v. 152, n. 4, p. 1541–1550 , 2011.1945-7170 (Electronic)n0013-7227 (Linking).

QUENNELL, Janette H. *et al.* Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. **Endocrinology** v. 150, n. 6, p. 2805–2812 , 2009.1945-7170 (Electronic)n0013-7227 (Linking).

RAMALEY, J A. Puberty onset in males and females fed a high fat diet. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)** v. 166, n. 2, p. 294–6 , fev. 1981.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7208488>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

RAMIREZ, V. DOMINGO; SAWYER, CHARLES H. ADVANCEMENT OF PUBERTY IN THE FEMALE RAT BY ESTROGEN. **Endocrinology** v. 76, p. 1158–68 , jun.

1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14301523>>. Acesso em: 4 maio 2015.

REITER, EDWARD O. *et al.* A role for endogenous estrogen in normal ovarian development in the neonatal rat. **Endocrinology** v. 91, n. 6, p. 1537 – 9 , dez. 1972. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-91-6-1537>>.

ROA, Juan *et al.* Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. **Molecular and cellular endocrinology** v. 324, n. 1-2, p. 87–94 , 5 ago. 2010.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720709006376>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

ROA, Juan *et al.* New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontiers in Neuroendocrinology** v. 29, n. 1, p. 48–69 , jan. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17870152>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

ROBERTS, C A *et al.* Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-1 concentrations in sheep. **Domestic animal endocrinology** v. 7, n. 4, p. 457–63 , out. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2261758>>. Acesso em: 4 maio 2015.

ROGOL, Alan D. Growth, body composition and hormonal axes in children and adolescents. **Journal of endocrinological investigation** v. 26, n. 9, p. 855–60 , set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964438>>. Acesso em: 9 maio 2015.

ROSENFELD, Robert L; LIPTON, Rebecca B; DRUM, Melinda L. Thelarche, pubarche, and menarche attainment in children with normal and elevated body mass index. **Pediatrics** v. 123, n. 1, p. 84–88 , 2009.0031-4005.

SAGAE, S C *et al.* Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. **Physiology & behavior** v. 119, p. 1–8 , 2 jul. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727535>>. Acesso em: 1 maio 2015.

SAGAE, Sara Cristina. **Obesidade e reprodução em fêmeas : modulação pela angiotensina II**. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014, 2010. 167 p.

SÁNCHEZ-GARRIDO, Miguel Angel *et al.* Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. **Endocrinology** v. 154, n. 9, p. 3387–400 , set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751873>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

SCHERER, Philipp E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes** v. 55, n. 6, p. 1537–45 , 1 jun. 2006. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/6/1537.abstract>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

SEMINARA, Stephanie B *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England journal of medicine** v. 349, n. 17, p. 1614–1627 , 2003.1533-4406 (Electronic).

SHAHAB, Muhammad *et al.* Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 102, n. 6, p. 2129–2134 , 2005.0027-8424 (Print)r0027-8424 (Linking).

SISK, C L *et al.* In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. **Endocrinology** v. 142, n. 7, p. 2929–36 , jul. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416013>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

SISK, Cheryl L.; FOSTER, Douglas L. The neural basis of puberty and adolescence. **Nature neuroscience** v. 7, n. 10, p. 1040–1047 , 2004.1097-6256 (Print)n1097-6256 (Linking).

SMITH, Jeremy T. *et al.* KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. **Journal of Neuroendocrinology** v. 18, n. 4, p. 298–303 , 2006.0953-8194 (Print) 0953-8194 (Linking).

SMITH, Jeremy T.; SPENCER, Sarah J. Prewaning Over- and Underfeeding Alters Onset of Puberty in the Rat Without Affecting Kisspeptin. **Biology of Reproduction** v. 86, n. 5, p. 145–145 , 2012.1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking).

SMITH, Jeremy T.; WADDELL, Brendan J. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. **Journal of Endocrinology** v. 176, n. 3, p. 313–319 , 1 mar. 2003. Disponível em: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/176/3/313.abstract?ijkey=62e46b515e324483079efb70208708bb83f80196&keytype2=tf_ipsecsha>. Acesso em: 23 abr. 2015.

STYNE, Dennis M.; GRUMBACH, Melvin M. Puberty : Ontogeny, Neuroendocrinology, Physiology, and Disorders. In: MELMED, Shlomo *et al.* (Orgs.). **Williams Textbook of Endocrinology**. 12. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2012. p. 1054–1201.

TANNER, James Mourilyan. **Growth at Adolescence**. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1962. .

TENA-SEMPERE, M; BARREIRO, M L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and cellular endocrinology** v. 188, n. 1-2, p. 9–13 , 25 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911940>>. Acesso em: 4 maio 2015.

TENA-SEMPERE, Manuel. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. **Neuroendocrinology** v. 86, n. 3, p. 229–241 , 2007.

TERASAWA, Ei *et al.* Body weight impact on puberty: Effects of high-calorie diet on puberty onset in female rhesus monkeys. **Endocrinology** v. 153, n. 4, p. 1696–1705 , 2012.

URBANSKI, Henryk F; OJEDA, Sergio R. Activation of luteinizing hormone-releasing hormone release advances the onset of female puberty. **Neuroendocrinology** v. 46, n. 3, p. 273–6 , set. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3309706>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

URBANSKI, Henryk F; OJEDA, Sergio R. In vitro simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17 beta-estradiol secretion from immature rat ovaries. **Endocrinology** v. 117, n. 2, p. 638–43 , ago. 1985a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4017952>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

URBANSKI, Henryk F; OJEDA, Sergio R. The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. **Endocrinology** v. 117, n. 2, p. 644–9 , ago. 1985b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4040460>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

VELDHUIS, Johannes D *et al.* Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. **Endocrine reviews** v. 26, n. 1, p. 114–46 , 1 fev. 2005. Disponível em: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/er.2003-0038?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 9 maio 2015.

WADA, Nobuhiro *et al.* Leptin and its receptors. **Journal of chemical neuroanatomy** v. 61-62, p. 191–9 , nov. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061814000878>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

WAHAB, Fazal *et al.* Decrease in hypothalamic Kiss1 and Kiss1r expression: a potential mechanism for fasting-induced suppression of the HPG axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme** v. 43, n. 2, p. 81–5 , fev. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4119764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 abr. 2015.

XU, Ren-ying *et al.* The effects of high fat on central appetite genes in Wistar rats: a microarray analysis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical**

chemistry v. 397, n. 1-2, p. 96–100 , nov. 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721800>>. Acesso em: 2 maio 2015.

ANEXO - ARTIGO SUBMETIDO

18/05/2015

ScholarOne Manuscripts

Journal of Endocrinology

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Endocrinology*.

Manuscript ID: JOE-15-0218

Title: EFFECT OF CAFETERIA DIET ON PERIPHERAL AND CENTRAL FACTORS INVOLVED IN PUBERTY ONSET IN FEMALES RATS

Authors: Goularte, Jéferson
de Araújo da Cunha, Ana Carla
Caceres, Rafael
Pardo, Grace
Mucellini, Amanda
Brum, Ilma
Sanvitto, Gilberto

Date Submitted: 18-May-2015



Print



Return to Dashboard

1 EFFECT OF CAFETERIA DIET ON PERIPHERAL AND CENTRAL FACTORS
2 INVOLVED IN PUBERTY ONSET IN FEMALES RATS

3 Jéferson Ferraz Goularte^{1,*}, Ana Carla de Araújo da Cunha², Rafael Corrêa
4 Caceres², Amanda Brondani Mucellini², Grace Violeta Espinoza Pardo¹, Ilma Simoni
5 Brum¹, Gilberto Luiz Sanvitto¹.

6 ¹ Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of
7 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

8 ² Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio
9 Grande do Sul, Brazil.

10 * Correspondence to: Jéferson Ferraz Goularte, Department of Physiology, Institute
11 of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 500 Sarmento
12 Leite Street, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

13 Short title: Obesity, Leptin and puberty onset

14 Key words: Cafeteria Diet; Food intake; Puberty onset; Adipose tissue; Leptin; Lepr
15 mRNA; Kiss1 mRNA; Kiss1r mRNA; GnRh mRNA; Female rat;

16 Word count:

17

18 **Abstract**

19 Puberty starts with the activation of gonadotrophin-releasing hormone neurons.
20 Nutritional status regulates sexual maturation, and studies in humans and animals
21 have supported the notion that obesity can advance puberty onset. Leptin released
22 by adipose tissue signals the body energy storages to brain areas involved in
23 reproduction through Ob-Rb receptor. The Leptin influence on puberty onset is
24 believed to be mediated by action on GnRH neurons and kisspetin system. Thus, the
25 study analyzed the influence of Cafeteria Diet on food intake and development of
26 obesity on puberty onset in female rats. Indeed, the study sought to analyze the
27 modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and kisseptin system by
28 obesity. The results have shown higher energy and fat intake and early vaginal
29 opening in Cafeteria Diet group. The ovarian weight was increased by the Cafeteria
30 Diet, although the weight of the uterus and adrenals and serum LH e E2 have not
31 changed. Cafeteria Diet rats demonstrated lower body weight, but increased intra-
32 abdominal adipose tissue and high Leptin levels and *Lepr* mRNA expression.
33 However, there was no correlation between Leptin and *Lepr* mRNA expression.
34 Cafeteria Diet has not changed the expression of *Gnrh1*, *Kiss1* and *Kiss1r* mRNA.
35 The results suggest that early access to processed foods can change the
36 physiological pattern of food intake and stimulate the development of obesity and the
37 release of Leptin. Therefore, Leptin from intra-abdominal adipose tissue could be a
38 permissive factor for puberty onset under obesity conditions, but not modulate
39 hypothalamic-hypophysis-gonadal axis on the day of vaginal opening.

40

41

42 Introduction

43 Puberty is a period of transition from childhood to adulthood in which fertility is
44 achieved and the end point of this transition is the reproductive capacity (Grumbach
45 2002). In girls, early sexual maturation signs are the appearance of pubic hair under
46 the regulation of adrenal androgens, breast development and menarche, both
47 regulated by the action of Estradiol-17beta (E2). In the female rat, the vaginal
48 opening signals a progression of sexual maturation and the beginning of puberty
49 (Ojeda & Skinner 2006).

50 The control of sexual maturation is coordinated by the activation/reactivation of
51 neurons that secrete Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). Activation of GnRH
52 neurons stimulates the synthesis and release of pituitary hormones Luteinizing
53 Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH), which exerts a stimulating
54 action on the ovary for production of gametes and (E2) (Sisk & Foster 2004; Ojeda &
55 Skinner 2006). The increased pulsatile release of GnRH at the end of the
56 peripubertal period modulates the release of LH required for maturation of ovarian
57 follicles and overproduction of E2, resulting in increased release of LH and the first
58 ovulation (Amstalden *et al.* 2011).

59 The pattern of GnRH release observed at the beginning of puberty appears to be the
60 result of the predominance of excitatory input over inhibitory stimuli on GnRH
61 neurons (Sisk & Foster 2004). A system that has emerged in recent years as a
62 regulatory element essential for the trigger for the onset of puberty was the
63 neurotransmitter Kisspeptin (KISS1) (Navarro *et al.* 2004a, b) and its receptor GPR54
64 (KISS1R) (Seminara *et al.* 2003). This was demonstrated by experiments that
65 identified the projections of KISS1 neurons to GnRH neurons and activation of GnRH

66 neurons (Han *et al.* 2005; Kauffman *et al.* 2007; Caraty & Franceschini 2008). In
67 addition, much of the population of GnRH neurons express KISS1R mRNA and are
68 intensely activated by KISS1, stimulating the release of GnRH (Irwig *et al.* 2004;
69 Matsui *et al.* 2004; Han *et al.* 2005). The importance of KISS1 signaling on GnRH
70 neurons becomes evident from recent experiments showing that the onset of puberty
71 and fertility in females is the result of KISS1 signaling on KISS1R located in GnRH
72 neurons (Kirilov *et al.* 2013) .

73 Nutritional status is an important regulator of reproductive function and sexual
74 maturation. Food restriction conditions in neonatal (Castellano *et al.* 2011) and
75 peripubertal period (Sánchez-Garrido *et al.* 2013) delay the onset of puberty in
76 female rats and reduce serum LH (Castellano *et al.* 2005; García-Galiano *et al.* 2010)
77 and E2 (Castellano *et al.* 2005). In addition, females have advanced vaginal opening
78 when subjected to experimental conditions with increased availability of food in
79 postnatal period (Smith & Spencer 2012). Some evidences suggest that lipid intake
80 in peripubertal period may act on orexigenic peptides system and steroids to regulate
81 puberty onset in female rats (Leibowitz *et al.* 2009). Furthermore, the nutritional
82 status also influences the Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1) levels, which is an
83 important mediator of bone and muscle growth (Veldhuis *et al.* 2005) and sexual
84 maturation. State of nutritional deficit reduces the concentration of IGF1 (Keogh *et al.*
85 2015), while the high energy diet during the peripubertal period increases the
86 concentration of IGF1 in rhesus monkey (Terasawa *et al.* 2012). Indeed, circulating
87 IGF1 undergo a marked increase during sexual maturation, and the increase in IGF1
88 levels is greater when animals are subjected to a high energy diet (Terasawa *et al.*
89 2012).

90 Some evidences suggest an early onset of puberty in girls (Herman-Giddens *et al.*
91 1997; Euling *et al.* 2008). This early onset has been associated with obesity
92 (Rosenfield *et al.* 2009), condition which is present in a number of girls in prepubertal
93 age (Ogden *et al.* 2012). Obesity appears to be the result of changes in energy
94 homeostasis with increase in energy intake and a reduction in energy expenditure
95 (Denis *et al.* 2014). Some evidence shows that rats with free access to Cafeteria Diet
96 model, which consists of food commonly consumed by humans and with high energy
97 density, have high adipose tissue in peripubertal period (Sagae *et al.* 2013). Although
98 there is disagreement on that, animals subjected to high fat diet have shown
99 advanced vaginal opening (Boukouvelas *et al.* 2008; Li *et al.* 2012) and increased
100 body fat percentage (Frisch *et al.* 1977), suggesting that the adipose tissue can be a
101 mediator of metabolic state on reproductive function and puberty onset.

102 The adipose tissue is an endocrine organ that synthesizes and releases proteins
103 known as adipokines and cytokines, which perform actions on different biological
104 systems and are important regulators of energy metabolism and inflammation
105 (Scherer 2006). The hormone Leptin is expressed in adipose tissue (Masuzaki *et al.*
106 1995) and it is present in the circulation in proportion to the amounts of adipose
107 tissue (Maffei *et al.* 1995). Leptin exerts important effects on the regulation of food
108 intake by signaling the state of energy reserves in the body (Takahashi & Cone 2005)
109 through Ob-Rb receptors, which are located in high levels in the hypothalamus
110 (Elmqvist *et al.* 1998; Patterson *et al.* 2011), exerting important actions on the
111 regulation of energy homeostasis and reproduction. Leptin is an essential factor for
112 reproduction in females, as demonstrated in mice with genetic mutation that inhibits
113 the expression of the *ob/ob* gene which encodes Leptin where there is impairment of
114 sexual maturation and permanent infertility (Barash *et al.* 1996). Pharmacological

115 studies demonstrate that intraperitoneal injection of Leptin advances vaginal opening
116 (Ahima *et al.* 1997) and maturation of the uterus, ovaries and oviducts (Chehab *et al.*
117 1997). However, evidence suggests that Leptin under physiological conditions is a
118 permissive factor for sexual maturation rather than being the triggering for the onset
119 of puberty (Cheung *et al.* 1997), even though its association in early puberty onset
120 and obesity demands further investigation.

121 Leptin and IGF1 exert regulatory actions on key components of sexual maturation
122 and puberty onset. Initially, it was thought that Leptin action was exerted directly on
123 GnRH neurons (Cunningham *et al.* 1999). However, recent experiments suggest that
124 GnRH neurons do not express Leptin receptors, indicating that its effect on sexual
125 maturation is carried out by indirect signaling on GnRH neurons (Quennell *et al.*
126 2009). Some evidence suggests that Leptin stimulates the expression of *Kiss1*
127 mRNA in animal models of Leptin deficiency (Smith *et al.* 2006). However, it appears
128 that the signaling on the KiSS1 neurons for the installation of puberty is not critical in
129 physiological state (Donato *et al.* 2011), although this has not been clearly
130 demonstrated in obesity conditions. The peripheral IGF1 seems to stimulate GnRH
131 neurons during early puberty, as selective inhibition of IGF1 receptor (IGF1R)
132 expression in GnRH neurons delays the vaginal opening (Divall *et al.* 2010).
133 Moreover, intracerebroventricular injection on IGF1 in peripubertal period increases
134 in the expression of mRNA in *Kiss1* AVPV and ARC, suggesting its participation in
135 sexual maturation process (Hiney *et al.* 2010).

136 Thus, this study aimed to evaluate the consequences of Cafeteria Diet model on
137 nutrients the intake and its consequences to the development of obesity and puberty
138 onset in female rats. Indeed, the study evaluate the modulation of on peripheral and
139 to central factors involved in puberty onset by nutritional status.

140 **Materials and methods**

141 **Animals and diets**

142 Female Wistar rats (weaned at age of 21 days) were provided by the Centro de
143 Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) of the Federal
144 University of Rio Grande do Sul (UFRGS). All animals were raised in standard litter of
145 equal proportion of males and females. At age of 21 days, the animals were
146 randomly assigned to Control group (n= 20) and Cafeteria Diet group (n= 20) and
147 weighted. Body weight at baseline was similar between groups (Control: $52.85 \pm$
148 0.78 , n= 20; Cafeteria Diet: 52.53 ± 0.90 , n= 20; Student's t test, $P > 0.05$). All animals
149 were housed in plastic cages (four rats/cage) in a 12h light–dark cycle at 24–26° C.
150 The Control group had *ad libitum* access to standard chow (Nuvilab CR-1, NUVITAL,
151 Brazil) and water, while Cafeteria Diet group had *ad libitum* access to chow and
152 water alongside a random selection of highly energetic and palatable human foods
153 (Sclafani & Springer 1976; Goularte *et al.* 2012). The foods included in the cafeteria
154 diet are described in **Tab. 1**. Foods were provided in excess to the rats according
155 food scheme A, B and C (**Tab. 1**) and changed daily to avoid receive the same food
156 scheme every day. The food intake in Control group and individual food intake in the
157 Cafeteria Diet group was weighted between 09.00 and 10.00 hours daily. The data of
158 each food were summed to generate the total daily nutrient intake per cage. Thus,
159 each cage was considered as an animal during the analysis of nutrient intake. The
160 daily intake of energy, carbohydrates, fat and protein was calculated from the
161 information provided by the manufacturers (**Table 1**). Starting on postnatal day 21,
162 the animals were weighted between 09.00 and 10.00 hours daily. All procedures

163 were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of UFRGS (protocol
164 no 21392).

165 **Puberty onset**

166 The puberty onset in female rats was determined by the occurrence of the vaginal
167 opening (Navarro, VM et al., 2004; Ojeda SR et al., 1976). The external appearance
168 of the vagina was monitored daily from postnatal day 28 until the canalization of the
169 vagina, which was assigned as puberty onset (Ojeda *et al.* 1976; Navarro *et al.*
170 2004a). On the day of vaginal opening the rats were decapitated by guillotine
171 between 17.00 and 19.00 hours.

172 **Blood sampling and tissue collection**

173 On the day of vaginal opening, blood was collected into sterile clot activator and gel
174 separator tubes (Vacuette, Greiner Bio-One, Germany). The blood samples were
175 allowed to clot at room temperature for 30 minutes. The samples were centrifuged at
176 3000 *g* for 15 minutes. After centrifugation, the serum was separated in aliquots and
177 stored at -80° C until hormone assay was performed. Uterus, ovaries, adrenals and
178 retroperitoneal, perirenal, mesenteric and perigonadal adipose tissue were dissected
179 and weighted after decapitation. After decapitation, the brain was removed and
180 immediately frozen in Isopentane (Contemporary Química Ltda, SP, Brazil), cooled
181 by dry ice and wrapped in Parafilm M® (Bemis Company, Inc., WI, USA), and stored
182 at -80° C. On the day of dissection the brains were removed from the -80° C
183 temperature and kept on dry ice. Brain samples containing the Diagonal Band of
184 Broca, the pre-optic area and the arcuate nucleus of the hypothalamus were
185 removed using a rat brain matrix with 1mm coronal divisions (RBM-4000C, ASI
186 Instruments, Inc., MI, USA). All materials used were previously cleaned with 70%

187 alcohol done in nuclease free water (Integrated DNA Technologies, Inc., MI, USA),
188 followed by solution for RNAses decontamination (RNaseZap® Solution Applied
189 Biosystems, Inc., USA) and washing with nuclease free water. The dissection of each
190 sample was followed by the aforementioned cleaning except for the 70% alcohol.
191 The rat brain matrix was chilled on ice and a 1-2 mm incision was made prior to the
192 optic chiasm and a 1-2 mm incision was made posteriorly to the mammillary bodies
193 (Burcelin *et al.* 2003; Quennell *et al.* 2011). The brain samples were weighted and
194 stored at -80° C until gene expression analysis. The weight (g) of brain samples was
195 similar between Control (65.81 ± 3.25) and Cafeteria Diet group (61.81 ± 3.22).

196 **Hormone assays**

197 Hormones were measured in sera by ELISA using commercial kits specific for rats.
198 Serum Estradiol-17beta (E2) was measured by ultra-sensitive estradiol ELISA kit
199 (ALPCO, NH, USA) with a detection sensitivity of <1,399 pg/mL. Serum Luteinizing
200 Hormone (LH) was measured by LH rat ELISA kit (USCN Life Science Inc., Hubei,
201 China) with a detection sensitivity of <0.21 mIU/mL. Serum Insulin-like Growth
202 Factor-1 (IGF1) was measured by IGF1 rat ELISA kit (ALPCO, NH, USA) with a
203 detection sensitivity of 0.029 ng/mL. Serum Leptin was measured by ELISA rat kit
204 (Millipore, MO, USA) with a detection sensitivity of of 0.08 ng/mL. In all samples,
205 hormone concentration was analyzed in duplicate and in a single assay.

206 **RNA extraction, reverse transcription and real-time polymerase** 207 **chain reaction (qPCR) in brain samples**

208 Total RNA was extracted from brain samples using Trizol Reagent (Life
209 Technologies, Corp., CA, USA) in accordance with manufacturer's instructions. Total

210 RNA was measured by fluorescence-based solution assay using Quant-iT™ RNA
211 reagents (Invitrogen Corp., OR, USA) and the fluorometer Qubit™ (Invitrogen Corp.,
212 OR, USA). After quantification, all samples were stored at -80° C. Reverse
213 transcription was performed using SuperScript® First-Strand system for RT-PCR
214 (Invitrogen, OR, USA) and oligo (dT) primers with 1 µg of total RNA. Real-time PCR
215 assay were performed by StepOnePlus system (Applied Biosystems, USA) and
216 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, OR, EUA) to measure
217 expression of *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* and *Lepr* and *Actb* (beta-actin) genes. The
218 primers nucleotides sequences are described in **Table 2** and were based on
219 previously published works (Iwasa *et al.* 2010; Lie *et al.* 2013). Preliminary
220 experiments were undertaken to confirm product specificity by agarose gel
221 electrophoresis, melting curve and PCR cycle conditions. The PCR cycle conditions
222 for all reactions were as follows: holding stage at 50° C for 2 minutes and initial
223 denaturation at 95° C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95° C
224 for 15 seconds and annealing and extension step at 60° C for 1 minute. The
225 quantification of gene expression was achieved from dilution curves for each gene
226 using a pool of samples. The values were normalized using the value of the *Actb*
227 mRNA expression as reference.

228 **Statistical analyses**

229 Data were analyzed for normal distribution and homogeneity of variance. Data with
230 normal distribution and homogeneity of variance were submitted to inferential
231 analysis through parametric Student t test, Welch's t test or Factorial ANOVA
232 Repeated Measures. Data that have not met the requirements of normality and
233 homogeneity of variance were analyzed by non-parametric tests as Mann-Whitney or

234 Mantel-Cox. For the verification of correlation between variables, we used the
235 Spearman's or Pearson's correlation tests. The values are presented as mean \pm
236 standard error of the mean (s.e.m.), median and percentiles 25th and 75th or
237 Spearman's correlation coefficient (r_s) or Pearson's correlation coefficient (r). The
238 vaginal opening data were presented by Kaplan-Meier survival curves as the
239 percentage of animals with vaginal opening on the postnatal day. The significance
240 level was set as $P < 0.05$. Data were analyzed by SPSS for Windows 18.0 Software
241 (SPSS, Inc., Chicago, IL) or GraphPad Prism for Windows 5.0 software (GraphPad
242 Software, San Diego, CA, USA).

243 **Results**

244 **Food and nutrient intake through juvenile and peripubertal period**

245 The food intake analyzes revealed a significant effect time of treatment on the chow
246 intake $F(14, 98) = 23.91$ (**Fig. 1A**). The same analysis demonstrated a significant
247 effect of treatment on chow intake $F(1,98) = 167.90$ (**Fig. 1A**). Finally, there was a
248 significant interaction between the time of treatment and the treatment on chow
249 intake $F(14,98) = 9.46$ (**Fig.1A**). Bonferroni post hoc test analysis showed that the
250 Cafeteria Diet group ate significantly less chow during peripubertal period compared
251 to Control group (**Fig. 1A**). Energy intake was significantly affected by time of
252 treatment $F(14, 98) = 37.83$ (**Fig. 1B**). The same analysis demonstrated a significant
253 effect of treatment on energy intake $F(1,98) = 48.02$ (**Fig. 1B**). Finally, there was a
254 significant interaction between the time of treatment and treatment on energy intake
255 $F(14,98) = 4.54$ (**Fig. 1B**). Bonferroni post hoc test analysis showed that total energy
256 intake in the Cafeteria Diet group was significantly higher compared to the Control
257 group on postnatal days 33 and 35 (**Fig. 1B**). Carbohydrate intake was significantly

258 affected by time of treatment $F(14,98) = 30.71$ (**Fig. 1C**). The same test
259 demonstrated a significant effect of treatment on carbohydrate intake $F(1,98) = 37.62$
260 (**Fig. 1C**). Finally, there was a significant interaction between the time of treatment
261 and treatment on carbohydrate intake $F(14,98) = 4.29$ (**Fig. 1C**). Bonferroni post hoc
262 test showed that carbohydrate intake in the Cafeteria Diet group was significantly
263 lower than in the control group on postnatal days 28, 31, 32, 34 and 36 (**Fig. 1C**).
264 Protein intake was significantly affected by time of treatment $F(14,98) = 51.70$ (**Fig.**
265 **1D**). The same analysis demonstrated a significant effect of treatment on protein
266 intake $F(1,98) = 39.74$ (**Fig. 1D**). Finally, there was a significant interaction between
267 the time of treatment and treatment on protein intake $F(14,98) = 5.61$ (**Fig. 1D**).
268 Bonferroni post hoc test analysis showed that the protein intake in the Cafeteria Diet
269 group was significantly lower than in the Control group on days 24, 27, 29, 30, 33
270 and 34 postnatal (**Fig. 1D**). Fat intake was significantly affected by time of treatment
271 $F(14,98) = 12.64$ (**Fig. 1E**). The same test demonstrated a significant effect of
272 treatment on fat intake $F(1,98) = 104.50$ (**Fig. 1E**). Finally, there was a significant
273 interaction between the time of treatment and treatment on fat intake $F(14,98) = 7.39$
274 (**Fig. 1E**). Bonferroni's post hoc test analysis showed that fat intake in the Cafeteria
275 Diet group was significantly higher when compared to the Control group during the
276 peripubertal period, except in the postnatal day 24 and 27 (**Fig. 1E**).

277 **Puberty onset, ovary and uterus weight and serum LH and E2**

278 To determine the puberty onset, the present study used the criterion of the vaginal
279 opening. The analysis of age of the vaginal opening revealed that the Cafeteria Diet
280 group had an advanced vaginal opening compared to the Control group (**Fig. 2**). On
281 the day of vaginal opening, uterus and ovaries weight were similar in both groups
282 (**Tab. 3**). However, the ovary weight related to body weight was significantly higher in

283 Cafeteria Diet than in Control group (**Tab. 3**). The serum LH and E2 measured on the
284 evening of the day of vaginal opening was similar between groups (**Tab. 3**). There
285 was no significant correlation between LH and E2 in the Control Group ($r = -.05$) and
286 Cafeteria Diet group ($r = -.11$) in the evening of the day of vaginal opening.

287 **Body weight, Adipose tissue and Adrenals weight at vaginal opening**

288 On the day of vaginal opening, the Control group had significantly higher body weight
289 than the Cafeteria Diet group (**Fig. 3A**). The total body weight gain from weaning to
290 puberty onset was significantly lower in the Cafeteria Diet group when compared with
291 the Control group (**Fig. 3B**). Because the Cafeteria Diet group had advanced vaginal
292 opening, further analysis of weight gain were performed until postnatal day 33 and
293 35. There was no difference between groups at postnatal day 33 and 35 (**Fig. 3C**
294 **and 3D**). The weight of intra-abdominal adipose tissue was significantly higher in the
295 Cafeteria Diet group compared with the Control group (**Fig. 3E**) at the day of vaginal
296 opening. On this day, the adrenals weight was significantly lower in the Cafeteria
297 group compared to the control group (**Fig. 3F**). However, there was no difference
298 between groups when the adrenal weight was normalized by body weight (**Fig. 3G**).
299 There was a significant correlation between body weight and the age of vaginal
300 opening in the Control group (**Fig. 4A**) and Cafeteria Diet group (**Fig. 4 B**). The
301 pooled data also revealed significant correlation between body weight and the day of
302 vaginal opening (**Fig. 4C**). There was a significant correlation between body weight
303 gain from weaning and the day of vaginal opening in the Control group, (**Fig. 5A**) and
304 in the Cafeteria Diet group (**Fig. 5B**). Analyze Analysis with pooled data also resulted
305 in significant correlation between body weight gain from weaning and the day of
306 vaginal opening (**Fig. 5C**). Data analysis by group identified significant correlation
307 between intra-abdominal adipose tissue weight and the day of vaginal opening in the

308 Control group (**Fig. 6A**) and Cafeteria Diet group (**Fig. 6B**). The pooled data
309 analysis showed a significant correlation between intra-abdominal adipose tissue
310 weight and the day of vaginal opening (**Fig. 6C**).

311 **Serum IGF1 and Leptin at puberty onset**

312 The serum IGF-1 on the day of vaginal opening was similar between groups (**Fig.**
313 **7A**). On the vaginal opening, serum concentration of Leptin was significantly higher in
314 the Cafeteria Diet group compared with the Control group (**Fig. 7B**). There was no
315 correlation between the intra-abdominal adipose tissue weight and serum Leptin on
316 the day of vaginal opening in the Control group $r = .38$, $P < 0.05$ (**Fig. 8A**). However,
317 there was a significant correlation between the intra-abdominal adipose tissue weight
318 and serum Leptin on the day of vaginal opening in the Cafeteria Diet group (**Fig. 8B**).
319 Pooled data analysis has shown a significant correlation between intra-abdominal
320 adipose tissue weight and serum Leptin on the day of vaginal opening (**Fig. 8C**). In
321 another set of correlation, serum Leptin was not correlated with the day of vaginal
322 opening in the Control group (**Fig. 9A**). However, there was a significant correlation
323 between serum Leptin and the day of vaginal opening in the Cafeteria Diet group
324 (**Fig. 9B**). Analysis of pooled data did not find significant correlation between serum
325 Leptin and the day of vaginal opening (**Fig. 9C**).

326 ***Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* and *Lepr* gene expression at puberty onset**

327 The expression of *Gnrh1*, *Kiss1*, *Kiss1r* and mRNA was analyzed in brains dissected
328 on the afternoon of the day of vaginal opening. The expression of *Gnrh1*, *Kiss1* and
329 *Kiss1r* mRNA was similar in both groups on the referred day of vaginal opening (**Fig.**
330 **10**, A, B and C, respectively). However, Cafeteria Diet induced a significant increase
331 in *Lepr* mRNA expression on the day of vaginal opening (**Fig. 10D**). Correlation

332 analysis has not found a significant correlation between serum Leptin and *Lepr*
333 mRNA on the day of vaginal opening neither in the Control group ($r = .26$, Pearson's
334 correlation coefficient, $P > 0.05$) and in the Cafeteria Diet group ($r = -.03$, Pearson's
335 correlation coefficient, $P > 0.05$) nor in the pooled data. However, there was a
336 significant correlation between the expression of *Gnrh1* mRNA and serum LH on the
337 day of vaginal opening in the Control group and when the pool data is considered
338 (**Tab. 4**), even though it was not found in the Cafeteria Diet group (**Tab. 4**). The
339 correlation analysis did not identify a significant correlation between the serum
340 concentration of IGF1 or Leptin and *Gnrhr1* mRNA expression on the day of vaginal
341 opening, neither in the Control and the Cafeteria Diet group nor in the pooled data
342 (**Tab. 4**). There was a significant correlation between the expression of *Kiss1* mRNA
343 and *Gnrh1* mRNA on the day of vaginal opening of both groups (**Tab. 4**). Indeed,
344 there was no correlation between *Kiss1* mRNA expression and the day of vaginal
345 opening in both groups and in the pool data (**Tab. 5**). The correlation analysis did not
346 find a significant correlation between serum Leptin and *Kiss1* mRNA expression on
347 the day of vaginal opening in both groups and in all data (**Tab. 5**). As for Leptin, there
348 was no significant correlation between the serum IGF1 and *Kiss1* mRNA expression
349 on the day of vaginal opening in both groups in the whole data (**Tab. 5**). Also, there
350 was no significant correlation between serum E2 and the expression of *Kiss1* mRNA
351 on the day of vaginal opening in any group and in all data (**Tab. 5**). As seen for *kiss1*
352 mRNA expression, there was no significant correlation between *Kiss1r* mRNA and
353 the day of vaginal opening and no correlation between serum Leptin and *Kiss1r*
354 mRNA expression on the day of vaginal opening neither in both groups nor in the
355 whole data (**Tab. 6**).

356

357 DISCUSSION

358 The nutritional status has an important effect on the sexual maturation in females
359 (Castellano *et al.* 2011; Li *et al.* 2012; Smith & Spencer 2012; Terasawa *et al.* 2012;
360 Sagae *et al.* 2013; Sánchez-Garrido *et al.* 2013), although the mechanisms are
361 poorly understood. Thus, the present study investigated the effect of palatable foods
362 consumed by humans on food intake and on the onset of puberty in female rats,
363 besides the possible alteration of metabolic and central factors involved in the sexual
364 maturation. The main results revealed that the Cafeteria Diet in peripubertal period
365 alters the pattern of food intake, promoting reduction of chow intake, carbohydrates
366 and protein and increased intake of fat, leading to increased energy intake. The
367 pattern of food intake established in the peripubertal period by the Cafeteria Diet
368 accelerated the process of sexual maturation, resulting in advance of puberty onset
369 and development of ovaries. However, there was no change in relation to body
370 development, as evidenced by the results of body weight, weight gain and IGF1. On
371 the other hand, the diet pattern increased the intra-abdominal adipose tissue and
372 serum Leptin, both positively correlated with each other and with the vaginal opening
373 in the animals fed with Cafeteria Diet. Moreover, the metabolic modulates the
374 expression of the long form of the Leptin receptor, with increased expression in
375 regions involved in energy homeostasis and reproduction. However, the positive
376 energy balance has not modulated the release of hormones of the hypothalamus-
377 pituitary-gonadal axis, such as Luteinizing Hormone and Estradiol-17beta, and not
378 modulated the expression of key genes involved in sexual maturation and puberty
379 onset, as *Gnrh1*, *Kiss1* and *Kiss1r*.

380 The set of changes observed by the introduction of Cafeteria Diet from weaning on
381 the chow and nutrient intake probably reflects the experimental conditions used.

382 Increased energy intake observed in this study is confirmed by experiments on male
383 and female rats submitted to Cafeteria Diet model in the post-weaning period. In the
384 post-weaning period there is increased energy intake in pubertal (Mucellini *et al.*
385 2014) and peripubertal females rats (Sagae *et al.* 2013). The reduced intake of
386 carbohydrates and protein observed in the present study differs from that observed in
387 adult females exposed to Cafeteria Diet and females at puberty exposed to palatable
388 food since weaning, while confirming the increase of fat intake. Adult female rats
389 have an increased intake of carbohydrates and lipids and equal protein intake in
390 adulthood (Goularte *et al.* 2012). However, some evidence shows that in females rats
391 during puberty (after vaginal opening), intake of palatable food only increases energy
392 and carbohydrates intake (Ong & Muhlhausler 2014).

393 The high fat and energy intake observed in animals subjected to Cafeteria Diet was
394 accompanied by acceleration of sexual maturation and the advance of the vaginal
395 opening and development of the ovaries indicating an early onset of puberty,
396 although no change in weight of the uterus has been observed. Nutritional status is
397 recognized as a key element in the course of sexual maturation and early puberty in
398 females, as observed in experimental conditions with reduced or increased access to
399 food at different stages of development. The reduction of the availability of food for
400 pregnant rats throughout the gestational period delays the onset of puberty in female
401 offspring (Iwasa *et al.* 2010). Furthermore, manipulations in the postnatal period
402 leading to poor access to breastfeeding delays the installation of puberty, while
403 experimental manipulations to increase the food supply advances the pubertal
404 process in females rats (Castellano *et al.* 2011; Smith & Spencer 2012). In some
405 models of obesity, early puberty has been seen in animals fed high-fat diet (Frisch *et*
406 *al.* 1975; Boukouvalas *et al.* 2008; Li *et al.* 2012), while others have not observed the

407 advanced puberty onset related to high-fat diet on female rats (Ramaley 1981). It
408 seems that the difference in fat content in each of these diets explains the
409 discrepancies found. While it is difficult to determine which nutrient ingested by
410 animals may have influenced the advance of the vaginal opening in this study,
411 experiments with high-fat diet and the high fat intake observed in animals in the
412 current study suggest that the diet fat may be a modulator of sexual maturation.
413 Some evidence shows that fat intake in peripubertal period regulates the onset of
414 puberty in female rats (Leibowitz *et al.* 2009) by modulation of orexigenic peptides
415 and steroid hormones. However, it needs to be determined the direct influence of diet
416 fat on the regulatory centers of puberty onset.

417 The sexual maturation process is accompanied by somatic development and
418 adiposity (Veldhuis *et al.* 2005) and both are influenced by metabolic state. Despite
419 the high energy and fat intake, treatment with Cafeteria Diet resulted in lower body
420 weight on the day of vaginal opening and less body weight gain until the vaginal
421 opening. However, weight gain was similar when analyzed on the same day and in
422 peripubertal and initial pubertal period, suggesting that the differences in body weight
423 and body weight gain were due to the advance average of two days at the vaginal
424 opening of females who received Cafeteria Diet, suggesting that it was not required
425 to reach a certain weight for the vaginal opening and reach of early puberty. In
426 addition, there was a positive correlation between body weight and body weight gain
427 on the day of vaginal opening, suggesting that metabolic factors involved in somatic
428 development were on physiological regulation in the Cafeteria Diet group. This is
429 reinforced by the lack of effect of Cafeteria Diet on serum IGF1, which is a modulator
430 of bone and muscle growth (Veldhuis *et al.* 2005). However, these results contradict
431 previous studies in which body weight is a more important indicator to predict the

432 onset of puberty in females than the age of the animal (Kennedy & Mitra 1963; Iwasa
433 *et al.* 2010; Castellano *et al.* 2011), suggesting that other factors present throughout
434 the development were modulated by the Cafeteria Diet and may have influenced the
435 installation of puberty.

436 Epidemiological studies suggest that there has been an early onset of puberty in girls
437 in recent years (Herman-Giddens *et al.* 1997; Euling *et al.* 2008), and there is an
438 increased risk of the appearance of early signs of puberty with increased adiposity
439 (Rosenfield *et al.* 2009). In this sense, besides showing an advance of the vaginal
440 opening, the present study demonstrated that treatment with the Cafeteria Diet in
441 peripubertal period stimulated the increase in intra-abdominal adipose tissue and
442 reduced the weight of the adrenals. These findings confirm previous studies, where
443 there is an increase in the perigonadal and perirenal adipose tissue on the day of
444 vaginal opening (Sagae *et al.* 2013). In addition, there was a positive correlation
445 between visceral adiposity and puberty onset in both groups, suggesting that the
446 visceral adipose tissue is a signal of energy storages and possible regulator of
447 reproductive function. This correlation in data indicates that intra-abdominal fat may
448 be involved with the onset of puberty, and that the rapid expansion of adipose tissue
449 in animals treated with the Cafeteria Diet has signaled an optimal level of energy
450 storage for the onset of puberty. The lowest adrenal weight observed in the Cafeteria
451 Diet group can be explained by the advanced day of vaginal opening, as when the
452 weight of the adrenals was normalized by body weight there was no obvious
453 difference. The development of the adrenal appears to be influenced by high-fat diet
454 (Boukouvalas *et al.* 2008) and be involved in sexual maturation in female rats
455 (Pignatelli *et al.* 2006), although the present experiment has failed to identify changes
456 in the adrenals in the experimental setting.

457 Adipose tissue is an endocrine organ that synthesizes and releases proteins known
458 as adipokines and cytokines, which perform actions on different biological systems
459 and are important regulators of energy metabolism and inflammatory processes
460 (Scherer 2006). With respect to the reproductive aspects, the hormone Leptin
461 secreted by adipocytes (Masuzaki *et al.* 1995) in proportion to the amount of fat
462 (Maffei *et al.* 1995) is an important regulator of sexual maturation and fertility in
463 females (Barash *et al.* 1996) and a link between the energy status and the onset of
464 puberty. In this study, the day of vaginal opening was marked by an increase in
465 serum Leptin in the animals receiving Cafeteria Diet. Furthermore, elevation of Leptin
466 was correlated with adiposity and the day of vaginal opening only in animals with
467 Cafeteria Diet, suggesting Leptin from the intra-abdominal adipose tissue as a signal
468 of metabolic energy stores for central regulators of puberty onset. Pharmacological
469 studies demonstrate that intraperitoneal (ip) injection of Leptin advances the vaginal
470 opening (Ahima *et al.* 1997) and the maturation of the reproductive system organs
471 such as the uterus, ovaries and oviducts (Chehab *et al.* 1997), suggesting a
472 mechanism to explain the increased weight of ovaries on the vaginal opening lies in
473 the group of Cafeteria Diet. In animals subjected to high-fat diet the concentration of
474 Leptin gradually increased between peripubertal and pubertal females (Li *et al.*
475 2012). However, evidence suggests that Leptin is a permissive factor for sexual
476 maturation rather than the factor that triggers puberty (Cheung *et al.* 1997). Thus, it is
477 likely that the animals in this study have developed a gradual increase of intra-
478 abdominal adipose tissue and Leptin. Thus, the high concentration of Leptin was
479 enough to reach the threshold required to signal an adequate state of energy
480 reserves to the H-P-G axis and allow the normal course of pubertal development.

481 However, due to the experimental design it was not possible to identify the start of
482 the course of these modifications.

483 Leptin signals the state of energy reserves of the body to the central nervous system
484 by binding the Ob-Rb membrane receptors. The *Lepr* gene that encodes the Ob-Rb
485 protein has high expression in neurons located in hypothalamic regions involved with
486 energy homeostasis and reproduction, including neurons located in the arcuate
487 nucleus, dorsomedial, dorsal-ventral and ventral premammillary nucleus (Elmqvist *et al.*
488 *al.* 1998). Recent studies of protein expression confirmed the localization of mRNA
489 expression studies for the long Ob-Rb isoform, confirming the hypothalamus with
490 high local concentration of neurons with Ob-Rb receptor (Patterson *et al.* 2011). The
491 results in the current study revealed increased *Lepr* mRNA expression in brain
492 samples containing the hypothalamic regions aforementioned on the day of vaginal
493 opening in rats under Cafeteria Diet. However, the high concentration of Leptin
494 observed in animals with this diet was not associated with *Lepr* mRNA in this study,
495 suggesting the possibility of modulation of other factors in the study conditions. In
496 rats subjected to high fat diet for 12 (Xu *et al.* 2008) and 8 weeks (Liu *et al.* 2007),
497 *Lepr* mRNA levels of in the hypothalamus was reduced and the concentration of
498 Leptin was increased, while other studies have not observed changes in expression
499 of *Lepr* mRNA even with elevation of Leptin in the 8-week study (Page *et al.* 2009). In
500 addition, male rats kept in conditions of high food supply in the juvenile period
501 develop increased concentration of Leptin and reduced *Lepr* mRNA expression in the
502 hypothalamus in this period, suggesting that the metabolic status and possibly Leptin
503 exert downregulation of Leptin receptor expression which can result in Leptin
504 resistance and obesity. On the other hand, the study using similar methodology
505 identified no change in the mRNA expression of *Lepr* in adulthood, suggesting that

506 age is a modulator of Leptin receptor expression (López *et al.* 2007). Thus, increased
507 expression of Lepr mRNA in the present study may be the result of modulation by
508 other metabolic factors with peripheral or central origin.

509 In addition to Leptin, other peripheral factors seem to signal the metabolic state (Roa
510 *et al.* 2010) and development of the body to the regulatory centers of reproductive
511 function to trigger the onset of pubertal process. In this study, we evaluated the
512 serum concentration of IGF1 as a possible signal of somatic development for HPG
513 axis on the day of vaginal opening, since some studies have shown an early puberty
514 onset in animals after intraperitoneal injection of IGF 1 in peripubertal period (Divall
515 *et al.* 2010). The result obtained in this study did not show increased serum
516 concentration of IGF1 on the day of vaginal opening in animals subjected to Cafeteria
517 Diet. However, female rhesus monkeys undergoing hypercaloric diet in the juvenile
518 and peripubertal period show a clear increase of IGF1 concentration (Terasawa *et al.*
519 2012). Similarly, treatment of adult mice with high-fat diet also shows an increase in
520 the concentration of IGF1 (Mah *et al.* 2014). Thus, it is possible that the experimental
521 conditions employed in this study have not played an important effect on the
522 regulation of IGF1 release over peripubertal period.

523 To check the possible modulation of components of the HPG by metabolic state, the
524 present study analyzed the serum concentration of LH and E2 hormones on the
525 afternoon of the vaginal opening. Although the obvious changes in adipose tissue
526 development and Leptin secretion associated with early puberty onset in Cafeteria
527 Diet rats, the resulting metabolic state produced no further changes in serum LH and
528 E2. However, data in scientific literature support the hypothesis of the influence of
529 metabolic state on the activity of different levels of the HPG in peripubertal period.
530 The negative energy balance caused by 48 hours fasting in Wistar female rats in

531 peripuberal period reduces LH concentration (García-Galiano *et al.* 2010). Similarly,
532 animals subjected to protocol of dietary restriction have lower concentrations of LH
533 and E2 (Castellano *et al.* 2005). Moreover, animals subjected to high-fat diet since
534 weaning (postnatal day 21) showed increased rate of secretion of LH pulses on
535 postnatal day 28 and 32 and increased serum E2 on postnatal day 28, 32 and 36 (Li
536 *et al.* 2012). However, some studies have not identified changes in serum LH and E2
537 on the day of vaginal opening using the high-fat diet model (Lie *et al.* 2013). The
538 divergence of results obtained in the current study in relation to other studies may be
539 explained by the difference in the experimental designs used, since the analyzes
540 presented here were obtained on samples of the vaginal opening while other
541 samples were obtained at work during the pubertal period and prior to vaginal
542 opening. Thus, possible changes in the concentration of LH and E2 occurring in
543 peripubertal period have not been identified. Furthermore, correlation data has
544 shown no association between the concentration of LH and E2 in the afternoon of the
545 day the vaginal opening, which would be expected since LH increases the release of
546 E2 under physiological conditions (Urbanski & Ojeda 1985a). However, as the
547 secretion of LH in pulses (Urbanski & Ojeda 1985b), the analysis in one single
548 moment may have been insufficient to identify this phenomenon because some
549 animals with low LH concentration showed high concentration of E2.

550 In the neuroendocrine point of view, puberty starts with the activation of GnRH
551 neurons (Sisk & Foster 2004), so this study chose to analyze the *Gnrh1* mRNA
552 expression in brain samples containing GnRH neurons on the day of vaginal
553 opening. The results showed no changes of *Gnrh1*mRNA expression on the day of
554 vaginal opening. Furthermore, there was no association between expression of
555 *Gnrh1* mRNA with the vaginal opening, although a positive correlation between the

556 expression of *Gnrh1* mRNA and serum LH concentration has occurred in control
557 conditions, suggesting a modulation of GnRH peptide on pituitary gonadotropes and
558 LH secretion. Scientific evidence regarding the modulation of *Gnrh1* mRNA
559 expression due to the metabolic state is divergent. In a study conducted in rhesus
560 monkey, a negative energy balance induced by 48 hours fasting did not exert
561 additional effect on the expression of *Gnrh1* mRNA (Wahab *et al.* 2011). However,
562 studies using immunohistochemical techniques demonstrated reduction in
563 immunoreactivity for GnRH in the hypothalamus of Wistar adult female rats under
564 fasting (Kumar & Kaur 2013). So it would be important to determine the modulation of
565 the formation of the peptide GnRH front metabolic state in animals fed with Cafeteria
566 Diet. The lack of association between the concentration of LH and the expression of
567 *Gnrh1* mRNA in the Cafeteria Diet group may reflect the dispersion of data from three
568 animals, since there is a pattern of positive association between these variables.
569 Thus, it is plausible that metabolic changes produced by the Cafeteria Diet have
570 exerted effect on the different levels of the HPG, but the experimental design and the
571 methods used were not adequate to identify the changes. The activation of GnRH
572 neurons at the beginning of puberty process appears to be the result of increased
573 excitatory stimuli on inhibitory stimulus exerted on GnRH neurons (Sisk & Foster
574 2004). The IGF1 from peripheral origin seems to stimulate GnRH neurons during
575 early puberty, because the selective inhibition of expression of IGF1 receptor
576 (IGF1R) in GnRH neurons slows the vaginal opening (Divall *et al.* 2010). However,
577 the present study has failed to identify a positive correlation between the
578 concentration of IGF1 and expression of *Gnrh1* mRNA on the day of vaginal opening
579 in control condition, suggesting that the expression pattern of expression *Gnrh1*
580 mRNA is not dependent on serum IGF1 concentration on the day of vaginal opening.

581 Likewise, there was no correlation between the serum Leptin with *Gnrh1* mRNA
582 expression. Though initial studies have demonstrated an effect of Leptin on GnRH
583 neurons (Cunningham *et al.* 1999), recent evidence suggests that GnRH neurons do
584 not express Ob-Rb Leptin receptor (Quennell *et al.* 2009), so the lack of correlation
585 with *Gnrh1* expression in the present study may be the result of non-expression of
586 the Ob-Rb in GnRH neurons.

587 There is currently great interest in the study of kisspeptin system, composed of the
588 neurotransmitter KISS1 and its receptor KISS1R, which is recognized as an
589 indispensable element for activation of GnRH neurons and triggering of puberty
590 onset (Seminara *et al.* 2003; Navarro *et al.* 2004a; Kirilov *et al.* 2013). Thus, this
591 study sought to identify modulations on the kisspeptin system by the metabolic state
592 at the beginning of the pubertal process in female rats under Cafeteria Diet. Although
593 animals fed with Cafeteria Diet had experienced a positive energy balance, this effect
594 did not result in changes on the expression patten of *Kiss1* mRNA and *Kiss1r* mRNA
595 on the day of vaginal opening, and there is no positive correlation between *Kiss1* and
596 *Kiss1r* mRNA expression with the puberty onset. These data confirm previous
597 findings from other research groups that showed no modulation of kisspeptin system
598 by metabolic state on puberty onset (Smith & Spencer 2012; Lie *et al.* 2013).
599 However, other studies have shown that nutritional status may have significant
600 effects on gene expression of the components of kisspeptin system. In food
601 restriction conditions, Wistar female rats have decreased expression of *Kiss1* mRNA
602 and delayed vaginal opening, while females kept in conditions with increased food
603 availability have elevated *Kiss1* mRNA expression in peripubertal period and
604 advance in vaginal opening (Castellano *et al.* 2011). Furthermore, treatment with
605 high-fat diet increased the expression of *Kiss1* mRNA in the period prior to puberty

606 onset. Thus, the results present herein suggest that the necessary modifications for
607 the maturation have been achieved in the experimental conditions used and indicate
608 that the expression analyzes over peripubertal period might be more accurate to
609 identify changes in kisspeptin system than analyzes on the day of vaginal opening.
610 On the other hand, *Kiss1* mRNA expression was associated with the *Gnrh1* mRNA
611 expression under physiological conditions, suggesting that modulation of GnRH
612 neurons may be influenced by Kisspeptin on the day of vaginal opening.

613 Leptin appears to be a peripheral factor signaling the metabolic state of the organism
614 to the kisspeptin system. However, this study has not found evidence for the
615 association between serum concentration of Leptin and *Kiss1* mRNA and *Kiss1r*
616 mRNA expression on the day of vaginal opening in both experimental conditions,
617 suggesting that Leptin does not act as a determining factor on kisspeptin system on
618 the day of vaginal opening. Although evidence suggest that the Leptin stimulates
619 *Kiss1* mRNA expression in Leptin deficiency models (Smith *et al.* 2006), the selective
620 inactivation of expression of Leptin Ob-Rb in kisspeptin neurons does not slow the
621 vaginal opening and does not cause loss of fertility (Donato *et al.* 2011), indicating
622 that, although Leptin is important to sexual maturity in females, its action is mediated
623 by binding to other receptors in addition to neuronal kisspeptin neurons. Besides
624 Leptin, peripheral IGF1 appears to be an important regulator of Kisspeptin system.
625 However, the present study has not found an association between the concentration
626 of IGF1 and the expression of *Kiss1* and *Kiss1r* mRNA in the experimental conditions
627 used. Some studies demonstrate that IGF-1 administered by intracerebroventricular
628 route (icv) or intraperitoneally in the juvenile period in female rats stimulates the
629 expression of *Kiss1* mRNA in samples containing the anteroventral periventricular
630 area (AVPV) and the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) (Hiney *et al.* 2009).

631 Although IGF1 modulates the activity of the kisspeptin system, it does not seem to be
632 a determinant of *Kiss1* mRNA expression on the day of vaginal opening. Likewise,
633 the E2 appears to be a positive regulator of kisspeptin system in physiological
634 conditions for the course of sexual maturation (Clarkson *et al.* 2009). However, the
635 data observed in animals in the present study has not demonstrated any association
636 between the concentration of E2 and the expression of *Kiss1* and *KISS1R* mRNA on
637 the day of vaginal opening. E2 exerts positive effect on the expression of the peptide
638 KiSS1 in the AVPV region, and this effect is not observed in the arcuate nucleus
639 (Clarkson *et al.* 2009). In the present study, the expression of *Kiss1* mRNA was
640 analyzed in samples containing AVPV region and the arcuate nucleus, preventing
641 accurate analysis of the E2 action in different populations of kisspeptin neurons.
642 Thus, an analysis of the expression in specific regions samples would be more
643 precise in relation to the method used in this study. This proposition is supported by
644 the increased *Kiss1* mRNA expression in the arcuate nucleus of the hypothalamus in
645 postnatal day 28 and in the medial preoptic area in postnatal day 32 in animals with
646 access to high-fat diet (Li *et al.* 2012). Although the previous study has not identified
647 difference relating to *Kiss1r* mRNA expression (Li *et al.* 2012) in the days before
648 vaginal opening, an experiment with animals submitted to Cafeteria Diet for the study
649 of *Kiss1* and *Kiss1r* mRNA expression in days prior to vaginal opening would add
650 important information on developments in the expression of genes that compose the
651 kisspeptin system.

652 **CONCLUSION**

653 Early exposure to palatable food changed the food intake pattern, resulting in high fat
654 and energy intake, which was accompanied by the advance of the process of sexual
655 maturation and puberty onset. This change in pattern intake was accompanied by

656 intra-abdominal obesity and increased Leptin. Apparently, Leptin was an important
657 sign of the energy reserves to the central regulators of puberty onset. In control
658 conditions, Leptin seems to have a permissive effect on the course of the pubertal
659 process, while in the state of increased energy reserves observed on the treatment
660 with Cafeteria Diet the Leptin seems to act as a determining factor for the course of
661 puberty. However, the components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis have
662 not been modulated by metabolic state on the day of vaginal opening. In addition, the
663 IGF1 from peripheral origin was also not modulated by metabolic state under the
664 conditions studied. The expression of key genes involved with the trigger of puberty,
665 as the *Gnrh1*, *Kiss1* and *Kiss1r*, were not affected by nutritional status in this study
666 and apparently have not suffered modulation of components of the metabolic state as
667 Leptin and IGF1 in the conditions presented herein. Future experiments are needed
668 to determine the influence of dietary fat and Leptin secreted by intra-abdominal
669 adipose tissue on the modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and
670 kisspeptin system during peripubertal period and the onset of puberty in animals
671 treated with Cafeteria Diet.

672 **Declaration of Interest**

673 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as
674 prejudicing the impartiality of the research reported.

675 **Funding**

676 The present study was funded by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ,
677 Brazil). J F G, G V E P and A B M were supported by doctoral scholarship from
678 CNPQ. A C A C was supported by scholarship program from BIC-Universidade
679 Federal do Rio Grande do Sul/CNPQ. R C C was supported by scholarship from

680 PROBIC-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
681 (FAPERGS).

682 **Author Contributions**

683 J F G and G L S designed the experiment and discussed all data. J F G performed
684 the experimental and laboratory analyses, collected the data, and drafted the
685 manuscript. A C A C, R C C, A B M and G V E P performed experimental analyses
686 and collected data. I S B S gave assistance on gene expression experiments and
687 data analyses. All authors read and approved the manuscript as submitted and take
688 full responsibility for the reported findings.

689 **Acknowledgements**

690 J F G wish to thank PhD Lolita Schneider Pizzolato for their technical assistance in
691 the starting experiments of gene expression analyses.

692 **References**

- 693 1. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D & Flier JS 1997
694 Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice.
695 *Journal of Clinical Investigation* **99** 391–395.
696 (doi:10.1172/JCI119172)
- 697 2. Amstalden M, Alves BRC, Liu S, Cardoso RC & Williams GL 2011
698 Neuroendocrine pathways mediating nutritional acceleration of
699 puberty: Insights from ruminant models. *Frontiers in Endocrinology*
700 **2** 1–7. (doi:10.3389/fendo.2011.00109)
- 701 3. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper
702 JL, Clifton DK & Steiner RA 1996 Leptin is a metabolic signal to the
703 reproductive system. *Endocrinology* **137** 3144–3147.
704 (doi:10.1210/endo.137.7.8770941)
- 705 4. Boukouvalas G, Antoniou K, Papalexi E & Kitraki E 2008 Post
706 weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic
707 pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic

- 708 manner. *Neuroscience* **153** 373–382.
 709 (doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.023)
- 710 5. Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC & Pralong FP 2003
 711 Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic
 712 neurons: Stimulation by insulin and potentiation by leptin.
 713 *Endocrinology* **144** 4484–4491. (doi:10.1210/en.2003-0457)
- 714 6. Caraty A & Franceschini I 2008 Basic aspects of the control of
 715 GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for
 716 better control of fertility in females. *Reproduction in domestic*
 717 *animals = Zuchthygiene* **43 Suppl 2** 172–178. (doi:10.1111/j.1439-
 718 0531.2008.01158.x)
- 719 7. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras
 720 R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E
 721 *et al.* 2005 Changes in hypothalamic KiSS-1 system and
 722 restoration of pubertal activation of the reproductive axis by
 723 kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146** 3917–3925.
 724 (doi:10.1210/en.2005-0337)
- 725 8. Castellano JM, Bentsen AH, Sánchez-Garrido M a., Ruiz-Pino F,
 726 Romero M, Garcia-Galiano D, Aguilar E, Pinilla L, Diéguez C,
 727 Mikkelsen JD *et al.* 2011 Early metabolic programming of puberty
 728 onset: Impact of changes in postnatal feeding and rearing
 729 conditions on the timing of puberty and development of the
 730 hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology* **152** 3396–3408.
 731 (doi:10.1210/en.2010-1415)
- 732 9. Chehab FF, Mounzih K, Lu R & Lim ME 1997 Early onset of
 733 reproductive function in normal female mice treated with leptin.
 734 *Science (New York, N.Y.)* **275** 88–90.
- 735 10. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK
 736 & Steiner R a. 1997 Leptin is a metabolic gate for the onset of
 737 puberty in the female rat. *Endocrinology* **138** 855–858.
 738 (doi:10.1210/en.138.2.855)
- 739 11. Clarkson J, Boon WC, Simpson ER & Herbison AE 2009
 740 Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback
 741 mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* **150** 3214–
 742 3220. (doi:10.1210/en.2008-1733)
- 743 12. Cunningham MJ, Clifton DK & Steiner R a 1999 Leptin's
 744 actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms.
 745 *Biology of reproduction* **60** 216–222.
 746 (doi:10.1095/biolreprod60.2.216)
- 747 13. Denis RGP, Joly-Amado A, Cansell C, Castel J, Martinez S,
 748 Delbes AS & Luquet S 2014 Central orchestration of peripheral
 749 nutrient partitioning and substrate utilization: implications for the

- 750 metabolic syndrome. *Diabetes & metabolism* **40** 191–197.
751 (doi:10.1016/j.diabet.2013.11.002)
- 752 14. Divall SA, Williams TR, Carver SE, Koch L, Brüning JC, Kahn
753 CR, Wondisford F, Radovick S & Wolfe A 2010 Divergent roles of
754 growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *The*
755 *Journal of Clinical Investigation* **120** 2900–2909.
756 (doi:10.1172/JCI41069)
- 757 15. Donato J, Cravo RM, Frazão R, Gautron L, Scott MM, Lachey
758 J, Castro I a., Margatho LO, Lee S, Lee C *et al.* 2011 Leptin's
759 effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary
760 nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *Journal of*
761 *Clinical Investigation* **121** 355–368. (doi:10.1172/JCI45106)
- 762 16. Elmquist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS & Saper CB
763 1998 Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat
764 brain. *The Journal of comparative neurology* **395** 535–547.
- 765 17. Euling SY, Herman-Giddens ME, Lee PA, Selevan SG, Juul
766 A, Sørensen TIA, Dunkel L, Himes JH, Teilmann G & Swan SH
767 2008 Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for
768 secular trends: panel findings. *Pediatrics* **121 Suppl** S172–S191.
769 (doi:10.1542/peds.2007-1813D)
- 770 18. Frisch RE, Hegsted DM & Yoshinaga K 1975 Body weight
771 and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet.
772 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*
773 *States of America* **72** 4172–4176. (doi:10.1073/pnas.72.10.4172)
- 774 19. Frisch RE, Hegsted DM & Yoshinaga K 1977 Carcass
775 components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body
776 water, protein, and fat. *Proceedings of the National Academy of*
777 *Sciences of the United States of America* **74** 379–383.
778 (doi:10.1073/pnas.74.1.379)
- 779 20. García-Galiano D, Navarro VM, Roa J, Ruiz-Pino F,
780 Sánchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Romero M, Aguilar
781 E, Gaytán F *et al.* 2010 The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1,
782 is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *The*
783 *Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*
784 *Neuroscience* **30** 7783–7792. (doi:10.1523/JNEUROSCI.5828-
785 09.2010)
- 786 21. Goularte JF, Ferreira MBC & Sanvitto GL 2012 Effects of
787 food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-
788 induced obesity in female rats. *The British Journal of Nutrition* **108**
789 1511–1518. (doi:10.1017/S0007114511006933)
- 790 22. Grumbach MM 2002 The neuroendocrinology of human
791 puberty revisited. *Hormone Research* **57** 2–14.
792 (doi:10.1159/000058094)

- 793 23. Han S-K, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich
794 SK, Clifton DK, Steiner R a & Herbison AE 2005 Activation of
795 gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a
796 neuroendocrine switch for the onset of puberty. *The Journal of*
797 *neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*
798 **25** 11349–11356. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005)
- 799 24. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony
800 CJ, Bhapkar M V, Koch GG & Hasemeier CM 1997 Secondary
801 sexual characteristics and menses in young girls seen in office
802 practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings
803 network. *Pediatrics* **99** 505–512. (doi:10.1542/peds.99.4.505)
- 804 25. Hiney JK, Srivastava VK, Pine MD & Dees W Les 2009
805 Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the
806 brain of the prepubertal female rat. *Endocrinology* **150** 376–384.
807 (doi:10.1210/en.2008-0954)
- 808 26. Hiney JK, Srivastava VK & Les Dees W 2010 Insulin-like
809 growth factor-1 stimulation of hypothalamic KiSS-1 gene
810 expression is mediated by Akt: Effect of alcohol. *Neuroscience* **166**
811 625–632. (doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.030)
- 812 27. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido B V., Popa SM,
813 Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK & Steiner R a. 2004
814 Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons
815 and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat.
816 *Neuroendocrinology* **80** 264–272. (doi:10.1159/000083140)
- 817 28. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Fujisawa S, Kinouchi R,
818 Gereltsetseg G, Kuwahara a, Yasui T & Irahara M 2010 Effects of
819 intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and
820 the timing of puberty in female rats. *The Journal of physiology* **588**
821 821–829. (doi:10.1113/jphysiol.2009.183558)
- 822 29. Kauffman AS, Clifton DK & Steiner RA 2007 Emerging ideas
823 about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine
824 regulation of reproduction. *Trends in neurosciences* **30** 504–511.
825 (doi:10.1016/j.tins.2007.08.001)
- 826 30. Kennedy BYGC & Mitra J 1963 BODY WEIGHT AND FOOD
827 INTAKE AS INITIATING FACTORS FOR PUBERTY IN THE RAT
828 From the M . R . C . Department of Experimental Medicine ,
829 University of Cambridge In a preceding paper (Kennedy & Mitra ,
830 1963) evidence was presented that the ventromedial nuclei. 408–
831 418.
- 832 31. Keogh K, Waters SM, Kelly AK, Wylie ARG & Kenny DA
833 2015 Effect of feed restriction and subsequent re-alimentation on
834 hormones and genes of the somatotrophic axis in cattle.

- 835 *Physiological genomics* *physiolgenomics*.00134.2014.
 836 (doi:10.1152/physiolgenomics.00134.2014)
- 837 32. Kirilov M, Clarkson J, Liu X, Roa J, Campos P, Porteous R,
 838 Schütz G & Herbison AE 2013 Dependence of fertility on
 839 kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nature*
 840 *communications* **4** 2492. (doi:10.1038/ncomms3492)
- 841 33. Kumar S & Kaur G 2013 Intermittent fasting dietary restriction
 842 regimen negatively influences reproduction in young rats: a study
 843 of hypothalamo-hypophysial-gonadal axis. *PloS one* **8** e52416.
 844 (doi:10.1371/journal.pone.0052416)
- 845 34. Leibowitz SF, Akabayashi A, Alexander J, Karatayev O &
 846 Chang G-Q 2009 Puberty onset in female rats: relationship with fat
 847 intake, ovarian steroids and the peptides, galanin and enkephalin,
 848 in the paraventricular and medial preoptic nuclei. *Journal of*
 849 *neuroendocrinology* **21** 538–549. (doi:10.1111/j.1365-
 850 2826.2009.01870.x)
- 851 35. Li XF, Lin YS, Kinsey-Jones JS & O'Byrne KT 2012 High-fat
 852 diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B
 853 expression in puberty-advanced female rats. *Endocrinology* **153**
 854 4422–4431. (doi:10.1210/en.2012-1223)
- 855 36. Lie MEK, Overgaard A & Mikkelsen JD 2013 Effect of a
 856 postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle
 857 regularity, and kisspeptin expression in female rats. *Reproductive*
 858 *Biology* **13** 298–308. (doi:10.1016/j.repbio.2013.08.001)
- 859 37. Liu Z-J, Bian J, Liu J & Endoh A 2007 Obesity reduced the
 860 gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver.
 861 *Hormone and metabolic research = Hormon- und*
 862 *Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **39** 489–494.
 863 (doi:10.1055/s-2007-981680)
- 864 38. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Nogueiras R, Seoane LM,
 865 García M, Señarís RM & Diéguez C 2007 Perinatal overfeeding in
 866 rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged
 867 cerebrospinal leptin in adulthood. *International journal of obesity*
 868 *(2005)* **31** 371–377. (doi:10.1038/sj.ijo.0803425)
- 869 39. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang
 870 Y, Fei H, Kim S, Lallone R & Ranganathan S 1995 Leptin levels in
 871 human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in
 872 obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine* **1** 1155–
 873 1161.
- 874 40. Mah AT, Van Landeghem L, Gavin HE, Magness ST & Lund
 875 PK 2014 Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells:
 876 hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires

- 877 insulin/IGF1. *Endocrinology* **155** 3302–3314. (doi:10.1210/en.2014-
878 1112)
- 879 41. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T,
880 Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K & Yoshimasa Y 1995
881 Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and
882 regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* **44** 855–858.
- 883 42. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H & Ohtaki T
884 2004 Peripheral administration of metastatin induces marked
885 gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and*
886 *biophysical research communications* **320** 383–388.
887 (doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.185)
- 888 43. Mucellini AB, Goularte JF, de Araujo da Cunha AC, Caceres
889 RC, Noschang C, da Silva Benetti C, Silveira PP & Sanvitto GL
890 2014 Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and
891 after weaning on the metabolism and body weight of adult male
892 offspring in rats. *The British journal of nutrition* **111** 1499–1506.
- 893 44. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R,
894 Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C,
895 Pinilla L & Tena-Sempere M 2004a Developmental and hormonally
896 regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its
897 putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent
898 luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide.
899 *Endocrinology* **145** 4565–4574. (doi:10.1210/en.2004-0413)
- 900 45. Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J,
901 Mayen a, Barreiro ML, Gaytan F, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C *et*
902 *al.* 2004b Advanced vaginal opening and precocious activation of
903 the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of
904 GPR54. *The Journal of physiology* **561** 379–386.
905 (doi:10.1113/jphysiol.2004.072298)
- 906 46. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK & Flegal KM 2012 Prevalence
907 of obesity and trends in body mass index among US children and
908 adolescents, 1999-2010. *JAMA : the journal of the American*
909 *Medical Association* **307** 483–490. (doi:10.1001/jama.2012.40)
- 910 47. Ojeda SR & Skinner MK 2006 Puberty in the rat. *Knobil and*
911 *Neill's Physiology of Reproduction* 2061–2126. (doi:10.1016/B978-
912 012515400-0/50043-9)
- 913 48. Ojeda SR, Wheaton JE, Jameson HE & McCann SM 1976
914 The onset of puberty in the female rat: changes in plasma
915 prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone
916 (LHRH), and hypothalamic LHRH content. *Endocrinology* **98** 630–
917 638. (doi:10.1210/endo-98-3-630)
- 918 49. Ong ZY & Muhlhausler BS 2014 Consuming a low-fat diet
919 from weaning to adulthood reverses the programming of food

- 920 preferences in male, but not in female, offspring of “junk food”-fed
 921 rat dams. *Acta physiologica (Oxford, England)* **210** 127–141.
 922 (doi:10.1111/apha.12132)
- 923 50. Page KC, Malik RE, Ripple JA & Anday EK 2009 Maternal
 924 and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene
 925 expression and modulates response to a high-fat diet in male
 926 offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative
 927 and comparative physiology* **297** R1049–R1057.
 928 (doi:10.1152/ajpregu.90585.2008)
- 929 51. Patterson CM, Leshan RL, Jones JC & Myers MG 2011
 930 Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin
 931 receptor-expressing cells. *Brain research* **1378** 18–28.
 932 (doi:10.1016/j.brainres.2011.01.010)
- 933 52. Pignatelli D, Xiao F, Gouveia AM, Ferreira JG & Vinson GP
 934 2006 Adrenarche in the rat. *Journal of Endocrinology* **191** 301–308.
 935 (doi:10.1677/joe.1.06972)
- 936 53. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp
 937 CJ, Herbison AE, Grattan DR & Anderson GM 2009 Leptin
 938 indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal
 939 function. *Endocrinology* **150** 2805–2812. (doi:10.1210/en.2008-
 940 1693)
- 941 54. Quennell JH, Howell CS, Roa J, Augustine R a., Grattan DR
 942 & Anderson GM 2011 Leptin deficiency and diet-induced obesity
 943 reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. *Endocrinology*
 944 **152** 1541–1550. (doi:10.1210/en.2010-1100)
- 945 55. Ramaley JA 1981 Puberty onset in males and females fed a
 946 high fat diet. *Proceedings of the Society for Experimental Biology
 947 and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New
 948 York, N.Y.)* **166** 294–296.
- 949 56. Roa J, García-Galiano D, Castellano JM, Gaytan F, Pinilla L
 950 & Tena-Sempere M 2010 Metabolic control of puberty onset: new
 951 players, new mechanisms. *Molecular and cellular endocrinology*
 952 **324** 87–94. (doi:10.1016/j.mce.2009.12.018)
- 953 57. Rosenfield RL, Lipton RB & Drum ML 2009 Thelarche,
 954 pubarche, and menarche attainment in children with normal and
 955 elevated body mass index. *Pediatrics* **123** 84–88.
 956 (doi:10.1542/peds.2008-0146)
- 957 58. Sagae SC, Lubaczeuski C, Zacharias P, Bonfleur ML, Franci
 958 CR & Sanvitto GL 2013 Prevention of metabolic disorders and
 959 reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II
 960 AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. *Physiology &
 961 behavior* **119** 1–8. (doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.029)

- 962 59. Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Garcia-
963 Galiano D, Manfredi-Lozano M, Leon S, Romero-Ruiz A, Diéguez
964 C, Pinilla L & Tena-Sempere M 2013 Metabolic programming of
965 puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional
966 challenges. *Endocrinology* **154** 3387–3400. (doi:10.1210/en.2012-
967 2157)
- 968 60. Scherer PE 2006 Adipose tissue: from lipid storage
969 compartment to endocrine organ. *Diabetes* **55** 1537–1545.
970 (doi:10.2337/db06-0263)
- 971 61. Sclafani a. & Springer D 1976 Dietary obesity in adult rats:
972 Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes.
973 *Physiology and Behavior* **17** 461–471. (doi:10.1016/0031-
974 9384(76)90109-8)
- 975 62. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR,
976 Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM,
977 Hendrick AG *et al.* 2003 The GPR54 gene as a regulator of
978 puberty. *The New England journal of medicine* **349** 1614–1627.
979 (doi:10.1097/00006254-200405000-00020)
- 980 63. Sisk CL & Foster DL 2004 The neural basis of puberty and
981 adolescence. *Nature neuroscience* **7** 1040–1047.
982 (doi:10.1038/nn1326)
- 983 64. Smith JT & Spencer SJ 2012 Prewaning Over- and
984 Underfeeding Alters Onset of Puberty in the Rat Without Affecting
985 Kisspeptin. *Biology of Reproduction* **86** 145–145.
986 (doi:10.1095/biolreprod.111.097758)
- 987 65. Smith JT, Acohido B V., Clifton DK & Steiner R a. 2006 KiSS-
988 1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal*
989 *of Neuroendocrinology* **18** 298–303. (doi:10.1111/j.1365-
990 2826.2006.01417.x)
- 991 66. Takahashi KA & Cone RD 2005 Fasting induces a large,
992 leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency
993 of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related
994 protein neurons. *Endocrinology* **146** 1043–1047.
995 (doi:10.1210/en.2004-1397)
- 996 67. Terasawa E, Kurian JR, Keen KL, Shiel N a., Colman RJ &
997 Capuano S V. 2012 Body weight impact on puberty: Effects of
998 high-calorie diet on puberty onset in female rhesus monkeys.
999 *Endocrinology* **153** 1696–1705. (doi:10.1210/en.2011-1970)
- 1000 68. Urbanski HF & Ojeda SR 1985a In vitro simulation of
1001 prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release
1002 enhances progesterone and 17 beta-estradiol secretion from
1003 immature rat ovaries. *Endocrinology* **117** 638–643.
1004 (doi:10.1210/endo-117-2-638)

- 1005 69. Urbanski HF & Ojeda SR 1985b The juvenile-peripubertal
1006 transition period in the female rat: establishment of a diurnal
1007 pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*
1008 **117** 644–649. (doi:10.1210/endo-117-2-644)
- 1009 70. Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Rogol AD,
1010 Lovejoy JC, Sheffield-Moore M, Mauras N & Bowers CY 2005
1011 Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and
1012 puberty. *Endocrine Reviews* **26** 114–146. (doi:10.1210/er.2003-
1013 0038)
- 1014 71. Wahab F, Ullah F, Chan Y-M, Seminara SB & Shahab M
1015 2011 Decrease in hypothalamic Kiss1 and Kiss1r expression: a
1016 potential mechanism for fasting-induced suppression of the HPG
1017 axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hormone*
1018 *and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung =*
1019 *Hormones et métabolisme* **43** 81–85. (doi:10.1055/s-0030-
1020 1269852)
- 1021 72. Xu R, Wan Y, Tang Q, Wu J & Cai W 2008 The effects of
1022 high fat on central appetite genes in Wistar rats: a microarray
1023 analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical*
1024 *chemistry* **397** 96–100. (doi:10.1016/j.cca.2008.07.027)

1025

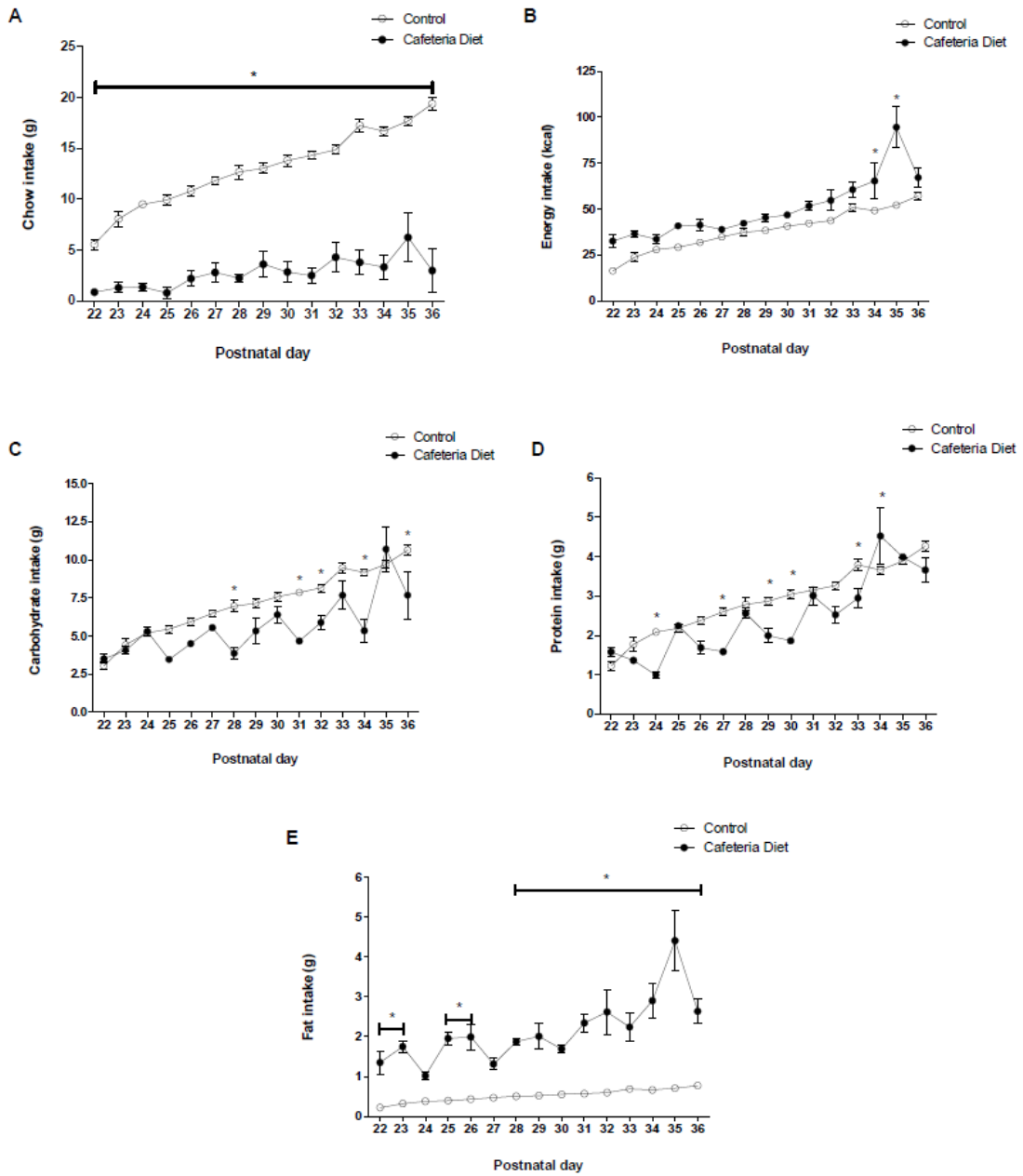


Figure 1
 Cafeteria Diet decreases chow and increases energy and fat intake in juvenile and peripubertal. (A) Chow intake from weaning (21 days) to puberty onset. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 5$ and Cafeteria Diet $n = 4$. Factorial repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. $*P < 0.05$. Cafeteria Diet increase energy intake and fat intake in peripubertal and early pubertal period (B) Energy intake from weaning (day 21 post-natal) to puberty onset. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 5$ and Diet Cafeteria $n = 4$. Factorial repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. $*P < 0.05$. (C) Carbohydrate intake from weaning (day 21 post-natal) to puberty onset. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 5$ and Cafeteria Diet $n = 4$. Factorial repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. $*P < 0.05$. (D) Protein intake from weaning (postnatal day 21) to puberty onset. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 5$ and Cafeteria Diet $n = 4$. Factorial repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. $*P < 0.05$. (E) Fat intake from weaning (day 21 post-natal) to puberty onset. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 5$ and Cafeteria Diet $n = 4$. Factorial repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. $*P < 0.05$

1026

1027

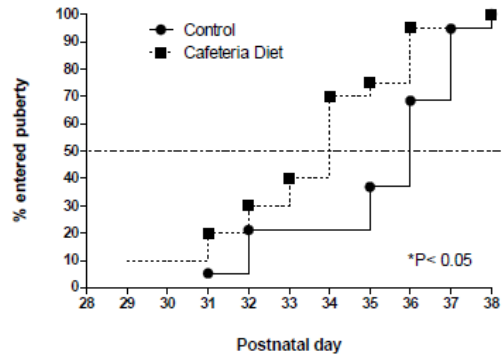


Figure 2

Cafeteria Diet advances vaginal opening. Kaplan-Meier survival curves showing the proportion of animals with the vaginal opening. The dotted horizontal line represents the point at which 50% of the animals showed vaginal opening. Control n = 19 and Cafeteria Diet n = 20. Mantel-Cox test. *P < 0.05.

1028

1029

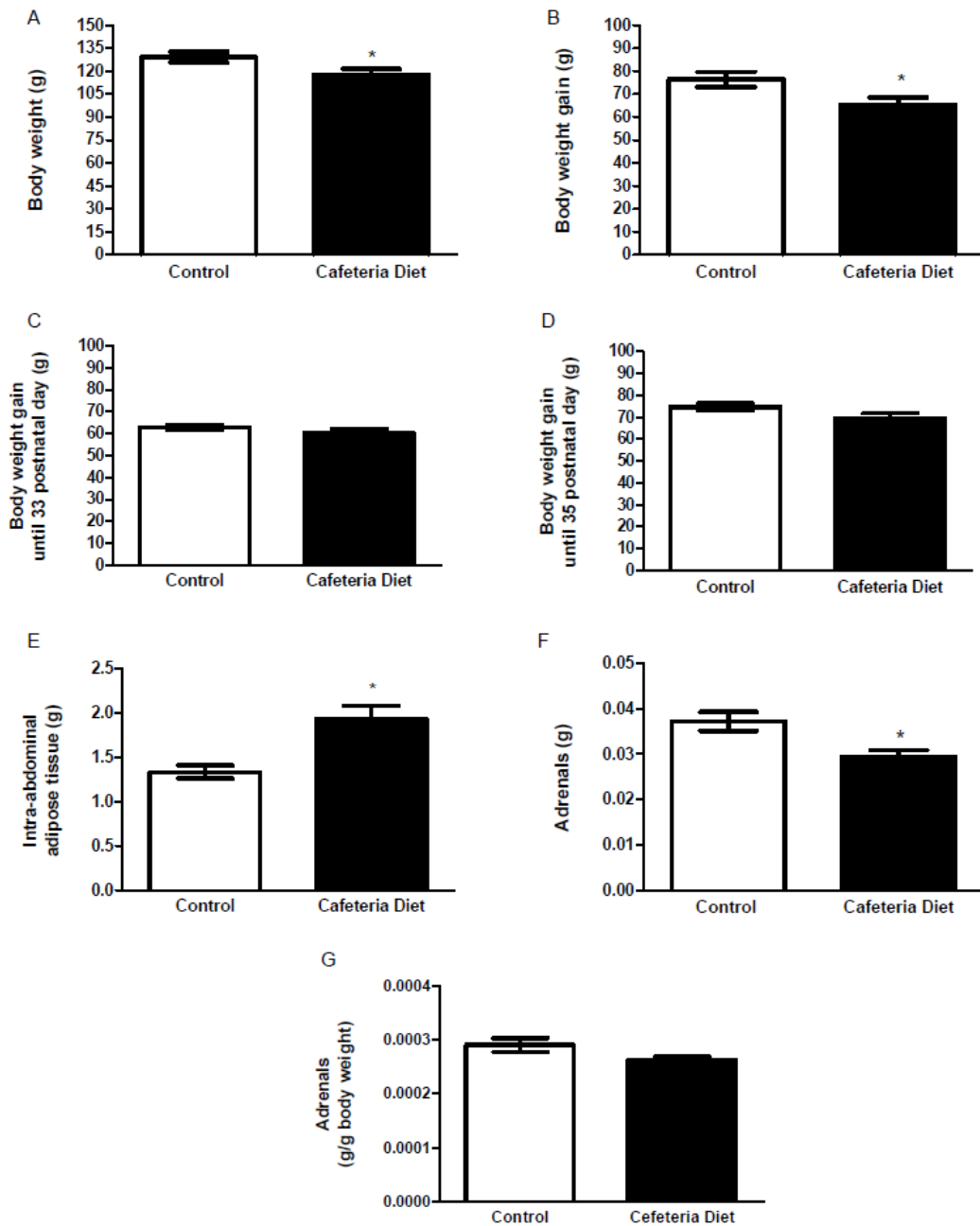


Figure 3

Cafeteria Diet increases intra-abdominal adipose tissue and ovary weight on the day of vaginal opening. (A) Body weight on the day of vaginal opening. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 19$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Student t test. * $P < 0.05$. (B) Body weight gain from weaning (postnatal day 21) to the day of vaginal opening. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 19$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Student t test. * $P < 0.05$. (C) Body weight gain from weaning (postnatal day 21) to postnatal day 33. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 19$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Student t test. $P > 0.05$. (D) Body weight gain from weaning (postnatal day 21) to postnatal day 35. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 19$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Student t test. $P > 0.05$. (E) Intra-abdominal adipose tissue weight on the day of vaginal opening. The intra-abdominal adipose tissue comprises mesenteric, perigonadal, perirenal and retroperitoneal adipose tissue. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 18$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Welch's t test. * $P < 0.05$. (F) Adrenals weight on the day of vaginal opening. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 18$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Student t test. * $P < 0.05$. (G) Adrenals weight normalized by body weight on the day of vaginal opening. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control $n = 18$ and Cafeteria Diet $n = 20$. Student t test. $P > 0.05$.

1030

1031

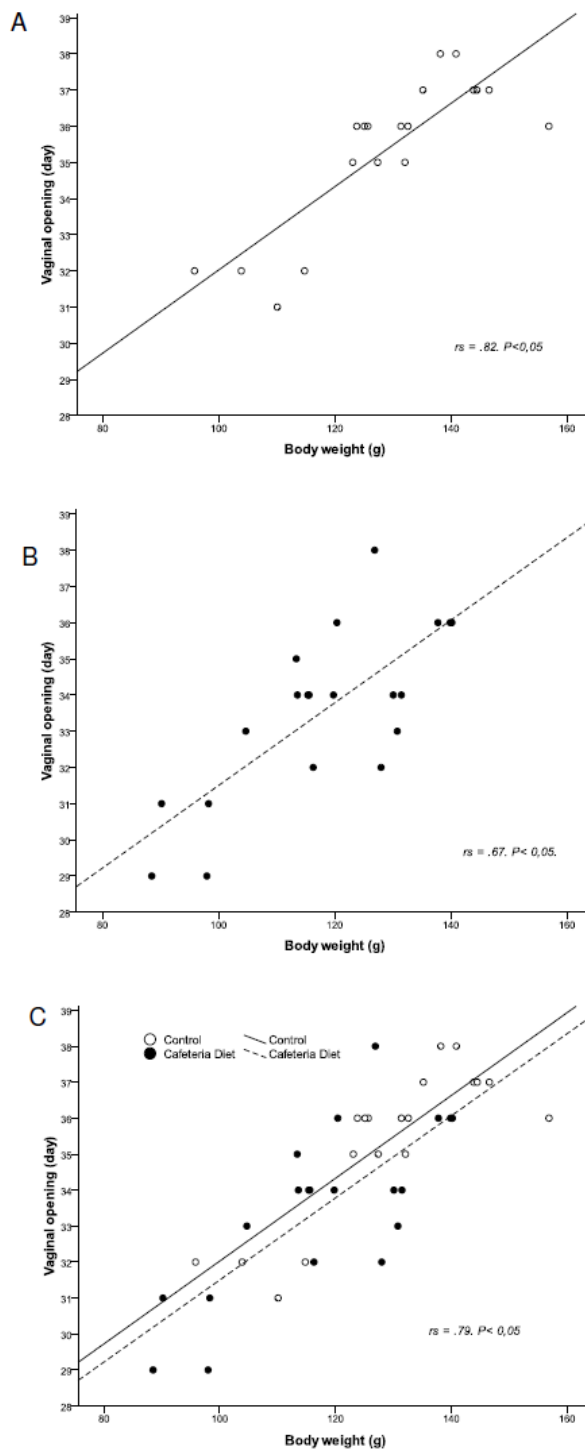


Figure 4

Body weight is correlated with the day of vaginal opening. (A)Correlation between the body weight and the day of vaginal opening in the Control group (n=19).(B) Correlation between the body weight and the day of vaginal opening in Cafeteria Group (n=20). (C) Correlation between the body weight and the day of vaginal opening considered all data. Spearman’s correlation test (r_s).

1032

1033

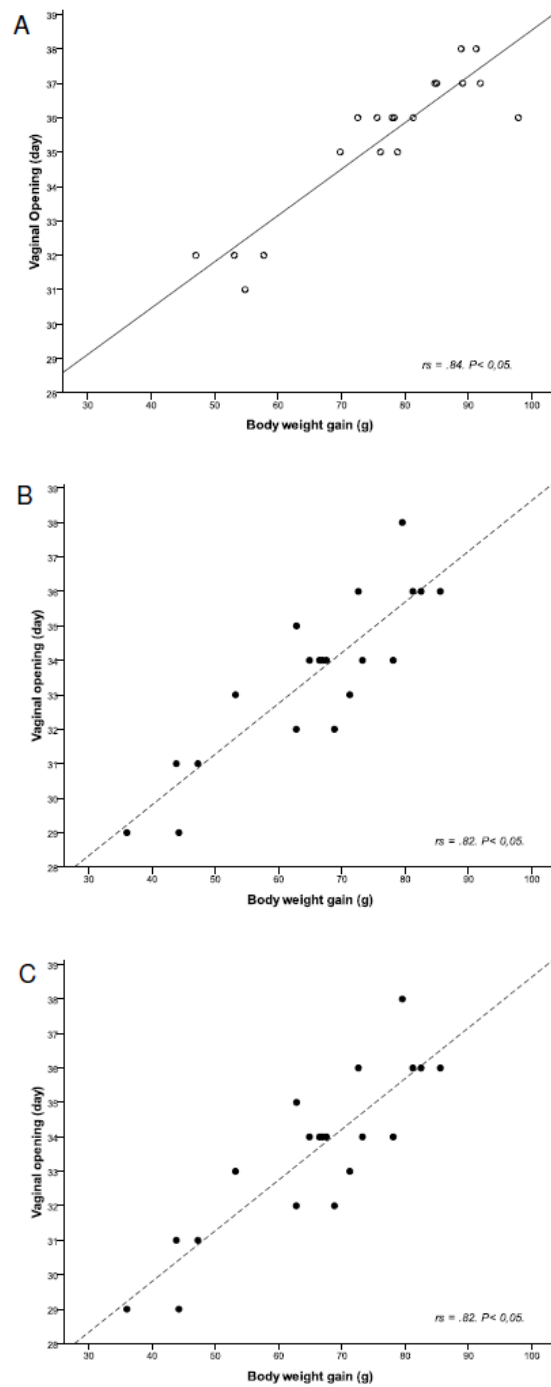


Figure 5

The body weight gain is correlated with the day of vaginal opening. (A) Correlation between body gain and the day of vaginal opening in the Control group (n=19). (B) Correlation between body weight gain and the day of vaginal opening in the Cafeteria Diet group (n=20). (C) Correlation between body weight gain and the day of vaginal opening considered all data (n=39). Spearman's correlation test (r_s).

1034

1035

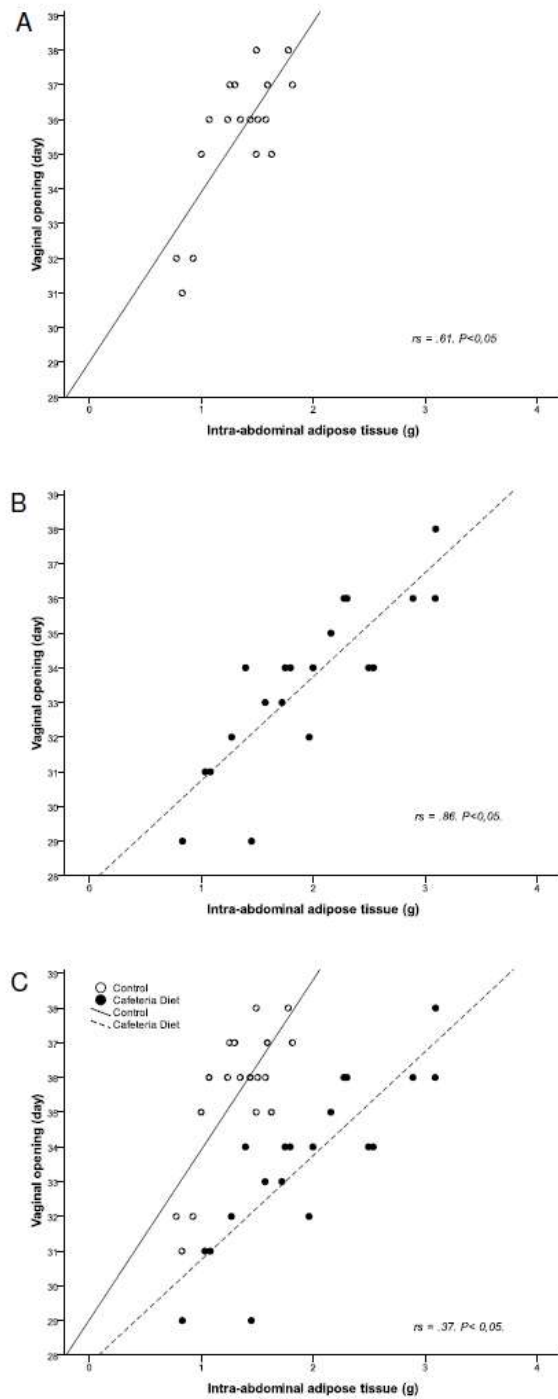


Figure 6

Intra-abdominal adipose tissue is correlated with the day of vaginal opening. (A) Correlation between the weight of intra-abdominal adipose tissue and the day of vaginal opening in the Control group (n=18). (B) Correlation between the weight of intra-abdominal adipose tissue and the day of vaginal opening in the Cafeteria Diet Group (n=20). (C) Correlation between the weight of intra-abdominal adipose tissue and the day of vaginal opening considered all data (n=38). Spearman's correlation test (r_s).

1036

1037

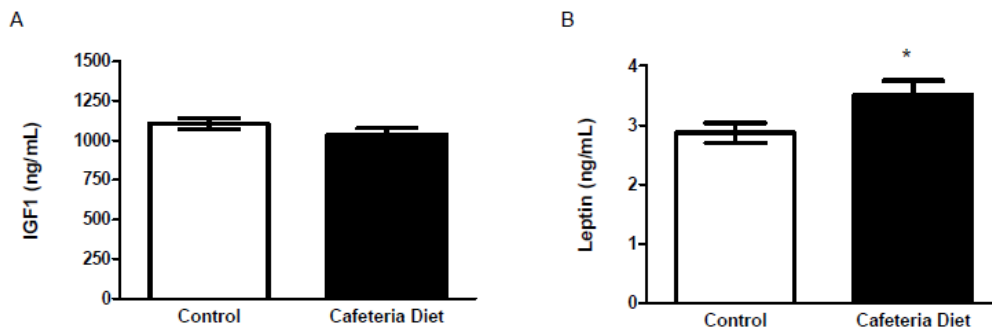


Figure 7

Cafeteria Diet increases serum Leptin on the day of vaginal opening. (A) Serum IGF1 on the vaginal opening. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. instead of median and percentiles (P) 25th and 75th. Control group: median = 1132 ng / mL, P25th = 1011 ng / mL, P75th = 1212 ng / mL ; Cafeteria Diet group: median = 1008 ng / mL, P25th= 928.90 ng / mL, P75th = 1124 ng / mL. Control n = 17 and Cafeteria Diet n = 19. Mann-Whitney test. $P > 0.05$. (B) Serum Leptin on the day of vaginal opening. Values are mean and vertical bars are \pm S.E.M. Control n = 18 and Cafeteria Diet n = 19. Student t test. * $P < 0.05$.

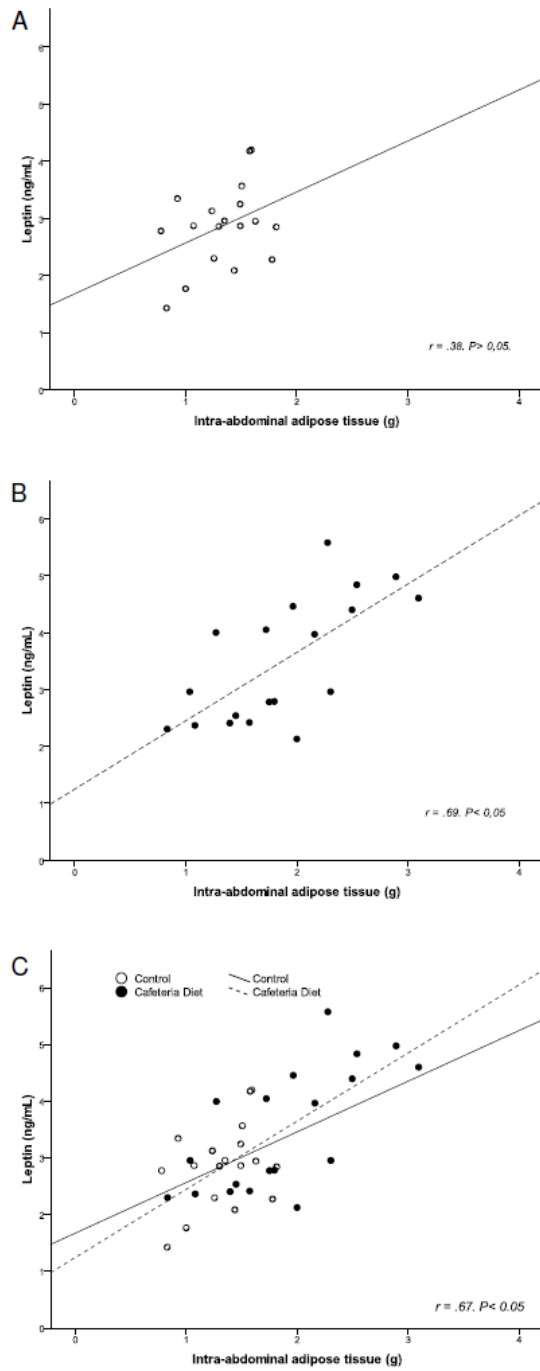


Figure 8

Intra-abdominal adipose tissue and Leptin are correlated in Cafeteria Diet rats. (A) Correlation between the intra-abdominal adipose tissue and serum Leptin on the day of vaginal opening in the Control group (n=18). (B) Correlation between the intra-abdominal adipose tissue and serum Leptin on the day of vaginal opening in Cafeteria Diet group (n=19). (C) Correlation between the intra-abdominal adipose tissue and serum Leptin on the day of vaginal opening considered all data (n=37). Pearson's correlation test (rs).

1040

1041

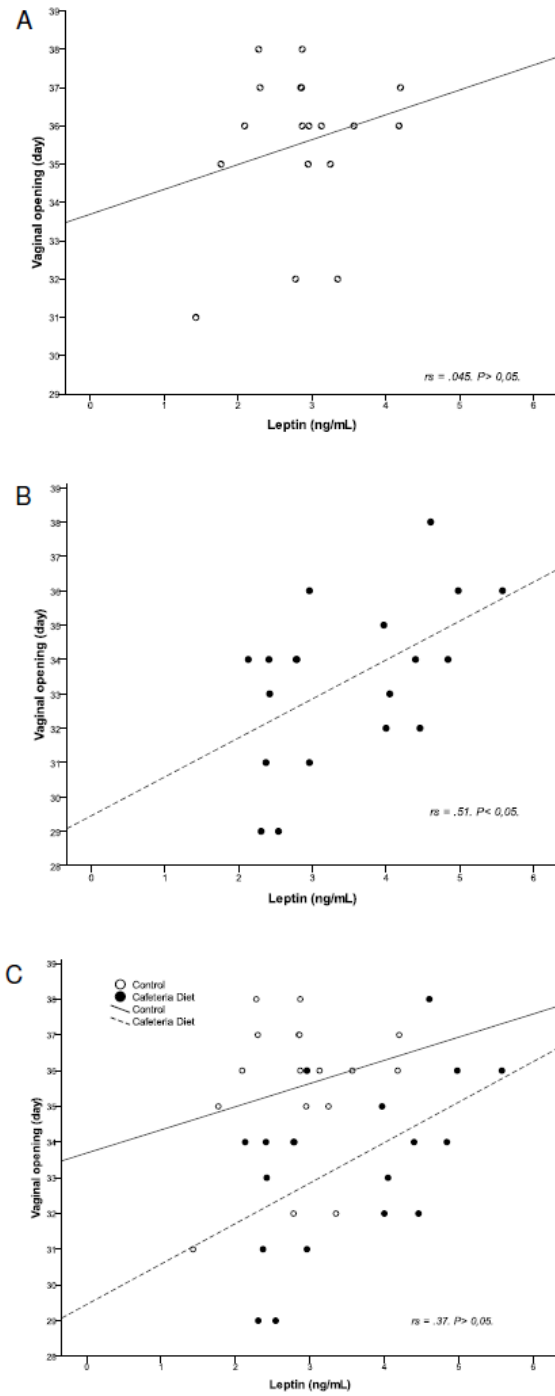


Figure 9

Leptin and vaginal opening are correlated in Cafeteria Diet rats. (A) Correlation between serum Leptin and the day of vaginal opening in the Control group (n=18). (B) Correlation between serum Leptin and the day of vaginal opening in the Cafeteria Diet Group (n=19). (C) Correlation between serum Leptin and the day of vaginal opening considered all data (n=37). Spearman's correlation test (r_s).

1042

1043

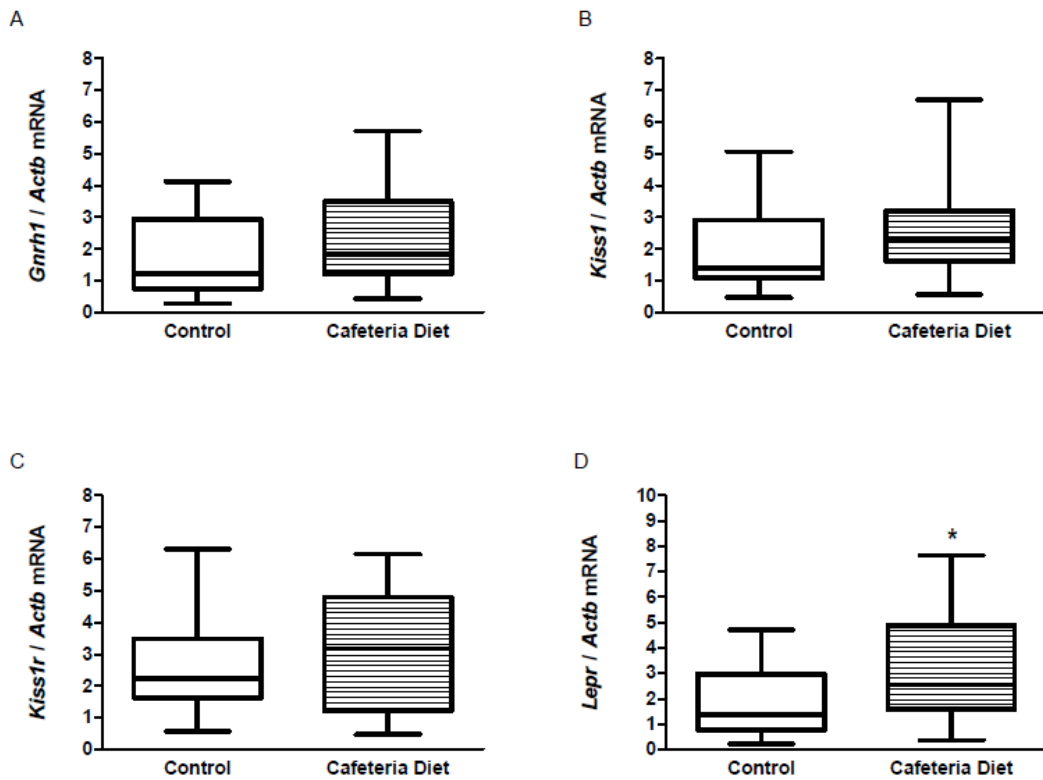


Figure 10

Cafeteria Diet increases *Lepr* mRNA expression in Cafeteria Diet rats. (A) *Gnrh1* mRNA expression in the brain samples on the day of vaginal opening. The value of the median is represented by the horizontal bar inside the box plot and percentiles 25th and 75th are represented by lower and upper limits, respectively, of the box plot. Control n = 16 and Cafeteria Diet n = 14. Mann-Whitney test. (B) *Kiss1* mRNA expression in the brain samples on the day of vaginal opening. The value of the median is represented by the horizontal bar inside the box plot percentiles 25th and 75th by lower and upper limits, respectively, of the box plot. Control n = 16 and Cafeteria Diet n = 14. Mann-Whitney test. (C) *Kiss1r* mRNA expression in the brain samples on the day of vaginal opening. The value of the median is represented by the horizontal bar inside the box plot percentiles 25th and 75th are represented by lower and upper limits, respectively, of the box plot. We opted for the graphic representation in median and percentiles rather than mean and \pm S.E.M. Control group (n = 16): mean = 1.87 ± 0.36 ; Cafeteria Diet group (n = 14): mean = 3.26 ± 0.60 . Student t test. (D) *Lepr* mRNA expression in the brain samples on the day of vaginal opening. The value of the median is represented by the horizontal bar inside the box plot and percentiles 25th and 75th are represented by lower and upper limits, respectively, of the box plot. Control n = 16 and Cafeteria Diet n = 14. Mann-Whitney test. * P < 0.05.

1046 **Table 1.** Food available to the rats in Cafeteria Diet group. Values are the content per gram of food.

Food/Scheme	Kcal	Carbohydrate (g)	Protein (g)	Fat (g)
Scheme A				
Salami (Majestade, Brazil)	3,38	0,00	0,32	0,24
Bread Seven Boys (Seven Boys, Brazil)	3,10	0,55	0,11	0,05
Snack Yokitos Cheese (Yoki, Brazil)	4,84	0,60	0,06	0,24
Deliket Jelly Bean (Dori Alimentos, Brazil)	3,80	0,95	0,00	0,00
Soft drink (Coca-Cola, Brazil)	0,43	0,11	0,00	0,00
Scheme B				
Smoked sausage (Sadia, Brazil)	3,20	0,00	0,18	0,28
Chocolate cake (Nutrella, Brasil)	3,18	0,48	0,05	0,12
Biscuit maisena (Isabela, Brazil)	4,46	0,73	0,09	0,13
Marshmallow (Fini, Brazil)	3,35	0,79	0,05	0,00
Soft drink (Coca-Cola, Brazil)	0,43	0,11	0,00	0,00
Scheme C				
Ham (Sadia, Brazil)	1,55	0,00	0,17	0,09
Snack Fritello (Pavioli, Brazil)	5,08	0,52	0,08	0,29
Wafer biscuit chocolate (Bauducco, Brazil)	5,23	0,63	0,05	0,27
Gumdrop Gomets (Dori Alimentos, Brazil)	3,60	0,90	0,00	0,00
Soft drink (Coca-Cola, Brazil)	0,43	0,11	0,00	0,00

1047

1048

1049 **Table 2.** Nucleotides primer sequences used for qPCR amplification of *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1*, *Lepr* and
 1050 *Actb* mRNA.

Access Number ^a	Gene	Nucleotides sequence 5' → 3'	Product size (bp) ^b
NM_181692.1	Kiss1	<i>Forward: AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT</i> <i>Reverse: GCATACCGCGGGCCCTTTT</i>	139
NM_023992.1	Kiss1r	<i>Forward: GCAGACCGTCACCAATTTCT</i> <i>Reverse: GGGAACACAGTCACGTACCA</i>	222
NM_012767.2	Gnrh1	<i>Forward: GCAGAACCCCAGAACTTCGA</i> <i>Reverse: TGCCCAGCTTCTCTTCAAT</i>	101
NM_012596.1	Lepr	<i>Forward: TGTTCTGGGCACAAGGACTTA</i> <i>Reverse: ACCATAGCTGCTGGTACCATCTCA</i>	179
NM_031144.3	Actb	<i>Forward: ACCTTCAACACCCCAGCCATG</i> <i>Reverse: GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC</i>	309

1051

1052

1053 **Table 3**

1054 Ovary and uterus weight and the concentration of Luteinizing Hormone and Estradiol-
 1055 17beta on the day of vaginal opening in Cafeteria Diet rats.

	Control	Cafeteria Diet
Ovary weight (mg)	27.65 ± 1.06	32.22 ± 2.22
Ovary weight (mg/g body weight)	0.23 ± 0.01	0.28* ± 0.02
Utero weight (mg)	175.60 ± 22.80	174.00 ± 18.87
Utero weight (mg/g body weight)	1.36 ± 0.17	1.46 ± 0.15
Luteinizing Hormone (mIU/mL)	1.33 ± 0.18	1.54 ± 0.21
Estradiol-17beta (ng/mL)	4.25 ± 0.52	5.75 ± 0.74

1056 Values are mean ± S.E.M. For ovary weight and uterus weight, Control n=18 and Cafeteria Diet= 20.
 1057 For serum Luteinizing Hormone, Control n= 15 and Cafeteria Diet n= 19. For serum Estradiol-17beta,
 1058 Control n= 17 and Cafeteria Diet n= 18.

1059

1060 **Table 4**

1061 Correlation of *Gnrh1* mRNA with vaginal opening and peripheral and central
 1062 regulators of puberty onset in Cafeteria Diet rats.

	Control	Cafeteria Diet	All data
	<i>Gnrh1</i> mRNA		
Vaginal opening (day)	.40 (n=16)	.27 (n=14)	.17 (n=30)
Luteinizing Hormone mIU/mL	.76 (n=13)	.05 (n=12)	.45 (n=25)
Leptin (ng/mL)	.13 (n=15)	.24 (n=14)	.24 (n=29)
IGF1 (ng/mL)	-.15 (n=15)	.25 (n=13)	.14 (n=28)
<i>Kiss1</i> mRNA	.88 (n=16)	.78 (n=14)	.87 (n=30)

1063 Values outside the brackets are Spearman's correlation coefficient. Values in bold mean that variables
 1064 correlate significantly ($P < 0.05$).

1065

1066 **Table 5**

1067 Correlation of *Kiss1* mRNA with vaginal opening and peripheral and central
 1068 regulators in Cafeteria Diet rats.

	Control	Cafeteria Diet	All data
	<i>kiss1 mRNA</i>		
Vaginal opening (day)	.31 (n=16)	.49 (n=14)	.24 (n=30)
Leptin (ng/mL)	.06 (n=15)	.13 (=14)	.34 (n=24)
IGF1 (ng/mL)	.04 (n=15)	.43 (n=13)	-.04 (n=28)
Estradiol-17beta (ng/mL)	.06 (n=14)	-.38 (n=13)	.01 (n=27)

1069 Values outside the brackets are Spearman's correlation coefficient.

1070

1071 **Table 6**

1072 Correlation of *Kiss1r* mRNA with vaginal opening and peripheral and central
 1073 regulators in Cafeteria Diet rats.

	Control	Cafeteria Diet	All data
	<i>Kiss1r mRNA</i>		
Vaginal opening (day)	-.04 (n=16)	.35 (n=14)	.10 (n=30)
Leptin (ng/mL)	.05 (n=15)	.39 (=14)	.33 (n=29)

1074 Values outside the brackets are Spearman's correlation coefficient.

1075

1076