
Actualización

Leptina y función ovárica

Dra. Alicia G. Faletti

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

CEFYBO-CONICET - Facultad de Medicina-UBA

Paraguay 2155, 16° P - (C1121ABG) Buenos Aires Argentina

Teléfono /Fax: (54)-(11)-4508-3680 - E-mail: agfaletti@yahoo.com.ar

Resumen

La leptina, producto del gen de la obesidad (*ob*), es una proteína sintetizada principalmente por el tejido adiposo y secretada al torrente sanguíneo. Está caracterizada como una hormona que regula el apetito y el gasto energético a través de su acción a nivel central. Sin embargo, esta hormona tiene muchos otros efectos como consecuencia de su interacción directa en sistemas periféricos. Esta proteína media sus efectos a través de receptores específicos, que presentan distintas isoformas y están ampliamente distribuidos en diversos tejidos, incluyendo el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La leptina ejerce diferentes efectos sobre la reproducción en múltiples sistemas y el principal sitio de acción depende de los niveles circulantes de la proteína y de la expresión de sus receptores. Se necesita un estrecho y específico rango de concentración de leptina para mantener una función reproductiva normal, ya que concentraciones por debajo o superiores a esos umbrales interfieren en la capacidad reproductiva tanto a nivel central como ovárico. Es capaz de ejercer efectos directos sobre la función ovárica, tanto inhibitorios como estimulantes. Varios estudios demostraron que la leptina es capaz de regular la expresión de sus propios receptores a lo largo del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario en forma diferencial según el tejido y el estado hormonal. Por lo tanto, bajos o altos niveles de leptina, producidos por diferentes patologías o desequilibrios metabólicos como la obesidad, la diabetes o la anorexia nerviosa, pueden alterar la función ovárica a través de una regulación positiva o negativa sobre sus receptores.

Abstract

Leptin, the protein codified by the obesity gene (*ob*), is synthesized primarily by adipose tissue

and secreted into the blood stream. Initially, leptin was known to be a satiety hormone regulating both food intake and energy expenditure, but it is now known that this protein plays an important role in neuroendocrine signaling and reproduction. Leptin is recognized by the leptin receptor, which exists in six different isoforms that have been found to be widely distributed in many peripheral organs, including the hypothalamus-pituitary-ovarian axis. Leptin has a dual effect on reproduction and the main site of action depends on its circulating levels in the blood and on its receptor expression. A specific and narrow range of leptin concentrations is necessary to maintain a normal reproductive function, since concentrations either below or above these thresholds might interfere in opposing ways with the function of the reproductive axis. Leptin is able to produce both stimulating and inhibitory effects on the ovarian function. The expression pattern of the leptin receptors in the hypothalamus-pituitary-ovarian axis is regulated by leptin levels and in a tissue and hormonal state-dependent manner. Thus, low or high levels of leptin, as a result of different pathologies or energy imbalance like, obesity, diabetes or anorexia nervosa, can alter the ovarian function by either a negative or a positive regulation on its receptors.

Introducción

La leptina, producto del gen de la obesidad (*ob*), es una proteína de 167 aminoácidos, sintetizada principalmente por el tejido adiposo y secretada al torrente sanguíneo. La proteína fue inicialmente identificada como producto del gen alterado en ratones obesos *ob/ob*¹, y caracterizada como una hormona que regula el apetito ("factor de saciedad") y el gasto energético a través de su interacción con receptores en hipotálamo².

Como hormona de saciedad, las concentraciones de leptina pueden variar en respuesta a la ingesta y en consecuencia suprimir el apetito, aumentar la tasa metabólica y regular la disponibilidad del contenido lipídico del organismo^{1,3}. Sin embargo, la administración de leptina a ratones *ob/ob*, animales carentes de leptina funcional, obesos e infértiles, reestableció el peso corporal normal y recuperó la fertilidad de los mismos, tanto en machos como en hembras^{4,5}. La restricción alimentaria y la pérdida de peso en este modelo de estudio no condujo a la recuperación de la fertilidad, lo cual sugiere que la obesidad en sí no es la causa de la infertilidad en estos ratones deficientes de leptina. Asociado al retorno de la capacidad reproductiva en ratones hembras *ob/ob* tratados con leptina exógena, se observó un aumento en el peso ovárico y uterino, en los niveles séricos de hormona luteinizante (LH) y en el número de folículos primarios y preovulatorios^{4,6}. Individuos con alteraciones congénitas en leptina y/o pérdida de la función de la leptina debido a mutaciones en la proteína o en su receptor presentan un cuadro de hipogonadismo hipogonadotrófico con bajos niveles de FSH y de LH, hiperfagia, severa obesidad, pubertad retrasada, amenorrea primaria o secundaria, etc. Estas observaciones, y numerosos estudios posteriores, sugirieron que la leptina es un importante regulador de la función reproductiva y una molécula que señala el vínculo entre el estado nutricional y la reproducción. A su vez, se observó que la administración de leptina fue capaz de adelantar la pubertad y la maduración sexual en ratas y ratones normales. De lo cual se concluye que la leptina también está altamente involucrada en el desarrollo y maduración del sistema reproductivo⁷⁻⁹.

Si bien durante los primeros años se estableció que la leptina era principalmente producida por el tejido adiposo, estudios posteriores demostraron que este tejido no es la única fuente potencial de esta hormona. Otros tejidos como la placenta¹⁰, la mucosa gástrica¹¹, el riñón¹², el músculo esquelético¹³, la hipófisis e hipotálamo¹⁴, el epitelio de la glándula mamaria¹⁵, el testículo¹⁶, el ovario², el endometrio¹⁷, producen una pequeña cantidad de leptina en determinadas circunstancias.

La leptina circula en sangre en forma libre (forma biológicamente activa) y unida a proteínas. Se secreta en forma pulsátil con significativas variaciones diurnas. La concentración de leptina circulante correlaciona, en la mayoría de los casos, con el contenido de tejido adiposo y el índice de masa corporal¹⁸⁻¹⁹, aunque tanto la dieta como numerosos factores hormonales modifican sus niveles. La concentración plasmática de leptina aumenta mucho en personas obesas²⁰ y es drásticamente disminuida durante el ayuno o la restricción alimentaria²¹. En las mujeres los niveles plasmáticos de leptina varían durante el ciclo menstrual normal, alcanzando

un máximo en la fase luteal coincidente con el pico de progesterona y de 17β-estradiol²²⁻²³. Las mujeres con anorexia nerviosa o con exceso de ejercicio físico tienen bajos niveles de leptina plasmática y sufren de amenorrea²⁴⁻²⁵. Otras patologías como la diabetes y la obesidad, en las que se presentan altas concentraciones de leptina, también están asociadas con alteraciones en el sistema reproductivo²⁰. Por lo tanto, por estas observaciones y muchas más, hoy en día se sabe que la abundancia o carencia de leptina contribuye al desarrollo de distintas patologías del sistema reproductor.

Receptores de leptina

La leptina media sus efectos a través de receptores específicos, ampliamente distribuidos en diversos tejidos, que presentan distintas isoformas. El receptor de la leptina es producto del gen de la diabetes (*db*), pertenece a la familia de receptores de citoquinas de clase I y existe en al menos 6 isoformas que derivan de distintas variantes de splicing del ARN mensajero^{2,26}. Estas isoformas se clasifican en tres grupos: una isoforma larga (Ob-Rb), cuatro isoformas cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf) y una isoforma corta y soluble (Ob-Re)²⁷⁻²⁸.

Todas las isoformas poseen el mismo dominio de unión al ligando (dominio extracelular) y el mismo dominio transmembrana (a excepción del Ob-Re que no lo posee), pero varían en sus dominios C-terminales. La isoforma soluble del receptor de leptina (Ob-Re) carece de los dominios transmembrana y citoplasmático, por lo tanto no participa directamente de la señalización de la leptina pero determina la cantidad de leptina en circulación²⁹, ya que sirve como proteína de unión a la hormona circulante, sugiriendo que esta isoforma podría estar involucrada en la modulación de su actividad³⁰. Tanto la isoforma larga como las cortas pueden formar homodímeros en ausencia de ligando. Pero el cambio conformacional en la estructura del receptor, que tiene lugar luego de la unión a la leptina, parecería ser un evento crítico para la activación de la señalización³¹. Un receptor de leptina se une a una molécula de leptina, cuyo resultado es un complejo receptor-ligando tetramérico³².

La isoforma larga del receptor de leptina (Ob-Rb) está principalmente expresada en el hipotálamo, en los núcleos ventro-medial y arcuato³³, áreas involucradas en el control de la ingesta y el comportamiento sexual. A su vez, esta isoforma se expresa a niveles funcionales en tejidos periféricos como el hígado³⁴, el pulmón³⁵, el testículo³⁶, la placenta³⁷, el riñón³⁸ y otros. Una de las isoformas cortas, la Ob-Ra, fue identificada principalmente en tejidos periféricos como el hígado, el páncreas, las gónadas y el músculo esquelético³⁹⁻⁴¹. Sin embargo, también está presente en el plexo coroideo⁴² y la microvasculatura

del cerebro⁴³⁻⁴⁴, donde parece participar del transporte de leptina a través de la barrera hemato-encefálica. El resto de las isoformas cortas tienen bajo nivel de expresión en el hipotálamo y otros tejidos⁴¹. Las múltiples isoformas del receptor de leptina y su distribución fuera del sistema nervioso central indican que el rol de la leptina se extiende más allá de su función como factor de saciedad. Además de regular el apetito, la leptina afecta algunos mecanismos metabólicos y neuroendócrinos asociados al control del gasto energético⁴⁵. Aunque la isoforma larga sea tradicionalmente conocida como la “isoforma responsable de la señalización de la leptina”, hay evidencias de que las isoformas cortas del receptor de leptina también muestran capacidad de activar los caminos de señalización⁴⁶.

Cascada de señalización de la leptina

El proceso dinámico de internalización y reciclado o degradación del receptor es un punto importante de regulación en la señalización de la leptina. Se ha estimado que bajo condiciones de actividad basal, sólo el 5-25% del total de las isoformas del receptor de leptina presentes en la célula están localizadas en la superficie celular y la mayoría de ellas residen en pool intracelulares⁴⁷. Los receptores de leptina no poseen actividad de tirosina quinasa intrínseca y muchos eventos de señalización son dependientes de la asociación con quinasas tales como JAK2. La unión del ligando al receptor y la subsiguiente dimerización permite la yuxtaposición de las JAKs unidas a cada receptor, las cuales pueden fosforilarse y activarse entre sí, fosforilar y activar al receptor o también a otros sustratos. En respuesta a la unión de la leptina, la isoforma larga del receptor es fosforilada en su tirosina. Además la co-expresión de JAK2 y Ob-Rb estimula la fosforilación de la tirosina del receptor en respuesta al ligando⁴⁶. Así, las JAKs son quinasas de tirosinas asociadas al receptor, las que son utilizadas por los receptores de leptina para ser fosforilados y para fosforilar otros blancos como proteínas STAT (transductor de señales y activadores de proteínas de transcripción). Estos factores de transcripción son reclutados para activar al complejo Ob-R/JAK a través de los dominios SH₂ y SH₃ y son activados por fosforilación de tirosinas. La activación involucra la disociación del receptor y la formación de homo- o heterodímeros que translocan al núcleo e interactúan con elementos específicos del DNA en los promotores de genes blanco para regular su expresión génica⁴⁸. La vía de señalización a través del sistema JAK/STAT se encuentra modulada por numerosos factores, tales como las proteínas SOCS (supresores de la vía de señalización de las citoquinas)⁴⁹⁻⁵⁰ o proteínas tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)⁵¹⁻⁵². Las proteínas SOCS tendrían una participación importante en la regulación negativa de la vía de transducción de señales inducida por leptina⁴⁹.

Otra vía de transducción de señales que puede ser activada tras la unión de leptina a ambos receptores, Ob-Ra u Ob-Rb, es la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Si bien la porción C-terminal del Ob-Rb no sería esencial para la activación, ésta es indispensable para alcanzar un nivel máximo de respuesta^{31, 46, 53}.

Finalmente, la leptina es capaz de activar varios componentes de otras vías de transducción de señales como la vía activada por insulina, lo que permitiría una interrelación entre esta proteína y diversos procesos fisiológicos⁵⁴.

Leptina y función ovárica

Como ya se expuso anteriormente, diversos estudios demostraron la acción de la leptina sobre el eje reproductivo. Cioffi y col.⁵⁵ fueron los primeros autores que determinaron la presencia de receptores de leptina en ovario y testículo humano. Posteriormente, estudios más exhaustivos demostraron la presencia de receptores en distintas células ováricas en múltiples especies. En el ovario humano se expresan ambos tipos de isoformas del receptor, largas y cortas, en células de la granulosa, células de cúmulo oóforo, células de la teca, células intersticiales y en la membrana plasmática de oocitos en metafase II^{40, 56-57}. En ratas se detectaron Ob-Ra y Ob-Rb en células de la granulosa pero sólo Ob-Ra en células de la teca⁵⁸. Patrones de expresión similares fueron hallados en el ovario del ratón⁵⁹ y del conejo⁶⁰. Tanto el ARN mensajero como la proteína Ob-R fueron también encontrados en oocitos de ratones, ratas y humanos, sugiriendo por lo tanto que el oocito es capaz de responder a la leptina^{59, 61-65}.

Varios autores describieron cambios en los niveles de expresión de los receptores de leptina en el ovario según el estado hormonal. En el cerdo los niveles de Ob-R varían durante la fase luteal, siendo elevados mientras el cuerpo lúteo es funcional y bajos durante la luteólisis⁶⁶. Duggal y col.⁶⁷ estudiaron la expresión de los receptores durante el ciclo estral de la rata. Los niveles de expresión de Ob-Ra y Ob-Rb son elevados durante el estro y en la primera fase del diestro, mientras que son bajos durante el proestro y la segunda fase del diestro. Teniendo en cuenta que los niveles de 17β-estradiol son elevados en proestro⁶⁸, aquellos autores sugirieron que los receptores ováricos de leptina son regulados por estrógenos. La observación de niveles altos de expresión de receptores en la primera fase del diestro, momento en el que se desarrolla el cuerpo lúteo y se alcanza el pico máximo de producción de progesterona, sugeriría un efecto positivo de leptina sobre la función luteal⁶⁶. A su vez, Ryan y col.⁶⁵ describieron el patrón temporal de la expresión de receptores Ob en ratas inmaduras estimuladas

con gonadotrofinas⁶⁵. Encontraron un aumento en la expresión de las dos isoformas Ob-Ra y Ob-Rb momentos previos a la ovulación.

Además de los receptores Ob, también se demostró la presencia del ARN mensajero de leptina en ovario de distintas especies, específicamente en células de la granulosa y del cúmulo oóforo en humanos⁵⁶, en células de la teca y del cuerpo lúteo e intersticiales de la rata⁶⁸, pero no en oocitos humanos^{56, 62} o de ratón^{59, 61, 63}, mientras que sí se demostró, por inmunofluorescencia, la presencia de la proteína dentro del oocito^{63, 59}. Por lo tanto, se cree que la leptina debe ser transportada al oocito vía endocitosis después de producirse en algún otro sitio. Craig y col.⁵³ encontraron que la expresión de los receptores de leptina varía a lo largo de la maduración del oocito siendo máximo en oocitos de folículos medios y en aquellos folículos con vesícula germinal rota⁵³. Por lo tanto, se cree que la alta expresión de sus receptores (aparentemente con mayor proporción de la isoforma corta Ob-Ra que la isoforma larga) participa en el flujo de la leptina desde el exterior hacia el interior del oocito.

En el ovario humano la leptina se produce en las células somáticas y está presente en el fluido folicular en concentraciones similares a las del suero, como así también en el citoplasma de oocitos durante las etapas del desarrollo folicular^{40, 56, 59, 69-70}. Esto indicaría que la leptina puede estar ejerciendo una acción paracrina.

Numerosos trabajos demostraron que la leptina tiene efectos negativos sobre algunos componentes del ovario: i) concentraciones altas de leptina bloquean el efecto del IGF-I sobre la producción de estradiol inducida por FSH en cultivo de células de granulosa de rata⁷¹, o humanas⁵⁷; ii) bloquea la inducción del factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β) sobre la producción de estrógenos y la actividad aromatasa en cultivo de células de granulosa de rata⁵⁸; iii) inhibe la producción de estradiol y progesterona inducida por insulina en cultivos de células de granulosa bovinas⁷² y humanas⁷³; iv) bloquea el efecto de IGF-I sobre la producción de androstenediona inducida por LH en cultivo de células tecales humanas⁵⁷ e inhibe la producción de progesterona y androstenediona inducida por insulina en cultivo de células tecales bovinas⁷⁴; v) modula la esteroidogénesis inducida por glucocorticoides en cultivo de células de la granulosa de rata⁷⁵; vi) inhibe la producción de progesterona producida por cuerpos lúteos de conejo⁶⁰. Todos estos estudios fueron realizados *in vitro* y en presencia de distintos niveles de leptina. Sin embargo en otros estudios *in vivo*, utilizando distintos modelos biológicos, la leptina también fue capaz de producir efectos inhibitorios. La administración intraperitoneal de altas dosis de leptina a ratas inmaduras estimuladas con gonadotrofinas, inhibe la tasa ovulatoria⁷⁶⁻⁷⁸. Estudiando las posibles causas de

esta inhibición, se demostró que este tratamiento impedía el aumento preovulatorio del contenido ovárico de prostaglandina E₂ y de la concentración sanguínea de progesterona⁷⁸. Para distinguir si este efecto podría ser ejercido a nivel local, Ricci y col.⁷⁸ estudiaron la acción de la leptina en sistemas *in vitro* de mayor a menor complejidad. La presencia de leptina inhibió la producción de varios agentes preovulatorios (esteroides, prostaglandinas y óxido nítrico) en cultivo de explantes de ovario o de folículos preovulatorios en presencia o ausencia de FSH y LH. Además de corroborar los efectos observados en los ensayos *in vivo*, estos resultados indican que la leptina puede estar modulando el proceso ovulatorio de la rata, a través de una acción directa sobre el ovario, además de su ya conocida acción central. Todas estas observaciones demuestran que las altas concentraciones de leptina, comúnmente encontradas en mujeres obesas, comprometen la función ovárica normal.

Otros autores, utilizando distintos modelos biológicos, encontraron que la leptina tiene efectos positivos sobre la función ovárica. El tratamiento con leptina a ratones *ob/ob* (carentes de leptina funcional), que presentan obesidad, resistencia a la insulina e infertilidad, incrementa los niveles de gonadotrofinas, induce la maduración folicular, incrementa el peso del útero, de los ovarios, el número de folículos y restablece la fertilidad⁴⁻⁶. A su vez, varios estudios han mostrado que la leptina es necesaria para el normal desarrollo de la pubertad en roedores^{7, 79} y humanos⁸⁰⁻⁸¹, que su administración adelanta el comienzo de la pubertad y revierte los efectos negativos de una mala nutrición sobre el retraso de la pubertad⁸². Por otra parte, otros autores observaron que en ratones deficientes de GnRH, el tratamiento con leptina induce una ovulación independiente de LH⁸³. En pacientes adultos homocigotas para la ausencia del gen que codifica el receptor de leptina (*db*), se observó una severa obesidad temprana, falta de inicio en la pubertad, amenorrea en mujeres y rasgos clínicos de hipogonadismo en hombres, asociados a un patrón de secreción de gonadotrofinas prepuber^{80,84}. Todos estos datos indican que es necesaria una sincronizada señalización a través de receptores de leptina para alcanzar la madurez sexual.

Uno de los trabajos más significativos de la acción estimulante que la leptina ejerce sobre el ovario de rata es el de Almog y col.⁷⁹. En este trabajo, dosis bajas de leptina administradas en forma crónica fueron capaces de adelantar y estimular el desarrollo folicular de la rata. Estos autores encontraron que este tratamiento adelantó el disparo de la pubertad, aumentó la tasa ovulatoria, y los animales presentaban mayor concentración plasmática de FSH, LH, progesterona y de algunos factores esteroidogénicos como StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis), todo con respecto a los animales controles. Con

estos resultados los autores sugirieron que la leptina podría participar en los procesos de maduración folicular por atenuar la atresia folicular, ya que observaron que la relación Bcl-2/Bax (factor anti-apoptótico/proapoptótico) se encontraba aumentada en los animales tratados con leptina. Este trabajo reforzó la idea de que la leptina participa estimulando la maduración sexual, particularmente la foliculogénesis por atenuar la atresia folicular. Unos años más tarde, Hamm y col.⁸⁵ encontraron que los animales *ob/ob* manifestaban retraso en la maduración sexual, escasa sensibilidad a una estimulación gonadotrófica y muy deficiente foliculogénesis por presentar alta incidencia de apoptosis y por lo tanto mayor proporción de atresia folicular con respecto a la cepa salvaje. Por estas observaciones postularon que la falta de leptina funcional en estos ratones es la causa del aumento de la atresia folicular y como consecuencia una foliculogénesis deficiente. Sirotkin y col.^{86,87} demostraron que la leptina inhibe la expresión de ciertos marcadores apoptóticos (bax, caspasa-3, p53) y estimula la expresión de algunos péptidos anti-apoptóticos (bcl-2) en distintas especies de animales de experimentación^{86,87}. Encontraron además que la leptina también es capaz de estimular algunos factores del ciclo celular como la ciclina B1 y el PCNA, además de los factores anti-apoptóticos. Por lo tanto estos autores concluyeron que la leptina participa en la foliculogénesis ovárica regulando la proliferación, la apoptosis de las células ováricas y el equilibrio entre estos dos procesos.

Además de los efectos mencionados, en nuestro laboratorio también demostramos que la leptina es capaz de inducir el proceso ovulatorio. La administración crónica de bajas dosis de leptina a ratas inmaduras tratadas con gonadotrofinas produjo efectos inductores sobre el proceso ovulatorio de la rata, aumentando los niveles séricos de progesterona, la producción de prostaglandinas ováricas y la expresión de la óxido nítrico sintasa ovárica. Más aún, este mismo tratamiento fue capaz de revertir, en parte, los efectos negativos producidos por una severa malnutrición sobre el proceso ovulatorio⁸⁸. Estos estudios, junto a los mencionados anteriormente, indican que la leptina puede estar regulando el proceso ovulatorio, ya que cuando los niveles de leptina son escasos, existe una relación positiva entre la leptina y la función ovárica, mientras que altas concentraciones de esta proteína produce una relación negativa entre ellos.

La función ovárica es regulada por una compleja interrelación entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, los cuales forman el llamado eje reproductivo. A su vez, este eje es modulado por múltiples y complejos factores metabólicos y nutricionales. Muchos de los estudios realizados sobre la leptina nos indican que esta proteína es capaz de ejercer efectos bifásicos en nume-

rosos procesos reproductivos. En base a los antecedentes mencionados se puede afirmar que se necesita un nivel dado de leptina para mantener el ciclo reproductivo normal, por lo que concentraciones por debajo o superiores a un determinado rango interfieren con la función ovárica normal. Esta hipótesis propone que la leptina puede estar regulando su acción bifásica a través de una regulación en el número o en la expresión de sus receptores a lo largo del eje reproductivo. Como la leptina tiene efectos significativos sobre la función ovárica, algunos estimulantes y otros inhibidores, la expresión de esta proteína y de sus receptores es de fundamental importancia para entender su acción sobre las gónadas.

En nuestro laboratorio estudiamos la expresión de los receptores de leptina a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata inmadura estimulada con gonadotrofinas (eCG/hCG) para inducir su primera ovulación⁸⁹. Encontramos que la administración de eCG induce un aumento en la expresión de ambos tipos de isoformas (cortas y larga), tanto en hipotálamo como en tejido periférico (adenohipófisis y ovario), en paralelo a una disminución de la concentración de leptina plasmática. Luego de 48 horas la expresión proteica de estos receptores disminuye en hipotálamo, mientras que continúa aumentando en adenohipófisis y ovario. Meli y col.⁹⁰ observaron que la concentración de leptina plasmática aumentaba 50% o 100% en ratas ovariectomizadas después de 7 o 22 días respectivamente, en paralelo a una disminución de la expresión de la isoforma larga del receptor de leptina en hipotálamo. Estos resultados parecen sugerir que los receptores de leptina son sensibles a los cambios plasmáticos de leptina para balancear las modificaciones del ligando. En trabajos previos en el laboratorio, encontramos que la concentración plasmática de leptina disminuye 4 horas después de la administración de hCG a ratas inmaduras (25-27 días) pretratadas con eCG⁷⁸. Similares resultados fueron encontrados por Ryan y col.⁶⁵ quienes además observaron una disminución del 80% después de 9 horas del tratamiento con hCG⁶⁵. La administración de hCG no modificó la expresión de los receptores de leptina en hipotálamo, mientras que los niveles proteicos de ambos tipos de isoformas continuaban elevados en adenohipófisis y tejido ovárico⁸⁹. Todos estos resultados indican que las gonadotrofinas son capaces de regular la producción de leptina y la expresión de sus receptores en forma diferencial, según el tejido y el proceso en cuestión, desarrollo folicular u ovulación. La capacidad de respuesta de la adenohipófisis y del tejido ovárico a la administración de la hCG no es sorprendente, ya que estos tejidos periféricos están íntimamente involucrados en la fase final de la ovulación y son activados por la hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH), las cuales a su vez, están reguladas negativamente por las

hormonas ováricas. Teniendo en cuenta que en este modelo biológico, la administración de eCG produce un aumento gradual de estrógenos en suero y que el posterior tratamiento con hCG disminuye estos niveles a valores basales, podríamos pensar que los estrógenos son capaces de modular negativamente la expresión de los receptores de leptina en hipotálamo^{68, 91}. En cambio, en tejidos periféricos, al menos en la adenohipófisis y en el ovario, se demostró que existe una relación positiva entre los esteroides y los receptores de leptina⁸⁹. Por lo tanto, podemos sugerir que los estrógenos son capaces de modular en forma diferencial los receptores de leptina a lo largo del eje reproductivo, dependiendo del tejido y del proceso inducido por las gonadotrofinas.

Recientemente, en el laboratorio estudiamos, mediante ensayos *in vitro* la acción de distintos niveles de leptina sobre la expresión de sus receptores a lo largo del eje reproductivo. Para ello utilizamos cultivo de explantes de tejido de hipotálamo, adenohipófisis y de ovario de ratas inmaduras tratadas con gonadotrofinas y expuestas a distintas concentraciones de leptina (0.3-500 ng/ml). Encontramos que la leptina es capaz de regular sus propios receptores en forma tejido y dosis dependiente⁸⁹. Se observó el mismo perfil de expresión para ambos tipos de receptores. En hipotálamo se encontró un efecto bifásico: después de 2 horas de incubación la expresión de los receptores de leptina disminuía a bajas concentraciones de su ligando, simultáneamente al aumento de la secreción de GnRH, mientras que altas concentraciones de leptina producían un aumento de la expresión de sus receptores sin producir cambios sobre la producción de GnRH. Varios trabajos demostraron el efecto inductor de la leptina sobre la hormona liberadora de gonadotrofinas utilizando distintos modelos biológicos⁹²⁻⁹⁴. En adenohipófisis se observó que la leptina era capaz de inducir un aumento en la expresión de sus receptores en el rango 10-30 ng/ml en paralelo a un aumento en la secreción de LH, efecto comprobado por numerosos autores^{92, 95-96}. No se observaron efectos a mayores concentraciones. Cabe mencionar que los niveles normales de leptina en plasma de ratas hembras adultas con pesos corporales normales oscilan entre 2 y 3 ng/ml, alcanzando sólo el 10% a nivel hipotalámico^{79, 97}, 0.2 a 0.3 ng/ml en ratas ayunadas⁹⁸, 10-30 ng/ml en ratas o humanos medianamente obesos⁹⁹, alcanzando niveles muy superiores a 30 ng/ml en casos de severa obesidad¹⁰⁰. Todos estos resultados indican que la leptina participa en el control de la secreción de las gonadotrofinas por una acción estimulante a nivel de hipotálamo y adenohipófisis, y que éste último parece ser insensible a concentraciones mayores que aquellas encontradas en ratas o humanos medianamente obesos. A diferencia de estos resultados se observó que el ovario es capaz de

responder a concentraciones bajas y altas de su ligando. Ambos tipos de receptores de leptina son estimulados en ovario en presencia de un rango muy amplio de concentraciones, incluso en concentraciones tan bajas como 0.3 ng/ml. Paralelamente al aumento de la expresión de sus receptores, la leptina es capaz de producir un efecto bifásico sobre la secreción de progesterona, siendo inhibitoria a bajas concentraciones y estimulante a altas concentraciones^{66, 89}. El efecto inhibitorio de la leptina sobre la esteroidogénesis fue demostrado independientemente por numerosos autores, tanto en ovario^{57-58, 71-72, 75, 101-102} como en otros tejidos^{36, 103}. Aunque el mecanismo involucrado para tales efectos no ha sido completamente dilucidado, se sugirió que la leptina podría modular algunos factores de transcripción tales como StAR y P450scc³⁶ o c-Jun⁷⁵. Asimismo, Ruiz-Cortéz y col.⁶⁶ postularon que la leptina modula la esteroidogénesis en ovario a través de la vía de señalización de STAT-3.

Basado en los datos existentes, podemos concluir que la leptina ejerce un efecto dual sobre la reproducción en múltiples sitios y que el principal sitio de acción depende de los niveles circulantes de leptina y de la expresión de sus receptores en cada tejido. Es necesario un estrecho y específico rango de concentración de leptina para mantener una función reproductiva normal, ya que las concentraciones por debajo o superiores a esos umbrales interfieren en la capacidad reproductiva tanto a nivel central como ovárico. El efecto positivo o negativo resultante de su acción podría depender de la regulación que este péptido ejerce sobre sus receptores y del tejido blanco.

Bibliografía

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32
2. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OB-R*. *Cell* 1995; 83: 1263-71
3. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292-5
4. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12: 318-20
5. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997; 138: 1190-3

6. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144-7
7. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 391-5
8. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997; 275: 88-90
9. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997; 138: 855-8
10. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-33
11. Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394: 790-3
12. Martinez-Anso E, Lostao MP, Martinez JA. Immunohistochemical localization of leptin in rat kidney. *Kidney Int* 1999; 55: 1129-30
13. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 1998; 393: 684-8
14. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 1999; 140: 5995-8
15. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000 62: 413-7
16. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4939-47
17. Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1946-50
18. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1: 1155-61
19. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1: 1311-4
20. Stephens TW, Caro JF. To be lean or not to be lean. Is leptin the answer? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106: 1-15
21. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250-2
22. Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, Boyadjian R, Saad MF. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 528-31
23. Quinton ND, Laird SM, Okon MA, Li TC, Smith RF, Ross RJ, Blakemore AI. Serum leptin levels during the menstrual cycle of healthy fertile women. *Br J Biomed Sci* 1999; 56: 16-9
24. Audi L, Mantzoros CS, Vidal-Puig A, Vargas D, Gussinye M, Carrascosa A. Leptin in relation to resumption of menses in women with anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 544-7
25. Ballauff A, Ziegler A, Emons G, Sturm G, Blum WF, Renschmidt H, Hebebrand J. Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 71-5
26. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 6093-6
27. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379: 632-5
28. Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 1996; 392: 87-90
29. Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 6343-9
30. Lahlou N, Clement K, Carel JC, Vaisse C, Lotton C, LeBihan Y, Basdevant A, Lebouc Y, Froguel P, Roger M, Guy-Grand B. Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass. *Diabetes* 2000; 49: 1347-52
31. Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004; 28: 159-69
32. Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, White DW, Kalai M, Fountoulakis M, Plaetinck G. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem* 1997; 272: 18304-10
33. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1998; 395: 535-47
34. Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA, Baumann H. Leptin receptor action in hepatic cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 16216-23

35. Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur J Pharmacol* 1999;365:273-9
36. Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang F-P, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 2001;170:413-23
37. Smith JT and Waddell BJ. Leptin receptor expression in the rat placenta: changes in Ob-Ra, Ob-Rb, and Ob-Re with gestational age and suppression by glucocorticoids. *Biol Reprod* 2002;67:1204-10
38. Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Brossard G, Pouzet B, Marty E, Maffrand JP, Le Fur G. Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. *FEBS Lett* 1997;404:185-91
39. Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trahurn P, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:383-7
40. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4144-8
41. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7001-5
42. Lynn RB, Cao G-Y, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. Autoradiographic localization leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:884-9
43. Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998;139:3485-91
44. Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 1997;99:14-8
45. Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 2000;143:293-311
46. Bjorboek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:32686-95
47. Barr VA, Lane K, Taylor SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 1999; 274:21416-24
48. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-5
49. Bjorbaek C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG Jr. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 2000;275:40649-57
50. Muller P, Kuttenukeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP, Boutros M. Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 2005; 436: 871-5
51. Cook WS, Unger RH. Protein tyrosine phosphatase 1B: a potential leptin resistance factor of obesity. *Dev Cell* 2002; 2: 385-7
52. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-31
53. Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004;145:5355-63
54. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006;393:7-20
55. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhah A, Platika D, Snodgrass HR. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 1996;2:585-9
56. Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997;3:467-72
57. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-1 augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1072-6
58. Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor- β of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 1999;61:1104-9
59. Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod* 2002;66:1548-54
60. Zerani M, Boiti C, Zampini D, Brecchia G, Dall'Aglio C, Ceccarelli P, Gobbetti A. Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea. *J Endocrinol* 2004;183:279-88
61. Antczak M, Van Blerkom J, Clark A. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-beta2 sequestration in a

- subpopulation of human ovarian follicle cells. *Hum Reprod* 1997;12:2226-34
62. Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 1997;3:1067-86
63. Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 24;256(3):480-4
64. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Tanaka T. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2002;143(5):1922-31
65. Ryan NK, Van der Hoek KH, Robertson SA, Norman RJ. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. *Endocrinology* 2003;144: 5006-13
66. Ruiz-Cortés ZT, Martel-Kennes Y, Gévy NY, Downey BR, Palin MF, Murphy BD. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 789-96
67. Duggal PS, Weitsman SR, Magoffin DA, Norman RJ. Expression of the long (OB-Rb) and short (OB-Ra) forms of the leptin receptor throughout the oestrous cycle in the mature rat ovary. *Reproduction* 2002;123: 899-905
68. Bennett PA, Lindell K, Wilson C, Carlsson LM, Carlsson B, Robinson IC. Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology* 1999;69: 417-23
69. Archanco M, Muruzabal FJ, Llopiz D, Garayoa M, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Burrell MA. Leptin expression in the rat ovary depends on estrous cycle. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1269-77
70. Welt CK, Schneyer AL, Heist K, Mantzoros CS. Leptin and soluble leptin receptor in follicular fluid. *J Assist Reprod Genet* 2003;20 495-501
71. Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997;138:847-50
72. Spicer LJ, Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997;138:3374-9
73. Brannian JD, Zhao Y, McElroy M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum Reprod* 1999;14:1445-8
74. Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian theca cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1998;58:207-12
75. Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology* 1999;140:1731-8
76. Duggal PS, Van der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 2000;141:1971-6
77. Duggal PS, Ryan NK, Van der Hoek KH, Ritter LJ, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leukocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE₂ release in cultured rat ovarian follicles. *Reproduction* 2002;123:891-8
78. Ricci AG, Di Yorio MP, Faletti AG. Inhibitory effect of leptin on the rat ovary during the ovulatory process. *Reproduction* 2006;132:771-80
79. Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkan D, Homburg R, Lessing JB, Nevo N, Gertler A, Amsterdam A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183:179-91
80. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998 18:213-5
81. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelin M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401
82. Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF, Aubert ML. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol* 1998;10:627-33
83. Barkan D, Hurgin V, Dekel N, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice. *FASEB J* 2005;19:133-5
84. Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2849-55
85. Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod* 2004;71:66-72

86. Sirotkin AV, Grossmann R. Leptin directly controls proliferation, apoptosis and secretory activity of cultured chicken ovarian cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 148: 422-9
87. Sirotkin AV, Mlynček M, Makarevich AV, Florkovícová I, Hetényi L. Leptin affects proliferation-, apoptosis- and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells. *Physiol Res* 2008; 57: 437-42
88. Roman EA, Ricci AG, Faletti AG. Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 242: 33-41
89. Di Yorio MP, Bilbao MG, Pustovrh MC, Prestifilippo JP, Faletti AG. Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in a differential way. *J Endocrinol* 2008; 198: 355-66
90. Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 2004; 145: 3115-21
91. Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson IC, Carlsson LM, Carlsson B. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 29-36
92. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1023-8
93. Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, Parent AS, Junien JL, Bourguignon JP. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. *Endocrinology* 2000; 141: 1464-9
94. Watanobe H. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol* 2002; 545: 255-68
95. Dearth RK, Hiney JK, Dees WL. Leptin acts centrally to induce the prepubertal secretion of luteinizing hormone in the female rat. *Peptides* 2000; 21: 387-92
96. De Biasi SN, Apfelbaum LI, Apfelbaum ME. In vitro effect of leptin on LH release by anterior pituitary glands from female rats at the time of spontaneous and steroid-induced LH surge. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 659-65
97. Watanobe H, Suda T. A detailed study on the role of sex steroid milieu in determining plasma leptin concentrations in adult male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 56-9
98. Watanobe H, Suda T, Wikberg JE, Schioth HB. Evidence that physiological levels of circulating leptin exert a stimulatory effect on luteinizing hormone and prolactin surges in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 162-5
99. Watanobe H, Yoneda M, Kohsaka A, Kakizaki Y, Suda T, Schioth HB. Normalization of circulating leptin levels by fasting improves the reproductive function in obese OLETF female rats. *Neuropeptides* 2001; 35: 45-9
100. Lönnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thörne A, Schalling M, Arner P. Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest* 1997; 99: 2398-404
101. Ghizzoni L, Barreca A, Mastorakos G, Furlini M, Vottero A, Ferrari B, Chrousos GP, Bernasconi S. Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. *Horm Metab Res* 2001; 33: 323-8
102. Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biol Reprod* 2001; 65: 66-71
103. Cameo P, Bischof P, Calvo JC. Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod* 2003; 68: 472-7