

Revisiones

THE ZUCKER RAT AS A MODEL FOR STUDYING REPRODUCTIVE FUNCTION

The Zucker rat, a strain first described in 1961, shows multiple pathological alterations, such as obesity, infertility, insulin resistance, reduced energy expenditure, and multiple neuroendocrine alterations. The initial genetic failure of this strain is a leptin receptor missense mutation. In the present review, we analyze the characteristics of hypothalamic-pituitary-gonadal axis function, with special emphasis on the mechanisms of action involved in the different neuroendocrine alterations and on gene therapy approaches. Alterations in reproductive function and the possible future areas of interest in this field are also discussed.

Key words: Zucker. Hypothalamus. Pituitary gland. Gonads.

La rata Zucker como modelo para el estudio de la función reproductora

ENRIQUE AGUILAR BENÍTEZ DE LUGO Y LEONOR PINILLA JURADO

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

Las ratas Zucker, descritas por primera vez en 1961, constituyen una cepa con patología múltiple que incluye obesidad, infertilidad, resistencia insulínica, disminución del gasto energético y múltiples alteraciones neuroendocrinas. La causa originaria de esta patología es una mutación en el gen de la leptina, que induce alteraciones neuroendocrinas variadas. En la presente revisión se analizan las características de la función del eje hipotálamo/hipófisis/gónadas, con especial énfasis en la etiopatogenia de las alteraciones observadas y los ensayos de terapia génica desarrollados. También se analizan las alteraciones en la conducta reproductora y las incógnitas que el modelo plantea en la actualidad.

Palabras clave: Zucker. Hipotálamo. Hipófisis. Gónadas.

INTRODUCCIÓN

La obtención en la década de los sesenta por Lois y Theodore Zucker^{1,2} de una cepa de ratas (denominadas desde entonces ratas "Zucker") que mostraban obesidad de aparición juvenil, aumento de la ingesta de alimentos, disminución del gasto energético y resistencia insulínica ha proporcionado a los investigadores un excelente modelo experimental que ha sido utilizado frecuentemente para el estudio de muchas enfermedades como la obesidad, la hiperlipemia, el fallo renal, la diabetes, las alteraciones en el sistema inmunitario, etc.³⁻⁵, y además, ha supuesto un extraordinario avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos, el peso corporal y el gasto energético.

Desde el punto de vista neuroendocrinológico, se ha estudiado la rata Zucker fundamentalmente en aspectos relacionados con la ingesta de alimentos, el balance energético, la función reproductora y la secreción de somatotropina (GH). En relación a esta última, la alteración hipofisaria más clara de la rata Zucker es la disminución de la secreción de GH⁶⁻⁸. El número de picos secretorios de la hormona y sus concentraciones séricas están significativamente disminuidas; esta alteración es evidente tanto en ratas hembras como en machos^{7,8}. La hiposecreción de GH no parece deberse a una alteración del tono somatostatinérgico^{9,10}, sino estar relaciona-

Correspondencia: Dr. E. Aguilar.
Sección de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.
Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. España.
Correo electrónico: fi1agbee@uco.es

Manuscrito recibido el 19-9-2005 y aceptado para su publicación el 27-2-2006.

da con alteraciones en la síntesis y la secreción de la hormona liberadora de GH (GHRH), a las que se une una disminución de la respuesta hipofisaria a éste que ha sido puesta de manifiesto tanto in vivo como in vitro¹¹⁻¹². En paralelo, se ha descrito una disminución del contenido hipofisario de GH y del ARN mensajero (ARNm) para GH solamente en ratas macho^{6,7}. Asimismo, las descripciones iniciales de las alteraciones en la rata Zucker mostraron importantes modificaciones de la función reproductora; la más destacada es la infertilidad¹³. Considerando la importante relación entre los sistemas de control de la ingesta, el peso corporal y la aparición y el mantenimiento de la capacidad reproductora¹⁴⁻¹⁶, parece razonable asumir que alteraciones neuroendocrinas están involucradas en la patología general de esta cepa de ratas. En esta revisión abordaremos fundamentalmente las características reproductoras de la rata Zucker.

ALTERACIONES REPRODUCTIVAS EN LA RATA ZUCKER HEMBRA

Las ratas Zucker presentan pubertad retrasada (con apertura vaginal a los 54 días frente a los 38,6 en sus controles)¹⁷ y, en un 90% de los casos, ciclos estrales prolongados (7 a 8 días de duración) con aumento de la fase de diestro, con gran desarrollo lúteo y escaso desarrollo folicular^{17,18} (tabla 1). Estos fallos en el ciclo se acompañan de concentraciones plasmáticas de estradiol disminuidas y de progesterona incrementadas¹⁸.

En las ratas Zucker hembra el *feedback* positivo estradiol-lutropina (LH) funciona¹⁹ y el estudio histológico de los ovarios muestra que hay cuerpos lúteos, índice de que se producen ovulaciones. Igualmente, la administración a ratas Zucker prepúberes de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) induce ovulación²⁰. El estudio del útero de la rata Zucker ha mostrado datos contradictorios. Inicialmente se describieron úteros subdesarrollados¹ aunque, posteriormente, Chelich y Edmonds²¹ describieron úteros normales. También se ha descrito ausencia de pseudopreñez y formación de decidua tras la estimulación del cérvix¹³.

Los estudios iniciales, en los que no se analizó el patrón pulsátil de secreción de LH, no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de gonadotropinas entre las ratas Zucker hembras y sus controles²², sin embargo, estudios posteriores han demostrado que en la rata Zucker hembra adulta no se observa secreción pulsátil de LH¹⁹, y durante el ciclo estral, el pico de LH en la tarde de proestro está reducido²³. Asimismo, se ha descrito que estas ratas también presentan a lo largo del ciclo modificaciones de las concentraciones plasmáticas de folitropina (FSH) y prolactina (PRL)²³.

La ausencia de secreción pulsátil de LH en la rata Zucker se explicaría por la falta de estímulo de la gonadolibarina (GnRH) que, a su vez, se debería a la au-

TABLA 1. Características reproductoras de la rata Zucker hembra

	Referencias
Retraso puberal	17
Ciclos irregulares de 7-8 días de duración	17, 18
Concentración plasmática de estradiol normal o disminuida durante el ciclo	18, 23, 29
Concentración plasmática de progesterona elevada	18, 23
Peso del útero normal o atrófico	1, 21
Ausencia de pseudopreñez y deciduación tras estímulo del cérvix	13
Secreción normal de GnRH durante etapas prepuberales	25
Disminución de la secreción pulsátil de LH (amplitud de los picos y secreción media)	19
Pico preovulatorio de LH atenuado	23
Funcionamiento normal del <i>feedback</i> estradiol-LH	19
Disminución de receptores estrogénicos en área preóptica e hipotálamo mediobasal	23, 35
Disminución de la receptividad sexual que mejora tras la administración de estradiol y progesterona	1, 13, 32

GnRH: gonadolibarina; LH: lutropina.

sencia de la acción estimuladora de la leptina característica de esta cepa de ratas. Esta hipótesis concuerda con la desaparición de la secreción pulsátil de LH tras el tratamiento crónico de ratas hembra con antisuero antileptina²⁴. Sin embargo, el único estudio sobre secreción pulsátil de GnRH en ratas Zucker hembra se ha realizado a la edad de 15 días y muestra que el patrón de secreción pulsátil de GnRH es semejante al que presentan las ratas controles (pulsos cada 64 ± 3 frente a 63 ± 3 min en ratas controles)²⁵. Estos datos indican que las alteraciones en las hembras aparecen en la edad adulta, lo que indica un progresivo deterioro del eje reproductor cuyas causas son por ahora desconocidas.

Los sistemas de retroalimentación entre las gónadas y eje hipotálamo-hipófisis funcionan, al menos parcialmente, en la rata Zucker hembra ya que en ellas la ovariectomía aumenta la ingesta de alimentos y el peso corporal²⁶ e incrementa la secreción de gonadotropinas²⁷. Sin embargo, la administración sistémica de benzoato de estradiol durante una o 2 semanas no modifica el peso corporal en ratas obesas, mientras que los efectos en la ingesta dependen de la dosis, la vía de administración empleada y la duración del tratamiento.

ALTERACIONES REPRODUCTIVAS EN LA RATA ZUCKER MACHO

En las ratas Zucker macho las concentraciones plasmáticas de LH y FSH y la respuesta a la estimulación con GnRH son normales²⁸ (tabla 2). Los datos anteriormente mencionados indican que hay una diferencia entre sexos en la secreción de gonadotropinas en la rata Zucker; son más evidentes las alteraciones en las hembras que en los machos, y en las hembras aparecen progresivamente y se manifiestan plenamente tras el desarrollo puberal.

TABLA 2. Características reproductoras de la rata Zucker macho

	Referencias
Alteraciones morfológicas de las células de Leydig	28
Concentración plasmática de testosterona disminuida	28-31
Reducción del peso de órganos dependientes de andrógenos	29
Concentraciones plasmáticas de LH y FSH normales	28
Concentración plasmática de PRL normal	8
Respuesta de gonadotropinas a GnRH normal	28
Respuesta de gonadotropinas a GnRH incrementada	22
Disminución del volumen cerebral y del núcleo sexual dimórfico del hipotálamo	31
Disminución de la actividad copulatoria	30, 36

FSH: folitropina; GnRH: gonadoliberina; LH: lutropina; PRL: prolactina.

Los datos publicados sobre concentraciones de testosterona sérica en esta cepa de ratas son conflictivos. Se ha descrito una disminución importante (50%) de las concentraciones de testosterona a los 3 meses de edad y, en menor grado, a los 2 y 4 meses; los valores se normalizan a partir del quinto mes^{28,29}. Otros autores^{30,31} sólo han observado descensos esporádicos de las cifras de testosterona. Los pesos de los órganos dependientes de andrógeno están disminuidos en las ratas Zucker²⁹, lo que se explica por un descenso en los valores de testosterona en plasma o por posibles alteraciones en su mecanismo de acción.

En ratas Zucker en condiciones *freely moving* las concentraciones de PRL, medidas durante 6 h a intervalos de 15 min, fueron similares a las de las ratas controles⁸, aunque se ha descrito recientemente que en ellas la concentración plasmática del péptido liberador de prolactina (PrRP) se encuentra disminuido un 35%³².

ALTERACIONES EN LOS PATRONES DE CONDUCTA REPRODUCTIVA

Las ratas Zucker hembras intactas y tratadas con PMSG muestran el comportamiento sexual atenuado (cociente de lordosis y actividad procreadora)^{1,13,33}. Aunque las causas de estas alteraciones no son bien conocidas, se ha especulado con posibles alteraciones en la actividad de diferentes neurotransmisores-neuropéptidos y de hormonas esteroideas. Así, por ejemplo, el bloqueo del sistema opioide mejora estos parámetros de conducta³⁴. Considerando que los efectos en la conducta de los estrógenos dependen de la concentración de sus receptores en el hipotálamo³⁵, se ha postulado que una parte de las alteraciones reproductivas pueden estar asociadas a cambios en éstos. En apoyo de esta hipótesis se ha señalado que mientras que las concentraciones de receptores de progesterona en área preóptica e hipotálamo mediobasal son semejantes en las ratas Zucker y en sus controles, los receptores estrogénicos están disminuidos en ambas zonas²³ y, más concretamente, estudios inmunocitoquímicos han detectado que hay un déficit en los receptores estrogénicos

de tipo alfa³⁶. Según los anteriores considerandos se explica que, administrando dosis altas de estradiol (hasta 100 µg), se consiga en las ratas Zucker unos patrones de conducta sexual similares a los presentados por las ratas controles.

También se ha descrito alteraciones en el comportamiento reproductivo de las ratas Zucker macho. Menos del 20% tiene actividad copulatoria y la mayoría de estas ratas no eyaculan^{30,37}. Se ha postulado que estas deficiencias pudieran deberse al déficit de testosterona que presentan estos animales^{28,29}, ya que tratamientos prolongados con altas dosis de testosterona mejoran la actividad copulatoria³⁷, lo que no sucede con tratamientos más cortos y con menores dosis³⁰.

ETIOPATOGENIA DE LAS ALTERACIONES REPRODUCTIVAS DE LA RATA ZUCKER

En cuanto al hipotálamo, la rata Zucker se caracteriza por un fallo en el receptor para leptina³⁸, lo que origina, además de una resistencia a esta hormona, una hiperproducción de neuropéptido Y (NPY) con una posible desensibilización de sus receptores y una disminución de la síntesis del GALP (*galanin-like peptide*) y un aumento de la sensibilidad de sus receptores. A continuación vamos a abordar algunos de los sistemas de control de la función hipotálamo-hipofisaria alterados en las ratas Zucker.

Leptina. La rata Zucker (ratas fa/fa), y los ratones db/db se caracterizan por una mutación en el receptor de leptina (Ob-R). La leptina es una molécula clave en el engarce entre el balance energético y la función reproductora^{39,40} y hasta tal punto es una señal importante, que tanto los ratones con mutaciones en el gen que codifica la leptina (ratones ob/ob) como en el gen que codifica su receptor (ratones db/db) son, además de obesos, infértiles^{1,17,38}. La administración de leptina a ratones ob/ob eleva las concentraciones séricas de LH y el peso gonadal⁴¹, mientras que la inmunoneutralización crónica de la acción de la hormona suprime la secreción pulsátil de LH²⁴ y su administración restaura la secreción pulsátil de LH en ratas, monos y ovejas sometidas a restricción dietética⁴²⁻⁴⁴. Se ha postulado (basándose en el escaso efecto hipofisario de la leptina) que el efecto estimulador de la leptina en la secreción de gonadotropinas tiene lugar por su acción estimuladora de la secreción de GnRH⁴⁴⁻⁴⁶, que debe llevarse a cabo a través de interneuronas, ya que la existencia de receptores para leptina en neuronas GnRH⁴⁷ no ha sido confirmada. La acción estimuladora directa en la hipófisis⁴⁴ ha sido puesta en cuestión, ya que el fragmento activo de la molécula (leptina₁₁₆₋₁₃₀) inhibe la secreción de gonadotropinas⁴⁸. Tal como se indica más adelante, la normalización de la actividad biológica de la leptina puede corregir las alteraciones en diferentes neurotransmisores involucrados en el control de la secreción de GnRH y normalizar la función reproductora en las ratas Zucker¹⁸.

NPY. El NPY es un neuropéptido que estimula la toma de alimentos^{48,49} y participa en la regulación de la secreción hipofisaria de gonadotropinas⁵⁰ modificando la liberación de GnRH⁵¹⁻⁵⁵. Los efectos del NPY en el sistema de la GnRH dependen de los *inputs* de origen gonadal; cuando las concentraciones de esteroides gonadales circulantes son normales, el NPY estimula la secreción de GnRH⁵¹⁻⁵⁵, mientras que se ha descrito un efecto inhibitor de la secreción cuando las concentraciones son escasas^{52,54-56}. En la rata Zucker, como consecuencia de la falta de señal leptinérgica, se produce una regulación al alza del sistema NPY⁵⁷⁻⁶¹, lo que da lugar a una sobreexpresión del ARNm para el NPY en el núcleo arcuato y de su contenido en el núcleo paraventricular, supraquiasmático, el área preóptica medial y el hipotálamo ventromedial^{57,58} que puede producir una desensibilización de los receptores de NPY y, como consecuencia, una inhibición de la secreción de GnRH. En este sentido, hay que indicar que la administración crónica de NPY inhibe la secreción de gonadotropinas⁶². Igualmente, en las ratas Zucker, los efectos inhibidores del NPY en las neuronas GABAérgicas en el núcleo paraventricular están disminuidos⁶³.

Betaendorfina. Se ha descrito que la betaendorfina ejerce una influencia tónica inhibitor de la secreción de GnRH y LH^{56,64,65}. Dado que en la rata Zucker se produce una sobreexpresión del NPY y que éste estimula la liberación de betaendorfina, en estas ratas hay un aumento del tono opioide que, además de su posible efecto inhibitor de la secreción de GnRH, puede estar involucrado en los trastornos de la ingesta y la procreación que presentan estos animales. En este sentido numerosos datos indican que la administración de antagonistas opioides disminuye la toma de alimentos^{17,66-69}.

Sistema KiSS/GPR54. El GPR54 es un receptor acoplado a proteínas G, con un 45% de homología con el receptor de galanina, que fue inicialmente clonado en la rata y se catalogó como receptor huérfano⁷⁰. KiSS-1 es el ligando endógeno del GPR54⁷¹⁻⁷³. Hasta la fecha, la caracterización funcional del sistema KiSS-1/GPR54 ha sido muy limitada. Así, inicialmente se implicó al KiSS-1 en el control de la metástasis y la progresión tumoral, y diversas pruebas experimentales indican que la metastina (kisspeptina-54, agonista del receptor GPR54) posee una potente actividad antimetastásica en diversos tumores. A pesar de este número limitado de funciones biológicas adscritas a KiSS-1, los escasos análisis de expresión publicados hasta la fecha evidencian la presencia de este ligando y/o su receptor GPR54 en diversos tejidos y sistemas, como la placenta, diversas áreas del sistema nervioso central (tales como el hipotálamo, los ganglios de la base y la médula espinales), la hipófisis, el páncreas, las gónadas y el plasma sanguíneo⁷⁴⁻⁷⁶. Datos recientes de nuestro grupo muestran el papel del KiSS-1 como potentísimo estimulador de la secreción de GnRH y go-

nadotropinas y su capacidad para acelerar la llegada de la pubertad en ratas hembras⁷⁷⁻⁸⁰. El efecto estimulador del KiSS-1 en la secreción de LH parece estar mediado por la GnRH y es plenamente operativo en la rata Zucker prepúber⁸¹, además de acelerar el desarrollo puberal en ratas subnutridas⁸².

GALP. Recientemente se ha descrito un nuevo péptido de 60 aminoácidos con similitud con la galanina, denominado GALP, que se expresa en el hipotálamo, fundamentalmente en el núcleo arcuato, y la hipófisis⁸³⁻⁸⁶. Este péptido estimula la secreción de LH cuando se administra en los ventrículos cerebrales^{87,88}, efecto mediado, posiblemente, por una estimulación de la secreción de GnRH, ya que se detecta tanto en explantes hipotalámicos como en neuronas GT1⁸⁷. Más del 85% de las neuronas GALP-positivas del núcleo arcuato coexpresan receptores para leptina⁸⁶. En las ratas Zucker y en ratones db/db y ob/ob se produce un descenso del 75% en la expresión de GALP en el núcleo arcuato^{89,90} que, secundariamente, genera una supersensibilidad a la administración intracerebroventricular de GALP⁸⁹.

OTRAS ALTERACIONES HIPOTALÁMICAS

Se han descrito alteraciones en los mecanismos reguladores de la secreción de tirotropina y hormonas tiroideas⁹¹, en la expresión de CRF⁹² y de preproorexina y receptor de orexina en hipotálamo⁹³ y de α -MSH^{94,95} (tabla 3).

TERAPIA GÉNICA EN LA RATA ZUCKER

Para determinar la posible eficacia de la terapia génica en el tratamiento de las alteraciones reproductoras de la rata Zucker, se han introducido vectores con el gen del receptor de leptina en el núcleo arcuato y el núcleo paraventricular. Los resultados obtenidos indican que esta terapia normaliza la mayor parte de los parámetros de procreación alterados en este tipo de ra-

TABLA 3. El funcionamiento hipotalámico de la rata Zucker

	Referencias
Ausencia del receptor de leptina	37
<i>Up-regulation</i> del sistema NPY	57-61
Aumento del tono opioide	66-69
Expresión reducida del ARNm e inmunorreactividad de GALP	89, 90
Expresión reducida del ARNm de preproorexina y del receptor tipo 2 de orexina	93
Expresión reducida del ARNm de proopiomelanocortina en el núcleo arcuato	92, 93
Expresión reducida del ARNm de α -MSH en el núcleo paraventricular	94, 95
Alteraciones en la respuesta de hormonas tiroideas al frío	91

ARNm: ARN mensajero. GALP: *galanin-like peptide*; NPY: neuropéptido Y.

tas, ya que es capaz de acortar los ciclos estrales, aumentar la frecuencia de los estros, disminuir la presencia de cuerpos lúteos y aumentar el desarrollo folicular. Esta normalización de la función ovárica va acompañada de un aumento de la cantidad de estradiol circulante y una disminución de progesterona circulante. Se produce también un aumento de la concentración de GnRH en el hipotálamo y una reducción de la expresión del ARNm que codifica NPY y proopiomelanocortina y betaendorfina¹⁸. Todos estos datos corroboran el papel clave de la leptina en el mantenimiento de una correcta función reproductora e indican que la mayor parte de los déficit reproductores que se encuentran en la rata Zucker son secundarios a la mutación del receptor para la hormona.

PERSPECTIVAS

Los datos encontrados hasta el momento abren numerosas preguntas que, una vez resueltas, ayudarán a entender mejor las características de esta cepa de ratas. Previsiblemente, en el futuro se aclararán algunos de los siguientes aspectos:

– En la rata macho, concentraciones normales de gonadotropinas pueden coincidir con escasez de testosterona. Ello indica que el testículo no responde al estímulo gonadotrópico. Hay que explorar, como mínimo, las siguientes posibilidades: *a*) alteraciones en el número y/o la afinidad de los receptores de LH (y/o FSH); *b*) alteraciones en las enzimas de la esteroidogénesis (P450_{ssc}, 17-βHSD, 3-βHSD etc.), y *c*) alteraciones en los factores reguladores de la esteroidogénesis (StAR, SF-1).

– El eje hipotálamo-hipofisario no responde con incrementos de GnRH/gonadotropinas a la escasez de testosterona, posiblemente por alteraciones en los receptores para testosterona y estrógenos. Se debe analizar la cantidad y la localización de esos receptores en el hipotálamo y la hipófisis durante el desarrollo.

– En la rata hembra, la secreción pulsátil de GnRH es normal en la edad prepúber, mientras que en la edad adulta se producen importantes trastornos en la regulación de la secreción de LH. Esta diferencia no puede deberse exclusivamente al déficit de acción de la leptina, que se produce desde el inicio como consecuencia de la mutación en su receptor. Por lo tanto, es necesario analizar la evolución de las alteraciones en el control de la secreción de GnRH, incluyendo las nuevas señales (KiSS-1, GALP, NPY, etc.).

– En la rata hembra se produce ovulación, y la vida media de los cuerpos lúteos se prolonga (hasta una longitud de ciclo de 7-8 días). Los ciclos se normalizan cuando se implanta en el núcleo arcuato el gen del receptor de leptina. Se debe analizar los mecanismos de regulación de la luteogénesis y la luteólisis, con especial dedicación a los efectos de LH y PRL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered.* 1961;52:275-8.
2. Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1965;131:447-58.
3. Argiles JM. The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988 twenty years of research on the insights of Zucker mutation. *Prog Lipid Res.* 1989;28:53-66.
4. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension.* 1992;19 Suppl 1:1110-5.
5. Plotkin BJ, Paulson D. Zucker rat (fa/fa), a model for the study of immune function in II diabetes mellitus: effect of exercise and caloric restriction on phagocytic activity of macrophages. *Lab Anim Sci.* 1996;46:682-4.
6. Ahmad I, Steegles AW, Carrillo AJ, Finkelstein JA. Obesity- and sex-related alterations in growth hormone messenger RNA levels. *Mol Cell Endocrinol.* 1989;65:103-9.
7. Leidy JW Jr, Romano TM, Millard WJ. Developmental and sex-related changes of the growth hormone axis in lean and obese Zucker rats. *Neuroendocrinology.* 1993;57(2):213-23.
8. Finkelstein JA, Jervois P, Menadue M, Willoughby JO. Growth hormone and prolactin secretion in genetically obese rats. *Endocrinology.* 1986;118:1233-6.
9. Ahmad I, Finkelstein JA, Downs TR, Frohman LA. Obesity-associated decrease in growth hormone-releasing hormone gene expression: a mechanism for reduced growth hormone mRNA levels in genetically obese Zucker rats. *Neuroendocrinology.* 1993;58:332-7.
10. Tannenbaum GS, Epelbaum J, Videau C, Dubuis JM. Sex-related alterations in hypothalamic growth hormone-releasing hormone mRNA-but not somatostatin mRNA-expressing cells in genetically obese Zucker rats. *Neuroendocrinology.* 1996;64:186-93.
11. Renier G, Gaudreau P, Deslauriers N, Brazeau P. In vitro and in vivo growth hormone responsiveness to growth hormone-releasing factor in male and female Zucker rats. *Neuroendocrinology.* 1989;50:454-9.
12. Renier G, Gaudreau P, Deslauriers N, Petitclerc D, Brazeau P. Dynamic of the GRF-induced GH response in genetically obese Zucker rats: influence of central and peripheral factors. *Mol Cell Endocrinol.* 1989;65:103-9.
13. Saiduddin S, Bray GA, York DA, Swerdloff RS. Reproductive function in the genetically obese "fatty" rat. *Endocrinology.* 1973;93:1251-6.
14. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;188:9-13.
15. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;226:1-9.
16. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin, a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25:27-68.
17. Marin Bives CL, Olster DH. Abnormal estrous cyclicity and behavioral hyporesponsiveness to ovarian hormones in genetically obese Zucker female rats. *Endocrinology.* 1997;138:143-8.
18. Rhinehart EK, Kalra SP, Kalra PS. Leptin-receptor gene transfer into the arcuate nucleus of female fatty Zucker rats using recombinant adeno-associated viral vectors stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Biol Reprod.* 2004;71:266-72.
19. Todd BJ, Ladyman SR, Grattan DR. Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion but not of luteinizing hormone surge in leptin resistant obese Zucker rat. *J Neuroendocrinol.* 2003;15:61-8.
20. Pawekczyk LA, Moon YS, Yuen BH. Ovulatory response, ovarian LH/hCG receptors and serum concentrations of LH, insu-

- lin and steroid hormones in immature Zucker rats after PMSG treatment. *Anim Reprod Sci.* 1999;32:135-46.
21. Chelich AM, Edmonds ES. Pseudopregnancy and decidual response in the obese Zucker rat: a re-examination. *Biol Reprod.* 1986;34:805-8.
22. Heiman HL, Porter JR, Nekola MV, Murphy WA, Hartman AD, Lance VA, et al. Adenohypophyseal response to hypophysectropic hormones in male obese Zucker rats. *Am J Physiol.* 1985;249:E380-4.
23. Whitaker EM, Robinson AC. Circulating reproductive hormones and hypothalamic oestradiol and progesterin receptors in infertile Zucker rats. *J Endocrinol.* 1989;120:331-6.
24. Carro E, Pinilla L, Seoane LM, Considine RV, Aguilar E, Casanueva FF, et al. Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology.* 1997;66:375-6.
25. Lebrethon MC, Vandermis E, Gerard A, Parent AS, Bourguignon JP. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. *J Neuroendocrinol.* 2000;12:383-5.
26. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav.* 1979;23:111-20.
27. Saiduddin S, Bray GA, York DA, Swerdloff RS. Reproductive function in the genetically obese "fatty" rat. *Endocrinology.* 1973;93:1251-6.
28. Young RA, Frink R, Longcope C. Serum testosterone and gonadotropin in the genetically obese male Zucker rat. *Endocrinology.* 1982;111:977-81.
29. Whitaker EM, Shaw MA, Hervey GR. Plasma oestradiol-17 beta and testosterone concentrations as possible causes of the infertility of congenitally obese Zucker rats. *J Endocrinol.* 1983;99:485-90.
30. Withyachumnarnkul B, Edmonds ES. Plasma testosterone levels and sexual performance of young obese male Zucker rats. *Physiol Behav.* 1982;29:773-7.
31. Young JK, Fleming MW, Matsumoto DE. Sex behavior and the sexually dimorphic hypothalamic nucleus in male Zucker rats. *Physiol Behav.* 1986;36:881-6.
32. Beck B, Max JP, Richy S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to a potent-releasing peptide agonist in lean and obese Zucker rats. *Brain Res.* 2004;1016:135-8.
33. Powley TL, Morton SA. Hypophysectomy and regulation of body weight in the genetically obese Zucker rat. *Am J Physiol.* 1976;230:982-7.
34. Marin Bivens CL, Olster DH. Opioid receptor blockade promotes weight loss and improves the display of sexual behaviors in obese Zucker female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 63:515-20.
35. Balustein JD, Olster DH. Gonadal steroid hormone receptors and social behaviors. En: *Comparative and environmental physiology.* Vol. 3. Balthazar J, editor. Berlin: Springer Verlag; 1989. p 31-104.
36. Olster DH, Auerbach ID. Deficits in progesterone-facilitated sexual behaviors and forebrain estrogen and progesterin receptors in obese female Zucker rats. *Neuroendocrinology.* 2000; 72:350-9.
37. Hemmes RB, Schoch R. High dosage testosterone propionate induces copulatory behavior in the obese male Zucker rat. *Physiol Behav.* 1988;43:321-4.
38. Philips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugand V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics* 1996;13:18-9.
39. Casanueva FF, Diéguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:317-63.
40. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;188:9-13.
41. Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology.* 2000;141:3965-75.
42. Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda KI, Foster DL. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology.* 1998;67:370-6.
43. Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology.* 1998; 139:4652-62.
44. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:1023-8.
45. Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology.* 1997;138:5055-8.
46. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanism of action. *Biol Reprod.* 1999;60:216-22.
47. Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, et al. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *Endocrinology.* 1999;140:1581-5.
48. Tena-Sempere M, Pinilla L, González LC, Navarro J, Diéguez C, Casanueva FF, et al. In vitro pituitary and testicular effects of the leptin-related synthetic peptide leptin (116-130) amide involve actions both similar to and distinct from those of the native leptin molecule in the adult rat. *Eur J Endocrinol.* 2000; 142:406-10.
49. Clark JT, Kalra PS, Kalra SP. Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology.* 1985; 117:2435-42.
50. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999;20:68-100.
51. Allen LG, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Comparison of the effects of neuropeptide Y and adrenergic transmitters on LH release and food intake in male rats. *Life Sci.* 1985;37: 617-23.
52. Kalra PS, Kalra SP. Steroidal modulation of the regulatory neuropeptides: luteinizing hormone releasing hormone, neuropeptide Y, and endogenous opioid peptides. *J Steroid Biochem.* 1986;25:733-40.
53. Kalra SP, Kalra PS, Sahu A, Allen LG, Crowley WR. The steroid-neuropeptide connection in the control of LHRH secretion. *Adv Exp Med Biol.* 1987;219:65-83.
54. Khorram O, Pau KY, Spies HG. Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology.* 1987;45:290-97.
55. Kalra SP, Kalra PS. Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. *Front Neuroendocrinol.* 1996;17:371-401.
56. Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C. Neuropeptide-Y innervation of β -endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology.* 1991;131:2461-7.
57. Beck BV, Burlet A, Nicolas JP, Burlet C. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in obese Zucker rats: implications in feeding and sexual behaviors. *Physiol Behav.* 1990;47:449-53.
58. McKibbin PE, Cotton SJ, McMillan S, Holloway B, Mayers R, McCarthy HD, et al. Altered neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of obese (fa/fa) Zucker rats. Possible relationship to obesity and neuroendocrine disturbances. *Diabetes.* 1991;40:1423-9.
59. Kowalski TJ, Ster AM, Sdmith GP. Ontogeny of hyperphagia in the Zucker (fa/fa) rat. *Am J Physiol.* 1998;275:R1106-9.

60. Kowalski TJ, Houtp TA, Jahng J, Okada N, Liu SM, Chua SC Jr, et al. Neuropeptide Y overexpression in the prewlaning Zucker (*fa/fa*) rat. *Physiol Behav.* 1990;47:449-53.
61. Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD. Increased hypothalamic content of prepro-neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology.* 1990;127:730-7.
62. Catzeflis C, Pierroz DD, Rohner-Jeanrenaud F, Rivier JE, Sizonenko P, Aubert ML. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and somatotropic axis in intact adult female rats. *Endocrinology.* 1993;133:224-34.
63. Pronchuk N, Colmers WF. NPY presynaptic actions are reduced in the hypothalamic mpPVN of obese (*fa/fa*), but not lean, Zucker rats in vitro. *Br J Pharmacol.* 2004;141:1032-6.
64. Kalra PS, Norlin M, Kalra SP. Neuropeptide Y stimulates beta-endorphin release in the basal hypothalamus: role of gonadal steroids. *Brain Res.* 1995;705:353-6.
65. Sahu A, Crowley WR, Kalra SP. An opioid-neuropeptide-Y transmission line to luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons. A role in the induction of LH surge. *Endocrinology.* 1990;126:876-83.
66. Thornhill JA, Taylor B, Marshall W, Parent K. Central, as well as peripheral naloxone administration suppresses feeding in food-deprived Sprague-Dawley and genetically obese (Zucker) rats. *Physiol Behav.* 1982;29:841-6.
67. McLaughlin CL, Baile CA. Nalmefene decreases meal size, food and water intake and weight gain in Zucker rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;19:235-40.
68. McLaughlin CL, Baile CA. Feeding behavior responses of Zucker rats to naloxone. *Physiol Behav.* 1984;32:755-61.
69. Shaw WN. Long-term treatment of obese Zucker rats with LY255582 and other appetite suppressants. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;46:653-9.
70. Funes S, Hendrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1357-63.
71. Seminara SB, Messager S, Chatzidakis EE, Thresher RR, Acierino JS Jr, Shagoury JK, et al. 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349:1614-27.
72. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 1999;446:103-7.
73. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G protein-coupled receptor. *Nature.* 2001;411: 613-7.
74. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001;276:28969-75.
75. Kotani M, Dethoux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001;276:34631-6.
76. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hightmann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004;117:1319-28.
77. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sánchez Criado JE, et al. Developmental and hormonally regulated messenger RNA expression of KiSS-1 and its putative receptor GPR54 in rat hypothalamus and potent gonadotropin releasing action of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 2004;145:456-74.
78. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayén A, et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology.* 2005;146:156-63.
79. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayén A, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* 2005;146:1686-8.
80. Fernández-Fernández R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo EM, Tovar S, Sirotkin AV, et al. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology.* 2005;146:3018-25.
81. Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayén A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol.* 2004;561: 379-86.
82. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by Kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology.* 2005; 146:3917-25.
83. Ohtaki T, Kumano S, Ishibashi Y, Ogi K, Matsui H, Harada M, et al. Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus. *J Biol Chem.* 1999; 274:37041-5.
84. Larm JA, Gundlach AL. Galanin-like peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology.* 2000;72:67-71.
85. Kerr NC, Colmes FE, Wynick D. Galanin-like peptide (GALP) is expressed in rat hypothalamus and pituitary, but not in DRG. *Neuroreport.* 2000;11:3909-13.
86. Takatsu Y, Matsumoto H, Ohtaki T, Kumano S, Kitada C, Onda H, et al. Distribution of galanin-like peptide in the rat brain. *Endocrinology.* 2001;142:1626-34.
87. Matsumoto H, Noguchi J, Takatsu Y, Horikoshi Y, Kumano S, Ohtaki T, et al. Stimulation effect of galanin-like peptide (GALP) on luteinizing hormone-releasing hormone-mediated luteinizing hormone (LH) secretion in male rats. *Endocrinology.* 2001;142:3693-6.
88. Seth A, Stanley S, Jethwa P, Gardiner J, Ghatei M, Bloom S. Galanin-like peptide stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone in vitro and may mediate the effects of leptin on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology.* 2004;145:2743-50.
89. Kumano S, Matsumoto H, Takatsu Y, Noguchi J, Kitada C, Ohtaki T. Changes in hypothalamic expression levels of galanin-like peptide in rat and mouse models support that it is a leptin-target peptide. *Endocrinology.* 2003;38:497-503.
90. Shen J, Gundlach AL. Galanin-like peptide mRNA alterations in arcuate nucleus and neural lobe of streptozotocin-diabetic and obese Zucker rats. Further evidence for leptin-dependent and independent regulation. *Neuroendocrinology.* 2004;79: 327-37.
91. Whitaker EM, Robinson AC, Rayfield KM, Hervey GR. Thyroid function in male Zucker rats exposed to cold. *J Exp Physiol.* 1988;73:1029-31.
92. Richard D, Rivest R, Naimi N, Timofeeva E, Rivest S. Expression of corticotrophin-releasing factor and its receptors in the brain of lean and obese Zucker rats. *Endocrinology.* 1996;137: 4786-95.
93. Yamamoto Y, Ueta Y, Yamashita H, Asayama K, Shirahata A. Expressions of the prepro-orexin and orexin type 2 receptor genes in obese rat. *Petides.* 2002;23:1689-96.
94. Kim EM, O'Hare, Grace MK, Welch CC, Billington CJ, Levine AS. ARC POMC mRNA and PVN α -MSH are lower in obese relative to lean Zucker rats. *Brain Res.* 2000;862:11-6.
95. Korer J, Chua SC Jr, Williams JA, Leibel RL, Wardlaw SL. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin by leptin in lean and obese rats. *Neuroendocrinology.* 1999;70:377-83.