



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie

Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum: Morfofisiologia e Biotecnologie applicate

**Indagine immunoistochimica e biomolecolare su Leptina, BDNF
e rispettivi recettori nell'ovaio di cagne normopeso e obese**

Tesi di:

Dott.ssa Teresa Scopitteri

Tutor:

Ch.ma Prof.ssa Rosaria Laurà

Cotutor:

Ch.ma Prof.ssa Maria Beatrice Levanti

Abstract

The aim of the study was to investigate the expression of leptin (Ob), leptin receptor (ObR), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) in the ovary of normal and overweight/obese bitches through immunohistochemistry and qRT-PCR. Ob and BDNF play a key role in the regulation of energy balance and their action is mediated by their receptor, respectively ObR and TrkB, widely expressed in several tissues in different species. Furthermore, there are growing evidences that these substances could have an implication in the modulation of reproductive functions suggesting a correlation between state of nutrition and ovarian activity.

In this investigation, we used ovaries sampled through routine ovary-hysterectomy from twenty healthy (n = 20) mixed breed bitches. The bitches were divided into control group (CTRL) (n = 10) with BCS 4-6 and into obese group (OB) (n = 10) with BCS ≥ 7 values. All bitches in the study were in anoestrus.

Our results showed the expression and anatomic localization of Ob, BDNF and respective receptors in the ovary of bitches. Ob and BDNF were located in early follicles exclusively in control group while ObR was expressed in obese group follicles. TrKb showed the same expression in both groups.

In conclusion, our data suggest the presence, even in canine, of a strict correlation between regulation of food intake/energy balance and ovarian activity.

Indice

1	INTRODUZIONE	1
1.1	LEPTINA	3
1.1.1	Generalità	3
1.1.2	Ruolo nell'omeostasi energetica.....	7
1.1.3	Leptina e obesità.....	11
1.1.4	Ruolo nei fenomeni riproduttivi	15
1.2	BDNF	18
1.2.1	Generalità	18
1.2.2	BDNF e obesità	20
1.2.3	Ruolo del BDNF a livello ovarico	22
2	SCOPO DELLA TESI.....	26
3	MATERIALI E METODI.....	28
3.1	Animali	28
3.2	Raccolta e organizzazione dati anamnestici	29
3.3	qRT-PCR	35
3.4	Immunoistochimica.....	37
4	RISULTATI	39
4.1	qRT-PCR	39
4.2	Immunoistochimica.....	40
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	46
	BIBLIOGRAFIA	52

1 INTRODUZIONE

La leptina è un ormone già da tempo noto per il suo coinvolgimento nella regolazione del bilancio energetico nell'organismo animale, a livello del quale, come dimostrato da numerosi ricercatori, assume un ruolo cruciale e da protagonista.

Le nuove conoscenze acquisite hanno, però, fornito ulteriori elementi utili a comprendere la grande varietà di funzioni biologiche svolte da tale sostanza. In particolare, lo studio della funzionalità riproduttiva e delle sue alterazioni in rapporto allo stato di nutrizione e *in primis* all'obesità rappresenta un punto importante nella ricerca degli ultimi anni. L'obesità è una condizione clinica conseguente ad un'alterazione del bilancio energetico che causa un eccessivo accumulo di tessuto adiposo a livello corporeo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha recentemente definito l'obesità "un'epidemia globale". In Europa la percentuale di individui sovrappeso con un Body Mass Index (BMI) ≥ 25 e la percentuale di individui obesi con BMI ≥ 30 raggiungono, rispettivamente, il 40% e il 12% della popolazione. Parallelamente all'aumento dell'incidenza di obesità il tasso di incidenza e di mortalità per patologie legate a tale condizione fa di quest'ultima una vera e propria emergenza sociale e sanitaria nei paesi

industrializzati. Le complicanze mediche legate all'obesità coinvolgono numerosissimi campi clinici, dalle patologie cardiovascolari a quelle ortopediche (Speakman, 2013) fino alle alterazioni endocrine.

Riguardo a quest'ultimo aspetto, recentemente maggiore attenzione è stata rivolta alla possibile correlazione tra obesità e alterazioni della sfera riproduttiva come, per esempio, la sindrome dell'ovaio policistico nella donna (Kale-Gurbuz et al., 2013) e, più in particolare, tra questa patologia e i livelli di espressione della leptina e del suo recettore a livello ovarico (Li et al., 2013; Löffler et al., 2001).

E' noto che l'attività riproduttiva nei mammiferi rappresenta un fenomeno fisiologico energeticamente dispendioso, non stupisce quindi l'esistenza di un legame diretto tra bilancio energetico e attività riproduttiva e, più in particolare, funzionamento ovarico. In passato è già stato dimostrato come lo stato di nutrizione influisca sull'istaurarsi della pubertà e come il digiuno interferisca negativamente sul fisiologico svolgimento del ciclo estrale in varie specie (Al-Azraqi 2007, Wade et al., 1996).

La regolazione dei meccanismi legati sia al bilancio energetico che alla sfera riproduttiva vede coinvolto anche il BDNF, neurotrofina fondamentale per la regolazione dei meccanismi di *food intake*, il quale ha mostrato importanti alterazioni della sua espressione a livello

centrale in condizioni di obesità. Pertanto, oltre allo studio sulla leptina, quello sulla presenza e funzione a livello ovarico del BDNF potrebbe vantaggiosamente essere approfondito contribuendo ad arricchire le conoscenze, attualmente ancora scarse, sul complesso rapporto tra regolazione dell'assunzione di cibo, obesità e sviluppo ovarico fornendo, infine, elementi utili nella interpretazione e gestione clinica di determinate condizioni patologiche.

1.1 LEPTINA

1.1.1 Generalità

La leptina, dal greco *leptos*, cioè “sottile”, è un peptide citokina-like, formato da una catena di 167 amminoacidi e presenta un peso molecolare di 16 kDa (fig.1). La sua sequenza genica è stata identificata nel 1994 nella specie murina, in particolare a livello del gene ***Ob*** (*obese*) (Zhang et al., 1994). Nel corso di questi primi studi si è potuto osservare come gli animali deficienti del gene codificante per la leptina presentassero alterazioni significative del metabolismo energetico con il conseguente instaurarsi di condizioni di obesità e, pertanto, tale proteina viene considerata il principale fattore responsabile dell'obesità nei topi mutanti *ob/ob*.

La leptina svolge le sue numerose funzioni a livello cellulare grazie al legame con un recettore a singolo dominio transmembrana, (**ObR** o **LepR**), (Shpilman et al., 2011) simile dal punto di vista strutturale alla superfamiglia dei recettori di classe I delle citochine (Frühbeck, 2006). Nei mammiferi è noto un unico recettore, ObR, tuttavia il gene *ObR* codifica per diverse isoforme che differiscono tra loro a livello del terminale carbossilico (Tartaglia, 1997).

In base alla lunghezza del dominio intracellulare, le proteine Ob-R si dividono in una *long form* (Ob-Rb) e in quattro *short forms* (Ob-Ra, c, d, f) (Cinti et al., 2001). Oltre a queste, esiste anche un'isoforma solubile (Ob-Re) che manca del dominio transmembrana e sembrerebbe coinvolta nel trasporto della leptina nel sangue.

La *long form* (Ob-Rb) contiene un dominio di circa 300 amminoacidi, e, come prima accennato, presenta un'altissima omologia con il recettore per le interleuchine e, di conseguenza, la possibilità di funzionare sfruttando i segnali di traduzione del sistema JAK/STAT (Bjorbaek et al., 2004).

Tuttavia, a differenza di molti altri recettori per le interleuchine, il legame ligando-recettore ObRb non è attivato attraverso la dimerizzazione del recettore ma, più verosimilmente, grazie ad un cambio di conformazione risultante nella fosforilazione e conseguente attivazione JAK2. L'attivazione di ObRb porta all'avvio di numerosi

pathway biochimici, ognuno preposto al controllo e alla regolazione di una specifica funzione della leptina, non solo in relazione ai suoi effetti sul metabolismo energetico, ma anche in relazione a quelli sull'attività riproduttiva (Allison & Myers, 2014).

ObRb si trova localizzato principalmente a livello centrale, in particolare a livello ipotalamico, e, in minor misura, in distretti periferici come intestino, fegato, pancreas, tessuto adiposo, ovaie e testicoli (De Matteis et al., 1998).

Attualmente si ritiene che solamente l'isoforma b presenti l'intero dominio necessario per il corretto funzionamento della leptina (Chua et al., 1997; Tartaglia, 1997).

Per quanto riguarda le *short forms*, sono state avanzate diverse ipotesi circa la loro funzione (Yang et al., 2004; Zhang & Scarpace, 2009), ma, attualmente, nessuna di esse risulterebbe coinvolta negli effetti classicamente attribuiti alla leptina quali regolazione del bilancio energetico ed omeostasi glicemica.

Negli ultimi anni diverse ricerche hanno cercato di far luce sul ruolo del recettore della leptina anche sfruttando metodiche di indagine genetica. In questo modo è stato possibile rivelare una correlazione tra la presenza del gene ObR e condizioni metaboliche particolari quali insulino-resistenza, obesità, dislipidemia (Frühbeck, 2006) e

alterazioni metaboliche specifiche di alcuni gruppi etnici nella specie umana (Matsuoka et al., 1997).

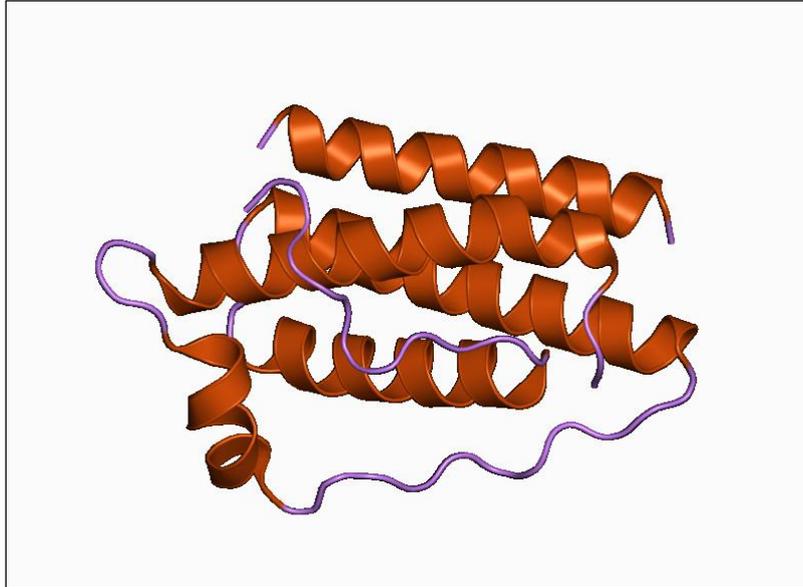


Figura 1. Struttura tridimensionale della leptina

1.1.2 Ruolo nell'omeostasi energetica

La leptina nei mammiferi è secreta prevalentemente nel circolo sanguigno dagli adipociti e agisce a livello encefalico per regolare diversi meccanismi fisiologici tra cui prevalentemente il *food intake* e il metabolismo (Pelleymounter et al., 1995; Zhang et al., 1994). A questo livello essa svolge la sua azione sia a breve che a lungo termine. Nel primo caso, la leptina plasmatica fornisce il segnale di sazietà, (Ahima, 2005; Ahima & Osei, 2004) mentre, nel secondo caso, la sua concentrazione plasmatica giornaliera fornisce informazioni sullo status energetico a lungo termine al cervello (Chehab et al., 2004).

La leptina è sintetizzata anche a livello del tratto gastrointestinale non solo nei mammiferi (Russo et al., 2012; Cammisotto et al., 2010, 2005; Cinti et al., 2001; Sobhani et al., 2000) ma anche nei pesci (Russo et al., 2011). Inoltre, in alcune specie ittiche come zebrafish e pesce palla, sono stati individuati due paraloghi, **LepA** e **LepB**, che, si ipotizza, svolgano ruoli differenti. In particolare, la LepA funge probabilmente da segnale di sazietà essendo prevalentemente espressa nel fegato e nei tessuti ricchi di grasso. La LepB, invece, mostra livelli di espressione estremamente bassi nel fegato e negli altri organi fatta eccezione per le gonadi, sia maschili che femminili, dove si suppone

svolga un ruolo nella maturazione gonadica e nella riproduzione (Gorissen et al., 2009). Tale ipotesi è ulteriormente supportata dagli alti livelli di espressione dei recettori per la leptina in questi organi, in particolare nello zebrafish (Copeland et al., 2011).

L'mRNA della leptina è stato ritrovato nelle cellule principali della mucosa gastrica nell'uomo e nella mucosa del fondo gastrico nel ratto. A questo livello, rispetto agli adipociti, la sintesi e la secrezione di leptina dipendono dalla presenza di un precursore di 19 KDa. Precedenti studi hanno mostrato che, in condizioni post-prandiali, l'espressione di tale proteina a questo livello fosse minore che durante il digiuno (Attele et al., 2002). Inoltre, in seguito alla stimolazione della secretina e della pentagastrina, i livelli di leptina aumentano nel succo gastrico, dove viene ritrovata libera e stabile. Infine, è stata riscontrata espressione della leptina anche a livello delle cellule enteroendocrine dello stomaco (Attele et al., 2002).

Nell'intestino tenue, la leptina determina un incremento degli effetti della colecistochinina (CCK), rilasciata dalle cellule enteroendocrine in risposta alla presenza di grassi e proteine a livello luminale, in particolare in riferimento alla regolazione dei livelli di calcio intracellulare, ai fenomeni di svuotamento gastrico e di inibizione del *food intake* e nel controllo dell'espressione genica (Dockray, 2013; de Lartigue et al., 2012; Yarandi et al. 2011; Attele et al., 2002).

La leptina, inoltre, svolge un'importante azione anche nel coadiuvare il mantenimento dell'integrità delle cellule epiteliali gastriche, e quindi nella gastroprotezione, tramite l'induzione di una risposta proliferativa delle cellule della mucosa gastrica (Attele et al., 2002). Inoltre, la leptina potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'assorbimento di nutrienti e della motilità intestinale, come anche in meccanismi comportamentali di tipo esplorativo che sottendono alla ricerca di cibo (Attele et al., 2002).

Infine, recenti ricerche hanno rivolto l'attenzione sulla possibilità di un coinvolgimento della leptina nell'oncogenesi a livello dell'apparato digerente tenendo anche conto dei suoi svariati effetti come immunoregolatore (Yarandi et al., 2011). Diverse osservazioni, infatti, hanno sottolineato che, fisiologicamente, la presenza di leptina aumenta l'assorbimento di piccoli peptidi e diminuisce quello dei glucidi mentre, al contrario, negli stati patologici essa favorisce indistintamente l'assorbimento di proteine, lipidi e glucidi. Inoltre, è stata osservata una *up-regulation* della leptina a livello della mucosa del colon in pazienti con IBD (*Irritable Bowel Syndrome*).

Accanto agli effetti ipotizzati e dimostrati sulla regolazione del metabolismo energetico e del *food intake*, la leptina, data la sua espressione in diversi organi, risulterebbe coinvolta in numerose altre funzioni biologiche (Sánchez et al., 2005).

Essa, infatti, pur essendo come già accennato prodotta principalmente dagli adipociti, viene anche secreta a livello della placenta (Dall'Aglio et al., 2012b), del muscolo scheletrico (Wang et al., 1998), delle ghiandole salivari (Dall'Aglio et al., 2012a), del pancreas (Dall'Aglio et al., 2013) e dell'epitelio ghiandolare mammario (Casabiell et al., 1997), confermando così il suo possibile ruolo in diversi organi e tessuti.

Nella specie canina, invece, benché studi di biologia molecolare abbiano dimostrato la produzione di leptina a livello del tessuto adiposo (Iwase 2000), mancano dati specifici relativi alla sua produzione ed espressione in altri distretti tissutali.

Il cane rappresenta la specie d'affezione più vicina all'uomo in quanto in molte realtà è ormai parte integrante del contesto familiare. Negli ultimi anni è stato possibile assistere, anche in tale specie, ad un aumento dell'incidenza di patologie endocrine e metaboliche quali diabete mellito ed obesità, in passato decisamente meno comuni. Tale aumento è stato imputato alla sempre più simili abitudini, anche alimentari, tra cane e proprietario. Un esempio banale è fornito dall'ingestione di alimenti zuccherati che normalmente non dovrebbero far parte della razione alimentare idonea per il cane ma che di fatto, in quantità più o meno abbondanti, vengono somministrati al proprio cane dalla stragrande maggioranza dei proprietari.

1.1.3 Leptina e obesità

La leptina, grazie alla sua capacità di superare la barriera ematoencefalica può raggiungere il suo principale sito d'azione: l'ipotalamo e, in particolare, il nucleo arcuato. La sua azione a livello cellulare (fig. 2), svolta mediante un meccanismo di endocitosi mediata da specifici recettori citoplasmatici e attraverso la sintesi di neuropeptidi quali la prooppiomelanocortina (POMC) e il neuropeptide Y (NPY) (Mercer et al., 2014; Lee et al., 2013), risulta fondamentale per il corretto funzionamento dei meccanismi posti alla base del senso di sazietà che permette all'organismo di gestire correttamente le risorse energetiche e, in particolare, di evitare un'eccessiva assunzione di cibo. Attualmente, infatti, sempre più attenzione viene posta alla correlazione tra leptino-resistenza e obesità (Crujeiras et al 2015).

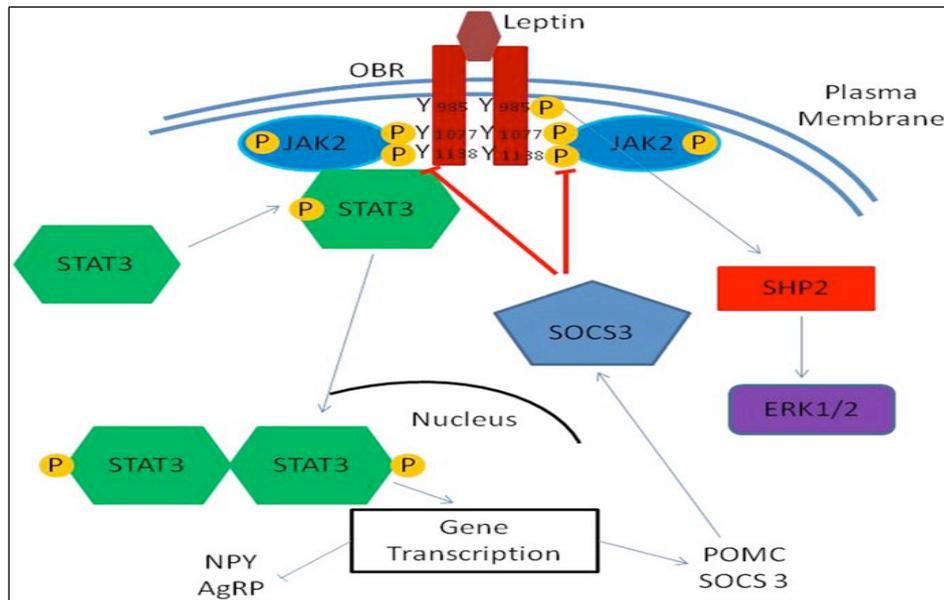


Figura 2. Schema d'azione della leptina a livello recettoriale (da Crujeiras et al 2015)

La concentrazione sierica di leptina è strettamente legata a numerosi fenomeni endocrini e metabolici implicati nella sintesi e nell'azione di sostanze coinvolte nella produzione adipocitaria di tale sostanza quali catecolammine, insulina e glucorticoidi (Song et al., 2000; Herpertz et al., 2000; Laferrère et al., 2002; Gavrilu et al., 2003). I numerosi studi condotti sull'influenza di questi ultimi, in particolare prednisone (Song et al., 2000), desametasone (Laferrère et al., 2002; Lewandowski et al., 2001) e metilprednisolone (Yilmaz et al., 2007; Tataranni et al., 1997) sull'azione della leptina hanno portato a risultati piuttosto contrastanti, tuttavia, è senz'altro possibile affermare che tale relazione esiste ed è strettamente dipendente, oltre che dal tipo di

glucorticoide e dalla via di somministrazione (orale o parenterale), anche dalla dose utilizzata.

In corso di obesità è stato dimostrato un aumento della leptina circolante proporzionale all'incremento dei depositi adiposi (Mizuno et al., 1996; Sagawa et al., 2002) mentre la sua somministrazione in topi obesi (Halaas et al., 1995) e in bambini con carenze congenite di leptina (Farooqi et al., 1999) ha portato ad una migliore regolazione dei meccanismi di alimentazione e di utilizzo delle risorse energetiche con conseguente perdita di peso. La relazione tra livelli di leptina plasmatici e stato di nutrizione è stata studiata anche in alcune specie ibernanti, nelle quali è stato possibile osservare una correlazione con il BMI (Srivastava & Krishna, 2007) ed un suo decremento prima della ibernazione, cioè al momento di massimo sviluppo della massa grassa (Kronfeld-Schor et al., 2000), mentre la somministrazione di leptina esogena ha mostrato una diminuzione dell'incremento di peso post-ibernazione (Boyer et al., 1997). Diverse ricerche hanno mostrato oscillazioni della concentrazione della leptina anche in base all'alternanza dei periodi di digiuno e di alimentazione durante il giorno nell'uomo, nel ratto (Schoeller et al., 1997; Ahima et al., 1998) e nel cane (Ishioka et al., 2005). In quest'ultimo, in particolare, è stato osservato un decremento dei livelli di leptina circolante durante il digiuno con un ritorno a livelli normali entro 5-12 ore dall'assunzione

di cibo (Ishioka et al., 2005). Proprio nel cane, l'aumento dell'insorgenza di obesità negli ultimi anni ne ha fatto la malattia nutrizionale con il più alto tasso di incidenza in questa specie (Markwell et al., 1990) e uno dei principali fattori di rischio associato a diverse patologie. Ciò ha conseguentemente stimolato l'interesse dei ricercatori nel tentativo di comprendere, anche nella specie canina, l'esatto ruolo svolto dalla leptina in tale alterazione metabolica (Ricci & Bevilacqua, 2012) anche in ragione di una sempre più diffusa prospettiva *One Health* (Sandøe et al., 2014).

L'utilità della leptina come marker di obesità nella specie canina è stata avallata da recenti studi che hanno dimostrato la sua attività indipendentemente sia dal sesso che dal peso dell'animale e quindi dalle grandi variazioni esistenti da una taglia canina ad un'altra. Inoltre, la presenza di tale proteina non pare subisca l'influenza di particolari condizioni, spesso legate ad un aumento dell'insorgenza di obesità, come per esempio in seguito alla sterilizzazione chirurgica (Ishioka et al., 2007). Al contrario, è stata stabilita la presenza di un legame diretto tra valutazione della presenza di leptina e *Body Condition Score (BCS)* (Ishioka et al., 2007; Mazaki-Tovi et al., 2010, Jeusette et al., 2005), un metodo semplice ma piuttosto affidabile per valutare lo stato di nutrizione del cane. Attualmente non sono presenti dati in letteratura circa la concentrazione e l'espressione della leptina

e del relativo recettore in cani che hanno dimostrato o per i quali si suppone una predisposizione di razza all'insorgenza di condizioni di sovrappeso e obesità.

1.1.4 Ruolo nei fenomeni riproduttivi

La leptina è coinvolta nei fenomeni che intervengono sulla maturità sessuale e sull'istaurarsi della pubertà tramite il rilascio di gonadotropine stimolato dal GnRH, prodotto a livello ipotalamico (Caro et al., 1996).

L'importanza dell'azione biologica della leptina nella regolazione dei fenomeni riproduttivi nei mammiferi è testimoniata dall'ampio riscontro di tale sostanza a livello ovarico in numerose specie (Batista et al., 2013; Löffler et al., 2001; Ryan et al., 2002, 2003; Sarkar et al., 2010; Smolinska et al., 2010). In particolare, la sua presenza è stata riscontrata sia nelle cellule follicolari che negli oociti di diverse specie animali (Ruiz-Cortés et al., 2000; Ryan et al., 2003; Muñoz-Gutiérrez et al., 2005; Sarkar et al., 2010; Antczak & Van Blerkom, 1997; Craig et al., 2004; Madeja et al., 2009). Si ipotizza che la presenza di leptina esogena possa stimolare la follicologenesi nella pecora (Kendall et al., 2004; Muñoz-Gutiérrez et al., 2005) e ripristinare livelli normali di fertilità in topi obesi *ob knockout* (Barash et al., 1996; Chehab et al.,

1996; Kikuchi et al., 2001). Sembra, inoltre, che la leptina abbia un ruolo anche nel mediare gli effetti del digiuno sull'estro e sulla funzione luteinica nelle capre (Al-Azraqi, 2007). La valutazione dei livelli di leptina nella fase luteinica e la sua relazione con la secrezione di progesterone ha mostrato un aumento dell'espressione di ObR sia nella bovina (Schams et al., 2002; Sarkar et al., 2010) che nella gatta (Albrizio et al., 2013).

La leptina, inoltre, influisce sulla steroidogenesi, l'apoptosi e la proliferazione delle cellule della granulosa (Almog et al., 2001; Spicer, 2001; Brannian & Hansen, 2002) sebbene il suo ruolo in tale ambito debba ancora essere meglio chiarito. E' stato anche ipotizzato un ruolo inibitorio sull'attività ovarica, con particolare riguardo alla steroidogenesi (Spicer et al., 2000; Ghizzoni et al., 2001, Guo et al., 2011).

Recenti studi hanno ricercato e valutato la correlazione esistente tra ipofertilità/infertilità e obesità. Tra le cause di ipofertilità una delle più comuni, in particolare nella specie umana, è rappresentata dalla sindrome dell'ovaio policistico (*polycystic ovary syndrome, PCOS*).

I soggetti affetti da ovaio policistico mostrano spesso livelli particolarmente elevati di leptina e insulino-resistenza (Yildizhan et al., 2011). Inoltre, studi sulla leptina in soggetti affetti da PCOS hanno

mostrato un aumento dei livelli di tale ormone sia nel gruppo obeso che non obeso rispetto al gruppo controllo (Yildizhan et al., 2011).

Tuttavia, al momento attuale, i dati riguardanti obesità, PCOS e leptina hanno portato alla luce risultati piuttosto contrastanti (Glintborg & Andersen, 2010; Mendonça et al., 2004). Infatti, mentre alcuni studi hanno dimostrato che leptina non ha sempre un ruolo da protagonista nella patogenesi del sovrappeso e dell'obesità nei soggetti con ovaio policistico (Spanos et al., 2012) e che i suoi livelli sierici in questi ultimi e in soggetti controllo siano sovrapponibili (Kale-Gurbuz et al., 2013), allo stesso tempo altri studi hanno messo in luce una stretta correlazione tra i livelli di leptina e la condizione di obesità in soggetti obesi e normopeso affetti da PCOS rispetto ai gruppi controllo (Lecke et al., 2013; Svendsen et al., 2012). Inoltre, studi di genetica hanno dimostrato l'associazione tra presenza di ObR e insorgenza di sindrome dell'ovaio policistico (Li et al., 2013).

Infine, studi condotti sull'effetto dell'esercizio fisico in donne sovrappeso o obese affette da problemi di ipofertilità, suggeriscono che esso possa migliorare la funzionalità riproduttiva influenzando e modulando l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Hakimi & Cameron, 2017) e sottolineano, ancora una volta, lo strettissimo legame e le ripercussioni della disfunzione metabolica sulla fertilità.

Pertanto, malgrado i numerosi studi condotti, attualmente il ruolo della leptina sulla funzione riproduttiva non è del tutto chiaro e molti risultati appaiono in contrasto tra loro. Per tale motivo ulteriori ricerche appaiono necessarie per permettere una esatta caratterizzazione delle numerose funzioni della leptina e poter meglio chiarire i legami intercorrenti tra esse e la sfera metabolica e riproduttiva.

1.2 BDNF

1.2.1 Generalità

Il BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) (Fig.3) è un fattore di crescita appartenente alla famiglia delle neurotrofine (Lewin & Barde, 1996).

Tale proteina è coinvolta nello sviluppo neuronale e rappresenta la neurotrofina più rappresentata a livello cerebrale. Essa promuove la plasticità neuronale di diverse sottopopolazioni di neuroni nonché la differenziazione e la maturazione neuronale durante lo sviluppo del sistema nervoso, la crescita e il mantenimento degli assoni (Cohen-Cory et al., 2010).

Tale neurotrofina viene inizialmente sintetizzata sotto forma di precursore (**proBDNF**), che in seguito subisce un processo di clivaggio per assumere la sua forma matura (**mBDNF**) (Nagappan et al., 2009).

Le azioni del BDNF risultano amplificate (Hantzopoulos et al. 1994) o inibite (Kohn et al. 1999) dalla presenza di uno specifico recettore tirosin-chinasi dipendente chiamato **TrkB** (Huang & Reichardt, 2001). Esso è noto anche come *neurotrophic tyrosine kinase receptor 2* (**Ntrk2**) (Klein et al. 1991). Quest'ultimo, insieme al BDNF, risulta ampiamente distribuito nei tessuti dei mammiferi (Hayashi et al., 1997; Mufson et al., 1999). In particolare, numerose ricerche hanno dimostrato la presenza di alti livelli di TrkB (Yan et al., 1997) e di BDNF a livello dell'ipotalamo nel ratto (Katoh-Semba et al., 1997, Tapia-Arancibia et al., 2004, Unger et al., 2007, Wang et al., 2010).

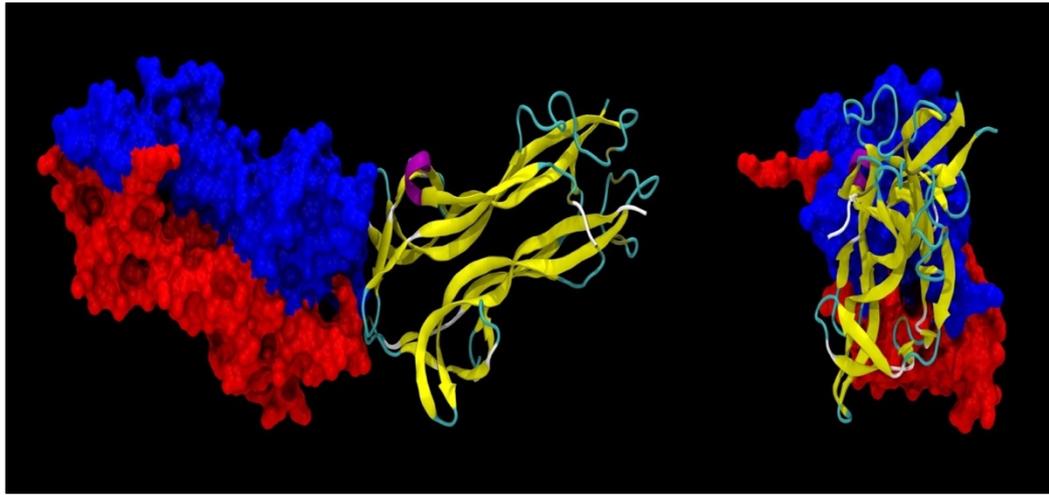


Figura 3. Struttura del BDNF

1.2.2 BDNF e obesità

La localizzazione anatomica a livello ipotalamico del BDNF e del suo recettore, suggerisce un loro coinvolgimento non solo nella maturazione neuronale ma anche in numerosi altri fenomeni fisiologici come la regolazione dei meccanismi di *food intake*.

Infatti, i nuclei ipotalamici sono le strutture anatomiche principalmente coinvolte nel comportamento alimentare e nella regolazione dell'appetito e, quindi, dell'ingestione di cibo (Kernie et al., 2000, Morton et al., 2006, Xu et al., 2003). Recenti ricerche, inoltre, suggeriscono un ruolo sia del BDNF che del TrkB anche nei meccanismi di controllo del peso corporeo (Noble et al., 2011). Studi sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione esogena di BDNF porta ad una riduzione dell'assunzione di cibo nei roditori. In

particolare, dopo i primi studi condotti su tale argomento che ipotizzavano l'azione del BDNF sulla modulazione dell'assunzione di cibo e sulla riduzione dell'incremento ponderale a livello centrale (Lapchak et al., 1992; Pelleymounter et al., 1995), la ricerca ha continuato a fornire ulteriori dati sul ruolo di questa neurotrofina. Grazie agli studi condotti su modelli sperimentali murini, mutanti BDNF+/-, in cui i soggetti *knockout* hanno mostrato iperfagia e obesità è stato possibile ipotizzare l'azione anoressizzante del BDNF (Rios et al., 2001). È stato, inoltre, osservato come una dieta ad alto tenore lipidico (45%) e ricca in carboidrati somministrata *ad libitum* porti ad una diminuzione dei livelli di BDNF (Liu et al., 2014; Park et al., 2010) lasciando supporre che tale tipo di dieta alteri i delicati meccanismi che sottendono ai meccanismi di *food intake* tra cui proprio l'espressione del BDNF (Genzer et al., 2016).

Ricerche di genetica svolte sull'uomo hanno sottolineato la correlazione tra mutazioni dei geni codificanti per BDNF e per TrkB e l'instaurarsi di diverse forme di disturbi alimentari e di obesità (Gratacòs et al., 2007; Gray et al., 2006; Hotta et al., 2009; Ribasés et al., 2004; Thorleifsson et al., 2009).

L'azione del BDNF sull'assunzione di cibo, infine, non si limita al sistema nervoso centrale ma si estende anche a livello periferico con

effetti, ad esempio, sul metabolismo dei carboidrati e sul dispendio energetico (Yamanaka et al., 2007, 2006).

1.2.3 Ruolo del BDNF a livello ovarico

Come precedentemente accennato, oltre ad essere espresso a livello ipotalamico, il BDNF nei vertebrati è stato identificato anche in diversi organi quali l'occhio, in particolare a livello retinico (Lum et al., 2001; Vecino et al., 2002; Germanà et al., 2010b), nella linea laterale (Germanà et al., 2010a) e sempre più ricerche ne hanno accertato la presenza nell'ovaio (Jensen & Johnson, 2001; Harel et al., 2006; Seifer et al., 2002).

Lo studio delle funzioni svolte dal BDNF a livello ovarico ha portato ad ipotizzarne un ruolo nello sviluppo dell'apparato riproduttivo, dalla maturazione dell'ocita alla formazione della blastocisti (Martins Da Silva et al., 2005; Anderson et al., 2010; Kawamura et al., 2005; Yu et al., 2012). Inoltre, numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sui molteplici ruoli e sull'influenza svolta dalle neurotrofine a livello ovarico sia in condizioni fisiologiche che patologiche (fig.4) (Streiter et al., 2016). È ormai accertato, infatti, come tutte le neurotrofine (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4:5) siano espresse a livello ovarico (Ernfors et al., 1990; Berkemeier et al., 1991; Hallboök et al., 1991;

Dissen et al., 1995, 1996), così come i loro rispettivi recettori (p75 NTR, trkA, trkB and trkC) (Lamballe et al., 1991).

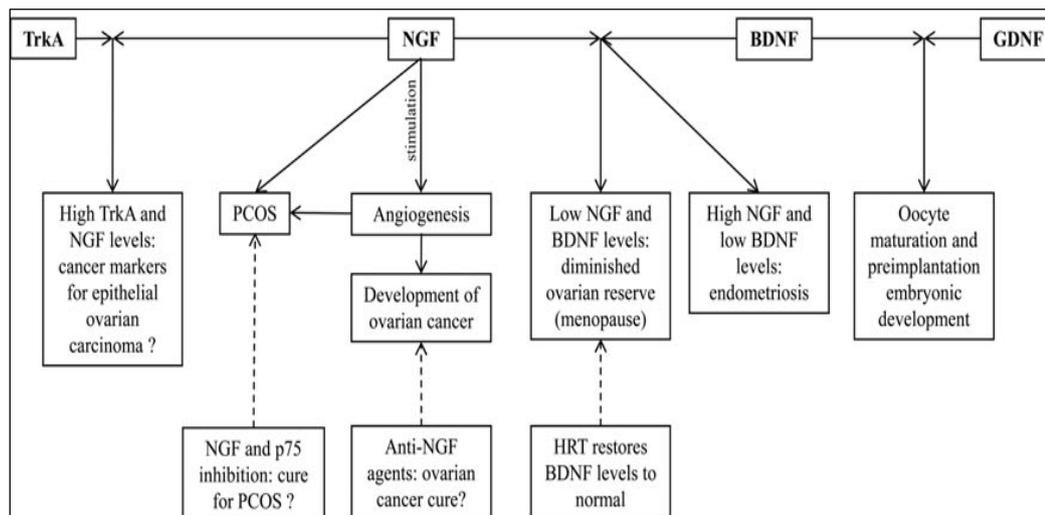


Figura 4. Aspetti clinici del ruolo delle neurotrofine a livello ovarico (da Streiter et al., 2016)

L'utilizzo di topi knockout per diverse isoforme di Ntrk2 e rispettivi ligandi, ha permesso di rilevare alterazioni nelle fasi iniziali dello sviluppo follicolare bloccando la crescita dei follicoli allo stadio primario (Paredes et al., 2004). Inoltre, studi di biologia molecolare hanno permesso di ipotizzare una correlazione tra la presenza del recettore nelle cellule della granulosa e nell'ocita e lo stadio di sviluppo ovarico (Dissen et al., 1995; Paredes et al., 2004).

Sia BDNF che TrkB sono presenti già nei follicoli primordiali di ratto a livello dell'ocita e, man mano che lo sviluppo follicolare procede

verso lo stadio di follicolo primario, è possibile localizzarli nelle cellule della granulosa (Paredes et al., 2004). Durante lo sviluppo neonatale, nel ratto e in maniera simile nell'uomo (Anderson et al., 2002), entrambi sono già presenti prima dell'inizio della follicologenesi e dello sviluppo dei follicoli primordiali (Dissen et al., 1995). In particolare, il BDNF nei roditori è riscontrabile non solo a livello neonatale (Spears et al., 2003) ma anche fetale (Dissen et al., 1995).

L'espressione del BDNF è stata osservata sia negli oociti che nelle cellule del cumulo ooforo nella bovina (Martins da Silva et al., 2005), mentre quella di TrkB solo in queste ultime a differenza di quanto osservato nel ratto in cui essa è apparsa preponderante a livello dell'oocita (Seifer et al., 2002; Kawamura et al., 2005).

Nella scrofa il BDNF è stato identificato sia negli oociti che nelle cellule somatiche mentre TrkB è risultato assente nei primi (Lee et al., 2007). Nella donna il BDNF è stato individuato nel liquor follicolare (Seifer et al., 2003) ed è stato ritenuto di esclusiva provenienza dalle cellule componenti il cumulo ooforo (Seifer et al., 2002). Inoltre, in età fetale, esso è stato individuato in maniera predominante a livello ovarico nel citoplasma delle cellule somatiche ed un incremento della sua espressione è stato osservato in concomitanza con lo sviluppo dei follicoli primordiali (Childs et al., 2010).

A livello ovarico, è stata dimostrata l'esistenza di un gradiente cortico-midollare nell'espressione del BDNF tramite l'osservazione di una marcatura immunohistochimica di crescente intensità procedendo dalla corticale alla midollare dell'organo (Childs et al., 2010).

Per quanto riguarda gli stadi di maturazione follicolare più avanzati, la presenza di BDNF è stata dimostrata nei follicoli antrali in diverse specie quali donna (Feng et al., 2003; Seifer et al., 2002, 2003, 2006; Zhao et al., 2011), bovina (Martins Da Silva et al., 2005) e topo (Kawamura et al., 2005). In quest'ultimo è stato altresì osservato come i suoi livelli si innalzino contemporaneamente a quelli delle gonadotropine nel periodo preovulatorio (Kawamura et al., 2005) e in seguito al picco di ormone luteotropo (LH). Esperienze *in vitro* su cellule ovariche umane hanno mostrato un aumento della presenza di BDNF in seguito all'aggiunta di gonadotropine (Feng et al., 2003) sebbene altri studi abbiano mostrato risultati contrastanti (Zhao et al., 2011).

Tali osservazioni lasciano ipotizzare che il BDNF abbia un ruolo come modulatore della follicologenesi, probabilmente in maniera paracrina, sia negli stadi iniziali che in quelli più avanzati sebbene siano presenti variazioni nella localizzazione dell'espressione a livello follicolare nelle varie specie (fig.5) (Linher-Melville and Li, 2013).

Expression	Species	Reference	Function	Species	Reference
Granulosa cells of primordial and primary follicles	Mouse	Paredes <i>et al.</i> (2004)			
Secreted by cumulus and granulosa cells	Mouse	Kawamura <i>et al.</i> (2005)	↑ Extrusion of 1st polar body	Mouse	Kawamura <i>et al.</i> (2005)
			↑ <i>In vitro</i> development of zygotes into preimplantation embryos		
			↑ Maturation of IVM oocytes	Mouse	Zhang <i>et al.</i> (2010a, 2010b)
			Improved meiotic spindle configuration and localization/distribution of cortical granules at MI		
Neonatal rat ovary before primordial follicle formation	Rat	Dissen <i>et al.</i> (1995)			
Oocytes and cumulus cells	Cow	Martins da Silva <i>et al.</i> (2005)	↑ Blastocyst rate of parthenogenetically activated embryos	Cow	Martins da Silva <i>et al.</i> (2005)
			↑ Percentage of MI oocytes	Cow	Hong <i>et al.</i> (2009)
Oocytes and follicular somatic cells	Pig	Lee <i>et al.</i> (2007)	↑ Extrusion of 1st polar body	Pig	Lee <i>et al.</i> (2007)
			↑ Developmental competence to reach the blastocyst stage		
Follicular fluid	Human	Seifer <i>et al.</i> (2002a, 2002b, 2003) and Sadeu <i>et al.</i> (2012)	↑ Extrusion of 1st polar body	Mouse	Seifer <i>et al.</i> (2002a, 2002b)
Granulosa cells	Human	Zhao <i>et al.</i> (2011)	↑ Total number of MI oocytes	Human	Zhao <i>et al.</i> (2011)
Oocytes and cumulus cells	Human	Anderson <i>et al.</i> (2010)	Blocking antibodies against BDNF ↓ number of MI oocytes	Human	Anderson <i>et al.</i> (2010)
			↑ Failure to cleave when included in IVF media		

Figura5. Localizzazione e funzione di BDNF a livello ovarico in varie specie (da Linher- Melville & Li, 2013)

2 SCOPO DELLA TESI

Il nostro studio si è prefissato il raggiungimento di un duplice obiettivo. Il primo è stato quello di indagare l'espressione immunoistoichimica della leptina e del suo recettore nell'ovaio di cagna e di effettuare un confronto tra soggetti normopeso e sovrappeso/obesi. L'indagine ha mirato all'arricchimento dei dati scientifici attualmente in nostro possesso circa i legami esistenti tra espressione di leptina, stato di nutrizione e stato riproduttivo nel cane. Tale specie, infatti, sempre più si ritrova a condividere con l'uomo

abitudini di vita e alimentari nonché patologie ad esse correlate rappresentando, pertanto, un modello sperimentale non trascurabile.

La carenza di dati in letteratura riguardanti l'espressione della leptina in tessuti diversi da quello adiposo ma il cui funzionamento, come nel caso del tessuto ovarico, ha dimostrato essere strettamente connesso all'azione di tale sostanza, ha suggerito l'esigenza di approfondire e raccogliere nuovi elementi per meglio chiarire tale argomento.

Il secondo obiettivo è stato quello di ampliare ulteriormente i dati in nostro possesso su un'altra proteina che, con il suo specifico recettore, risulta strettamente implicata sia nei fenomeni correlati al *food intake* che alla riproduzione, il BDNF.

L'indagine svolta su leptina, BDNF e relativi recettori nella presente ricerca ha visto, infine, l'integrazione dei dati quantitativi forniti dall'analisi biomolecolare con quelli prettamente morfologici derivati dalle metodiche immunoistochimiche.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Animali

Lo studio si è svolto tra l'ottobre 2015 e il marzo 2017 e la selezione dei soggetti è stata effettuata inserendosi nella attività clinica routinaria di alcuni ambulatori privati presenti sul territorio di Palermo, Messina e Trapani. Tra i cani di sesso femminile clinicamente sani per i quali era stato programmato l'intervento di ovariectomia, ne sono stati selezionati venti (n=20) suddivisi in due gruppi secondo i seguenti criteri:

- Gruppo controllo (**CNTR**) (n=10), costituito da cagne normopeso con BCS 4–5.
- Gruppo obesi (**OB**) (n=10) costituito cagne sovrappeso/obese con valori di BCS ≥ 7 . In particolare, soggetti con valori di 7 sono stati considerati sovrappeso mentre valori > 8 sono stati considerati indicativi di obesità (cfr Radakovich et al., 2017).

Tutti i soggetti selezionati erano meticci di taglia media con età compresa tra 1 e 4 anni (media $2,36 \pm 1,12$) nel gruppo di controllo e tra 2 e 5 anni (media $3 \pm 1,05$) nel gruppo obesi. Il peso era compreso tra 8,5 e 15 kg (media $11,63 \pm 2,45$) e tra 12,3 e 20 kg (media $15,02 \pm 2,3$), rispettivamente, nel gruppo controllo e nel gruppo obesi.

Prima della procedura chirurgica di ovaristerectomia, previa firma del modulo di consenso informato da parte dei proprietari, gli animali selezionati sono stati sottoposti a visita clinica, esame emocromocitometrico e colpocitologico volto a fornire indicazioni sul ciclo estrale. Tutti gli interventi hanno avuto luogo tra uno e due giorni dopo la visita clinica.

3.2 Raccolta e organizzazione dati anamnestici

Tutti i dati anamnestici ritenuti rilevanti ai fini dello studio svolto, sono stati raccolti al momento della visita clinica e organizzati in una tabella appositamente realizzata (tabella 1). I dati così ordinati erano relativi a quattro aree:

- **identificazione dell'animale:** nome/identificativo, età, peso.
- **stato di nutrizione e tonicità muscolare:** **BCS**, *Body Condition Score o System* (scala da 1 a 9, vedi fig. 7) e **MCS**, *Muscle Condition Score* (vedi fig. 8). Il metodo BCS rappresenta una maniera di valutazione dello stato di nutrizione del cane, in particolare della quantità di tessuto adiposo, pratica e soggettiva. Tale metodo si basa sull'analisi visiva e sulla palpazione di determinate regioni anatomiche e permette di dare

un punteggio su una scala da 1(sottopeso) a 9 (obeso) allo stato di nutrizione dell'animale osservato. È presente anche una scala di valutazione della BCS che va da 1 a 5 e che, seppur meno precisa, è abbastanza sovrapponibile a quella utilizzata nel presente studio. Sebbene, come già accennato, si tratti di un metodo di valutazione di tipo squisitamente soggettivo, la BCS con scala 1-9 ha dimostrato una stretta correlazione con la quantità di grasso corporeo misurata tramite densitometria a raggi X a doppia energia (DEXA) (Laflamme, 1997; Burkholder, 2000). Il metodo MCS, invece, permette una valutazione delle condizioni del tessuto muscolare (da normale a marcata perdita muscolare) e sfrutta gli stessi metodi della BCS: ispezione visiva e palpazione di precisi elementi anatomici, in particolare ossa temporali, scapole, rachide (vertebre lombari) e ossa pelviche. Tale metodo, attualmente ancora in corso di validazione, non presenta una diretta correlazione clinica con la BCS ma risulta utile nell'arricchire il quadro clinico del paziente relativamente allo stato di nutrizione e di salute generale e risulta citato nelle linee guida fornite dell'American Animal Hospital Association (AAHA).

Riferimento	Età(anni)	Peso(Kg)	BCS*	MCS**	Alimentazione	Attività fisica	Terapia insulinica	Terapia cortisonica	Altre osservazioni
1	1	10,5	4-5	Normale	Mista	Media	/	/	/
2	1,5	12	4-5	Normale	Commerciale	Media	/	/	/
3	4	14	4-5	Normale	Commerciale	Media	/	/	/
4	1	13	4-5	Normale	Commerciale	Moderata	/	/	/
5	2	9,3	4-5	Normale	Casalinga	Intensa	/	/	Grande variabilità nella razione alimentare
6	2,5	8,5	4-5	Normale	Mista	Media	/	/	/
7	1,6	15	4-5	Normale	Commerciale	Intensa	/	/	/
8	3	14	4-5	Moderata perdita	Casalinga	Moderata	/	7 giorni prima dell'intervento per reazione a puntura di insetto	/
9	3	8	3-4	Moderata perdita	Casalinga	Media	/	/	/
10	4	12	4-5	Normale	Commerciale	Moderata	/	/	/
A	3	17	7-8	Normale	Commerciale	Media	/	/	/
B	2	12,3	7-8	Normale	Commerciale	Media	/	/	/
C	4	14	7-8	Moderata perdita	Mista	Moderata	/	/	/
D	2	20	8-9	Moderata perdita	Commerciale	Moderata	/	/	Allergia alimentare in anamnesi
E	5	13,4	8-9	Normale	Commerciale	Moderata	/	/	/
F	3	14	7-8	Normale	Commerciale	Media	/	/	/
G	2	15	7-8	Normale	Casalinga	Moderata	/	/	/
H	4	14	8-9	Normale	Mista	Media	/	/	Grande variabilità nella razione alimentare
I	3	13,5	8-9	Moderata perdita	Casalinga	Moderata	/	/	/
L	2	17	8-9	Moderata perdita	Commerciale	Moderata	/	/	/

Tabella 1. Raccolta dati anamnestici relativi ai soggetti reclutati per l'esperimento

*Body condition score. Valuta l'indice di massa corporea prendendo come riferimento la quantità di massa grassa. Viene assegnato un punteggio a scale che oscilla da 1 a 9. Il punteggio adeguato per la maggior parte degli animali d'affezione è attestabile tra 4-5 (Linee guida AAHA).

**Muscle condition score. Come la BCS indicizza a mezzo di una scala la massa muscolare con valori che oscillano tra 1 e 4.



Figura 7. Scala di misurazione BCS (da <https://www.purina.co.uk>)

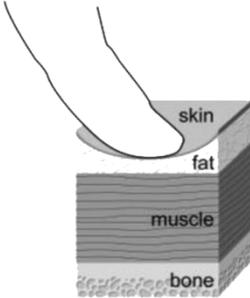
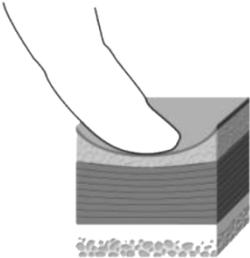
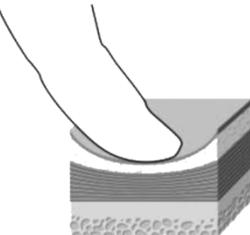
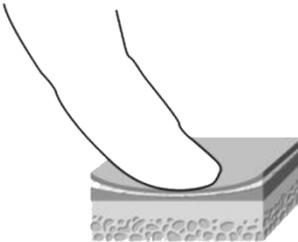
Description	Figure
No muscle wasting, normal muscle mass	 <p>The diagram shows a cross-section of a normal muscle. From top to bottom, there is a layer of skin, a layer of fat, a thick layer of muscle, and a layer of bone. A hand is shown pinching the skin and fat layers, with the muscle layer remaining thick and well-defined.</p>
Mild muscle wasting	 <p>The diagram shows a cross-section of a muscle with mild wasting. The muscle layer is noticeably thinner than in the normal diagram, while the skin and fat layers remain relatively intact.</p>
Moderate muscle	 <p>The diagram shows a cross-section of a muscle with moderate wasting. The muscle layer is significantly thinner, and the skin and fat layers appear slightly more compressed or pulled together.</p>
Marked muscle wasting	 <p>The diagram shows a cross-section of a muscle with marked wasting. The muscle layer is very thin, and the skin and fat layers are pulled together, making the muscle layer almost invisible.</p>

Figura 8. Scala di misurazione MCS (da Baldwin K., Bartges J., Buffington T., Freeman Grabow M., Legred J., Ostwald D., 2010. AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats, *Journal of the American Animal Hospital Association*. 46: 285-296)

- **abitudini di vita:** tipo di alimentazione, livello di attività fisica (moderata, media, intensa).
- **Condizioni di salute generali e ciclo estrale:** osservazioni su interventi subiti, patologie pregresse, allergie, utilizzo di terapia insulinica e terapia cortisonica, periodo del ciclo estrale al momento della visita valutato tramite colpocitologia. Ai fini dello studio sono stati presi in considerazione solo i soggetti che al momento del campionamento si presentavano sani e in anaestro (fig. 9).

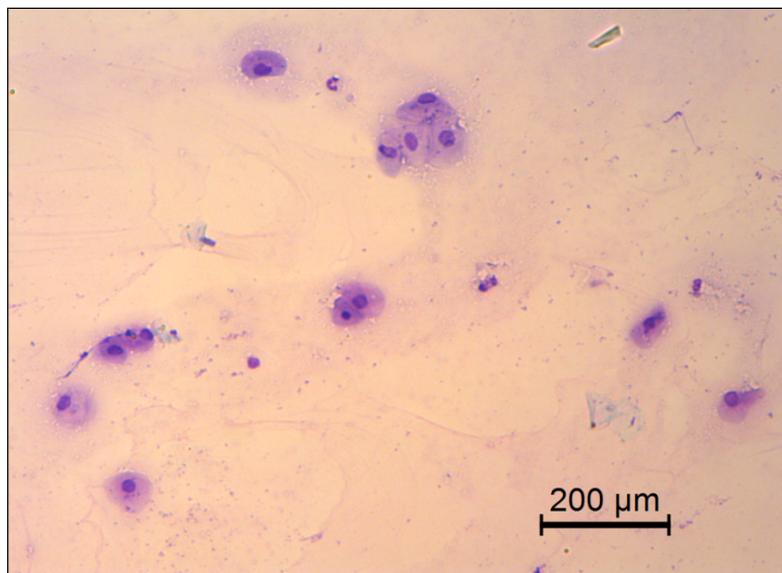


Figura 9. Citologia vaginale caratteristica dell'anaestro: scarsa cellularità con presenza di cellule intermedie e parabasali. Sono osservabili, inoltre, detriti cellulari (colorazione Diff-Quick, 20x)

3.3 *qRT-PCR*

I campioni utilizzati per la PCR sono stati isolati e raccolti in base ai gruppi sperimentali. L'isolamento del RNA e la trascrizione inversa per la PCR e l'RNAs totale sono stati realizzati da ovaie conservate in RNA-later (Sigma-Aldrich) usando il reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'integrità del RNA è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel agarosio. L'RNA estratto è stato retroscritto in una quantità di 20 microlitri, utilizzando 20U di Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) in un tampone contenente 2 microgrammi di RNA, 5 micromoli di oligo (dT) 12-18, mM dNTPS, 40U di RNA-ase inhibitor (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), 0.1 microgrammi/microlitri BSA e 10 mM DTT. La reazione è avvenuta a 42°C per 90 minuti. Le sequenze dei primer oligonucleotidici sono state basate sulle sequenze rivelate per leptina (accession number NM_001003070. **Sense** 5'ctgtgtgaagctgtgcca3'. **Reverse** 5'gaggatctgtgtagatgg3') e relativo recettore (accession number NM_001024634. **Sense** 5'gagatcacagatacgggc3'. **Reverse** 5'gcctctcactgaacttctg3'), per BDNF (accession number NM_001002975. **Sense** 5'caataaggac gcggacttgt3'. **Reverse** 5'gaccctcatcgacatgtttg3) e TrkB (accession number XM_843496.5.

Sense 5'tctgacgattgtggactctg3'. **Reverse** 5'accaggatcagctcagacaa3').

Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 2U Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), 1 micromole di primer, 10 ng di cDNA di ovaio di cagna, 0.2 mM di dNTP in 15 microlitri di buffer taq DNA Polymerase. La reazione è stata eseguita in un termociclatore (Hyband Th. Cycler) rispettando il seguente ordine: 1 min a 94°C per la denaturazione iniziale, poi 10 cicli a 94°C per 1 min, a 65°C per 30 secondi e a 72°C per 45 secondi, quindi altri 20 cicli a 94°C per 1 min, a 61°C per 30 secondi, 72°C per 45 secondi e infine a 72°C per 5 minuti. I risultati della PCR sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% tramite impiego di bromuro di etidio. I risultati sono stati calcolati utilizzando l'algoritmo $2^{\Delta\Delta Ct}$ contro la **Beta-actina** (accession number AF021873. **Sense** 5'ccaaccgtgagaagatgact3'. **Reverse** 5'gcagagcttcttccttgatg3'), ed espresso come differenza n-fold rispetto ad un calibratore arbitrario, scelto come valore superiore a $\Delta\Delta Cts$.

3.4 Immunoistochimica

Per poter identificare nei tessuti le proteine di nostro interesse, a partire dai campioni fissati in formalina 4%, disidratati ed inclusi in paraffina, sono state allestite su vetrino porta oggetto delle sezioni di 10 μm . Le sezioni sono state in seguito sottoposte a sparaffinatura tramite immersione in xilene e poi reidratate attraverso l'immersione in serie decrescente di alcool (da 100° a 70°), infine sono state risciacquate in acqua corrente al fine di garantire il completo allontanamento dell'alcool. In seguito è stata effettuata la processazione delle sezioni per l'immunoistochimica. Al fine di bloccare l'attività delle perossidasi endogene, le sezioni sono state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente con H_2O_2 al 3% e poi, per ridurre la possibilità di legami antigene-anticorpo aspecifici, con siero fetale bovino (BSA) al 5%. In seguito, sono state poste in tampone TRIS per altri 20 minuti in camera umida. Le sezioni, quindi, sono state incubate overnight in camera umida a 4°C con gli anticorpi primari policlonali anti-Ob A-20: sc-842 (Santa Cruz Biotechnology, INC.), anti ObR N-20: sc-1833 (Santa Cruz Biotechnology, INC.), anti-BDNF (Chemicon International, INC.) e anti-TrKb 794: sc-12 (Santa Cruz Biotechnology, INC.). Al termine dell'incubazione con gli anticorpi primari, le sezioni sono state

risciacquate in tampone fosfato salino per 15 minuti e incubate con anticorpo secondario a temperatura ambiente per un'ora e mezza. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati, rispettivamente: polyclonal anti-Rabbit per Ob, BDNF e TrKb (Peroxidase-labeled Antibody to Rabbit IgG, KPL), donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology, INC) per ObR. Dopo aver effettuato un ultimo risciacquo in tampone, la reazione è stata visualizzata tramite l'impiego del cromogeno DAB (3,3-diamminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma-Aldrich) in una soluzione allo 0,04% in TRIS-HCl 0,05 M con un pH di 7.5 e H₂O₂ allo 0.005%. La specificità delle immunoreazioni è stata testata rimpiazzando gli anticorpi primari con rabbit IgG aspecifiche o omettendo del tutto l'incubazione con anticorpo primario. In tali condizioni non è stato possibile osservare alcuna immunoreazione.

4 RISULTATI

4.1 qRT-PCR

L'applicazione del test del t di Student ha evidenziato l'assenza di differenze statisticamente significative nei livelli di leptina misurati tramite metodica PCR tra i due gruppi (CNTR ed OB, fig.10a). Al contrario, è stato possibile evidenziare una differenza statisticamente significativa con livelli più alti nel gruppo obeso per quanto riguarda il recettore (LepR) (fig.10b) con $P = 0.0002$, $R^2 = 0.7608$.

Analizzando tramite t di Student i livelli di BDNF ottenuti dalla PCR è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i il gruppo CNTR e il gruppo OB (fig.10c) con valori di $P = 0.0294$, $R^2 = 0.837$ e livelli di espressione più elevati nel gruppo di controllo. Confrontando i valori di TrkB nei due gruppi, invece, non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa (fig.10d).

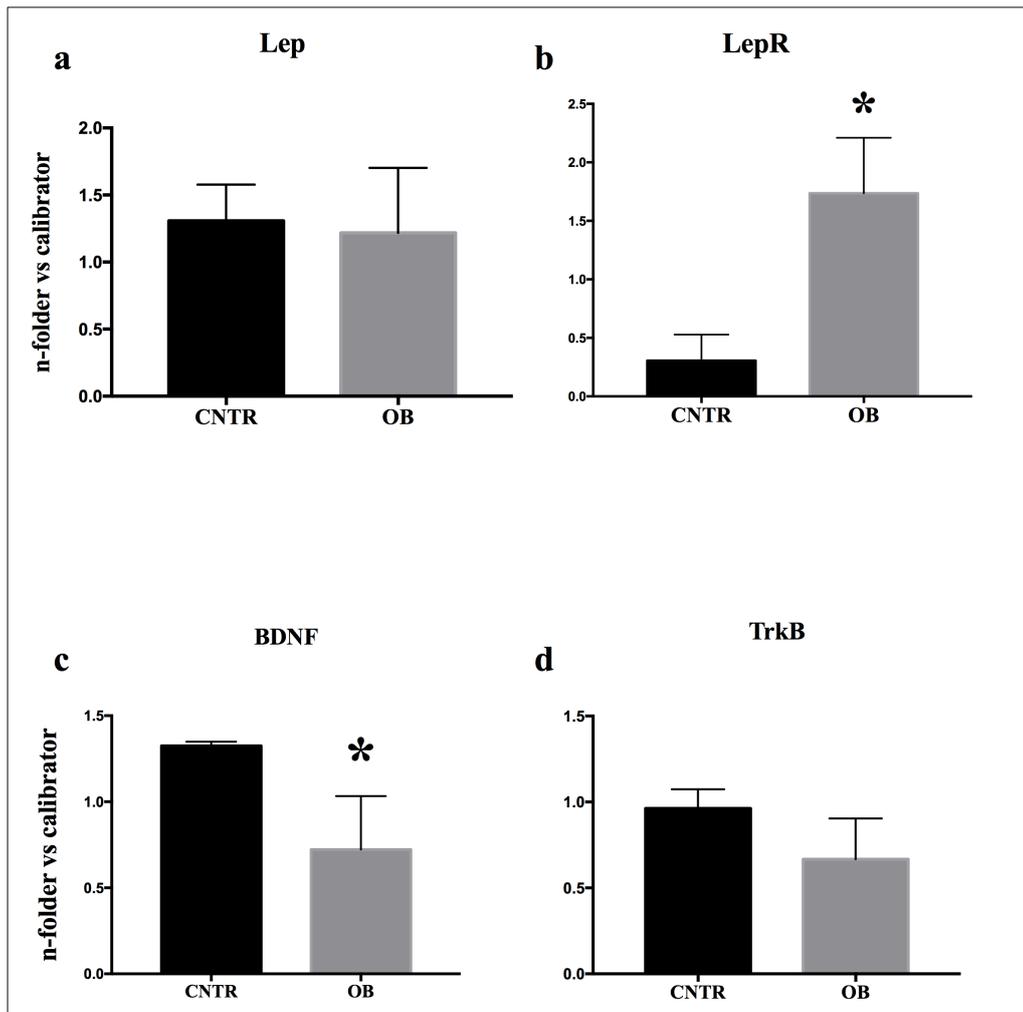


Figura 10. Espressione dei livelli di Leptina e di BDNF (a,c) e dei loro specifici recettori (b,d) nell'ovaio di cagne normopeso (CNTR) e obese (OB).

4.2 Immunoistochimica

L'indagine immunoistochimica è stata effettuata per localizzare le proteine indagate a livello ovarico.

Leptina (Lep)

La leptina nell'ovaio delle cagne normopeso (CNTR) è stata individuata a livello della cellula uovo in follicoli primordiali e primari (fig.11a, b).

La stessa localizzazione era presente nelle cagne obese (OB) (fig. 12a, b), mentre non è stata osservata immunoreazione per la proteina a livello delle cellule follicolari.

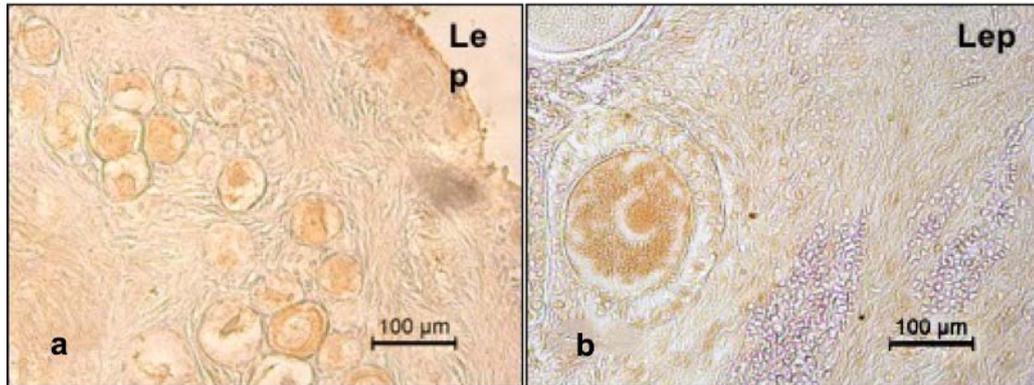


Figura 11. Localizzazione immunohistochimica della leptina nell'ovaio di cagne normopeso (controllo) a livello della cellula uovo in follicoli primordiali (a) e primari (b).

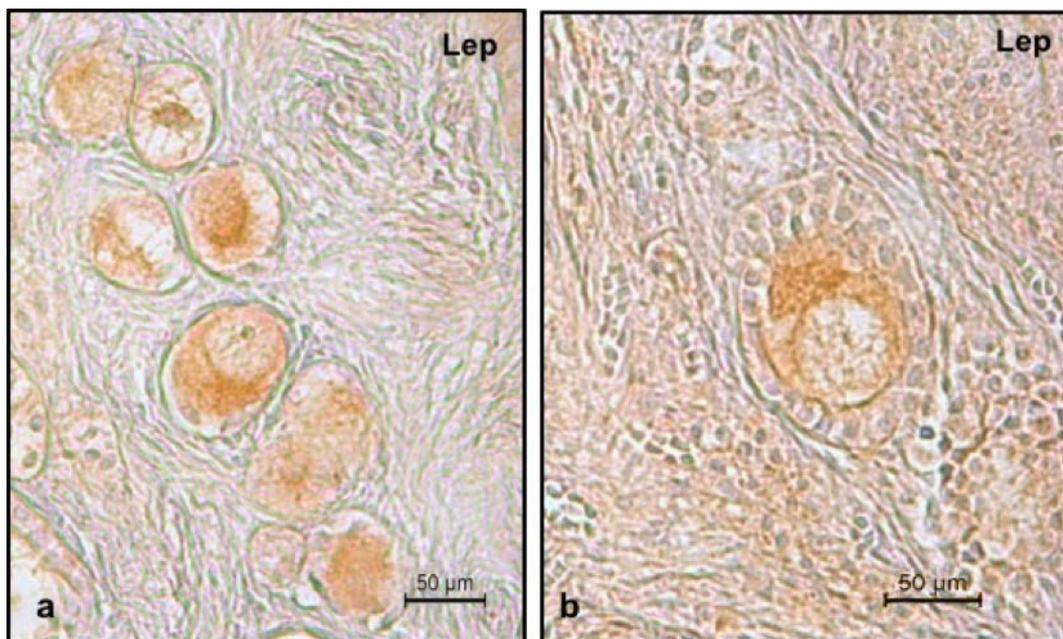


Figura 12. Localizzazione immunohistochimica della la leptina nell'ovaio di cagne obese a livello della cellula uovo in follicoli primordiali (a) e primari (b).

Leptina recettore (LepR)

Nessuna immunoreazione è stata osservata per il recettore per la leptina nei soggetti del gruppo CNTR (fig.13a). Al contrario nel gruppo OB era presente una marcata positività a livello delle cellule follicolari di follicoli primordiali e primari (fig.13b).

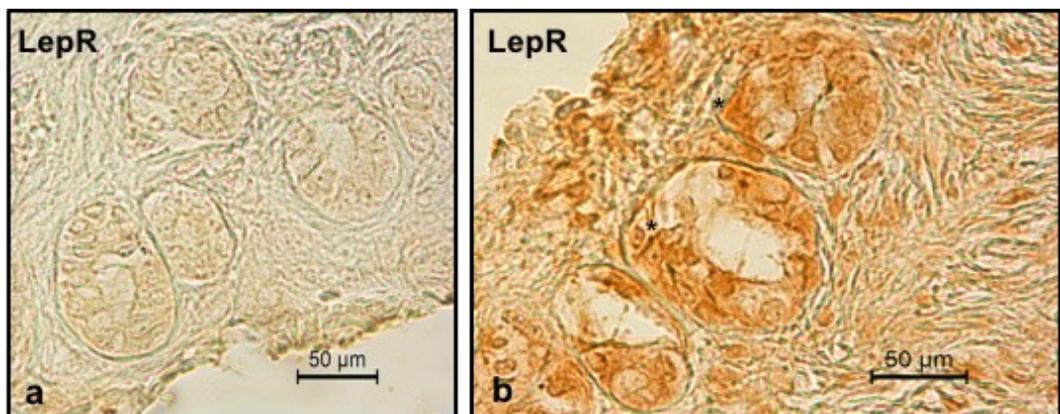


Figura 13. Assenza di Immunoreattività per il recettore della leptina nel gruppo controllo (a); immunoreattività per il recettore della leptina in cellule follicolari di follicoli primordiali e primari in cagne obese (b).

BDNF

L'indagine immunoistochimica ha permesso di evidenziare la presenza di BDNF nei soggetti del gruppo CNTR, in follicoli primari e in particolare a livello delle cellule follicolari (fig.14a) mentre nei soggetti del gruppo OB si rilevava una totale assenza di positività (fig.14b).

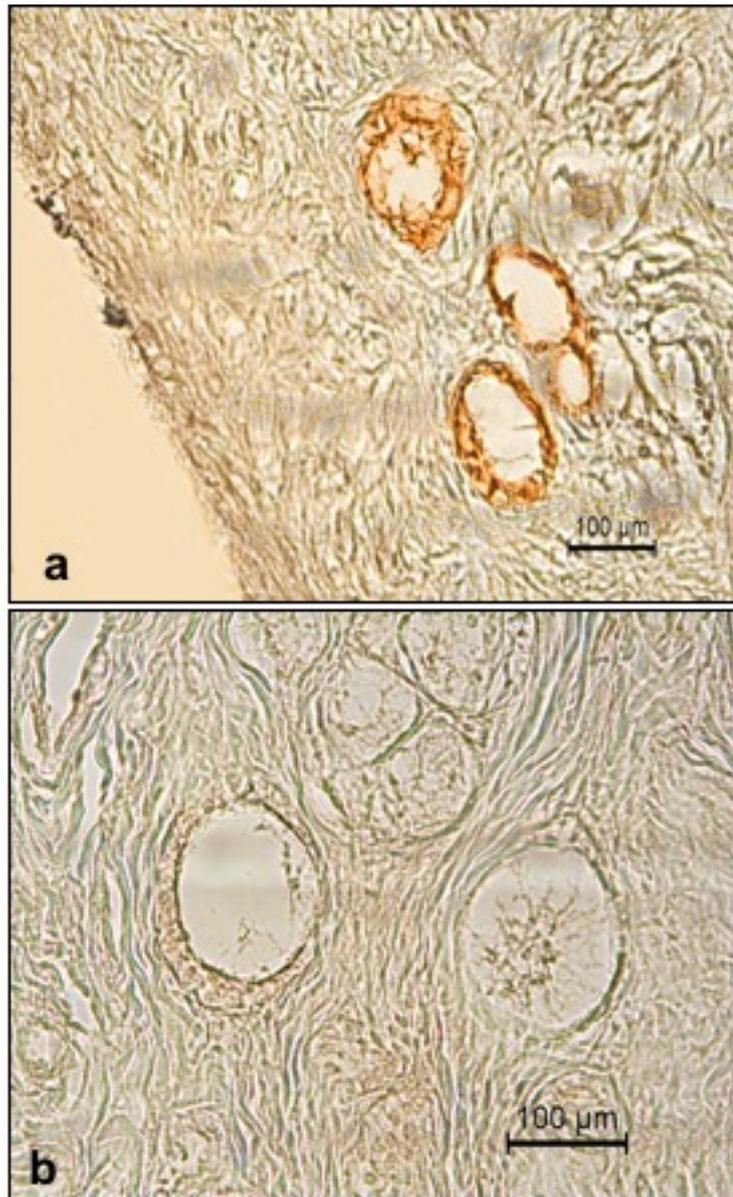


Figura 14. Localizzazione immunohistochimica del BDNF nell'ovaio di cagne normopeso (controllo) a livello dei follicoli primari (a); assenza di immunoreazione per il BDNF in cagne obese (b).

TrkB

Sia nel gruppo CNTR (fig.15a, b) che nel gruppo obesi (fig.16a), la colorazione immunohistochimica ha evidenziato la presenza del TrkB a livello di follicoli primordiali e primari. In particolare la positività

era presente a livello delle cellule follicolari in entrambi gli stadi. Inoltre, nel gruppo obesi è stata riscontrata positività a livello di profili nervosi (fig.16b).

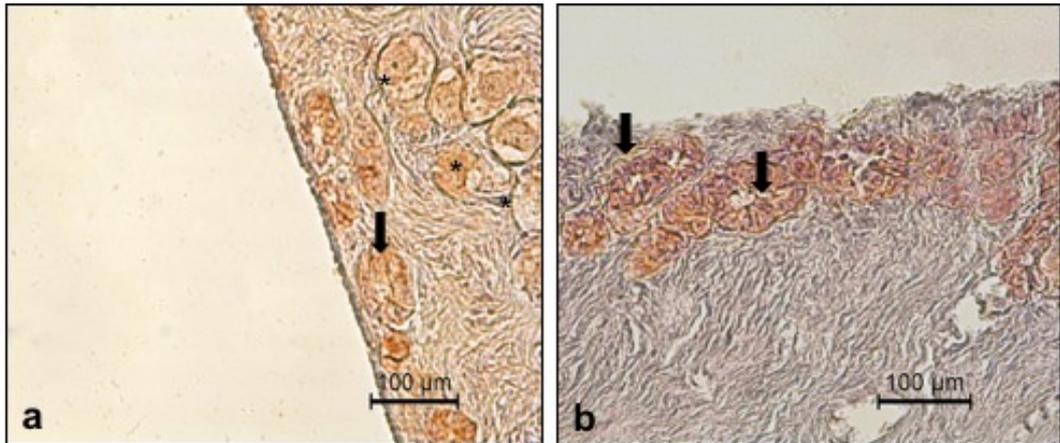


Figura 15. Localizzazione immunoistochimica del TrkB nell'ovaio di cagne normopeso a livello di follicoli primordiali (asterischi) (a) e dei follicoli primari (frece) (a,b).

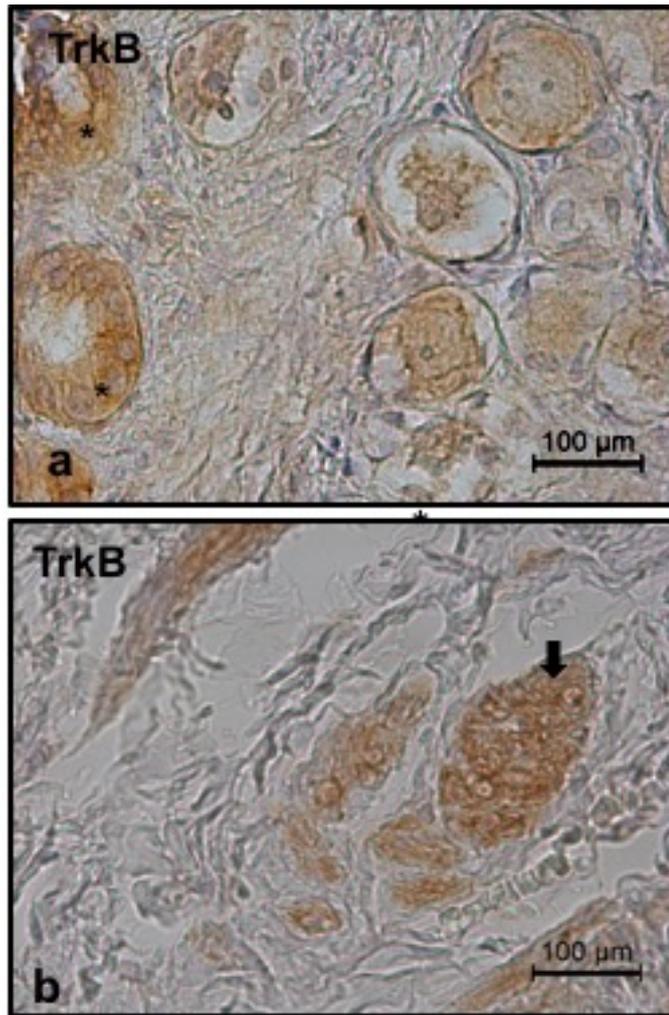


Figura 16. Localizzazione immunoistochimica del TrkB nell'ovaio di cagne obesa a livello di cellule follicolari di follicoli primordiali e primari (a) e in un plesso nervoso (b).

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata effettuata una indagine di tipo biomolecolare con qRT-PCR associata ad uno studio morfologico tramite immunoistochimica al fine di valutare l'espressione e la localizzazione della leptina e del suo recettore LepR, del BDNF e del suo recettore TrkB nelle ovaie di cagne normopeso e obese.

I risultati ottenuti arricchiscono le conoscenze in nostro possesso circa la correlazione tra le sostanze indagate e lo stato di nutrizione mostrando differenza di espressione tra i due gruppi sperimentali. Tuttavia, si tratta di risultati parziali che necessitano di ulteriori indagini e approfondimenti. Infatti, lo studio, come già precedentemente descritto, si è inserito nell'attività clinica di diversi ambulatori veterinari della Sicilia, pertanto, poichè gli interventi di ovaristerectomia vengono solitamente effettuate durante il periodo di diestro/anaestro le indagini immunoistochimiche e di biologia molecolare, hanno riguardato l'influenza delle proteine oggetto del nostro studio sui follicoli ovarici nei primi stadi del loro sviluppo caratteristici di tale periodo.

Per quanto riguarda la leptina, nel presente studio l'indagine immunoistochimica ne ha permesso l'individuazione a livello dei follicoli primari e secondari sia nel gruppo controllo che nel gruppo

OB. Tale dato potrebbe supportare l'ipotesi che, la leptina possa influenzare la fertilità. Lo studio effettuato conferma come, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, anche nella specie canina, le ovaie rappresentino una sede di produzione della leptina.

L'espressione immunoistochimica della leptina nei follicoli ai primi stadi di sviluppo è stata già rilevata in altre specie (Batista et al., 2013) e sostiene l'ipotesi che essa coadiuvi la maturazione follicolare. Tale dato è in accordo con recenti studi che individuano in tale proteina un elemento fondamentale nel trattamento terapeutico della amenorrea funzionale ipotalamica (*functional hypothalamic amenorrhoea*, FHA) (Kyriakidis et al., 2016). I risultati di biologia molecolare hanno supportato quelli di immunoistochimica, infatti, l'indagine di biologia molecolare ha mostrato livelli di leptina sovrapponibili in entrambi i gruppi. E' importante sottolineare come sia sempre vantaggioso unire uno studio di tipo morfologico, quale l'immunoistochimica, ai dati derivanti dalla biologia molecolare al fine di rendere i dati ottenuti il più completi possibile.

I risultati dell'immunoistochimica sul recettore LepR hanno dimostrato la sua presenza a livello dei follicoli primari nei soggetti obesi mentre non è stata individuata alcuna reazione nelle ovaie del

gruppo controllo. Tali risultati hanno avuto riscontro anche nei dati ottenuti tramite biologia molecolare.

La leptina svolge le sue funzioni nei vari distretti grazie alla presenza del suo specifico recettore. Precedenti studi effettuati sulla specie felina hanno individuato una maggiore espressione di tale recettore nel corso di specifici momenti della vita riproduttiva, in particolare nella gravidanza e nella pseudogravidanza (Albrizio et al., 2013) in cui, come è noto, dal punto di vista ormonale prevale la presenza di LH. Pertanto, il suo mancato riscontro nella fase di anaestro nel gruppo controllo lascerebbe ipotizzare che la regolazione della sua espressione possa dipendere dalla secrezione delle gonadotropine oppure, viceversa, che sia la stessa leptina tramite il suo recettore a regolare la secrezione di LH. È noto in letteratura, infatti, come nei ratti (Duggal et al., 2002) e nelle donne (Hardie et al., 1997) esista una correlazione positiva tra livelli di leptina e di progesterone nel corso della fase luteinica. Inoltre, recenti studi di biologia molecolare eseguiti nella specie canina, hanno evidenziato un aumento dell'espressione della leptina durante la prima metà della gravidanza e nel diestro (Balogh et al., 2012).

Alla luce di quanto sino ad ora evidenziato, la presenza del recettore nelle ovaie dei soggetti obesi potrebbe portare elementi a sostegno di

quantità hanno ipotizzato che alti livelli di leptina possano interferire sulla follicologenesi (Ghizzoni et al., 2001) supportando ulteriormente la nota correlazione esistente tra obesità e alterazioni della sfera riproduttiva come la sindrome dell'ovaio policistico (Li et al., 2013). In particolare, precedenti studi hanno evidenziato come la leptina causi alterazioni sia nella maturazione follicolare che nell'ovulazione e che possa contribuire all'insulino resistenza e all'iperandrogenismo presenti nella maggior parte delle pazienti affetti da sindrome dell'ovaio policistico (Escobar et al., 2007). In queste stesse pazienti, inoltre, è stato possibile rilevare una correlazione tra livelli di leptina e LH (Chen et al., 2013).

Il riscontro della presenza di BDNF a livello delle cellule follicolari dei follicoli primari nell'ovaio delle cagne normopeso è in accordo con quanto già osservato in letteratura in altre specie (Paredes et al., 2004). Tale risultato rappresenta un elemento a supporto dell'importanza svolta da tale neurotrofina nelle prime fasi della maturazione follicolare anche nella specie canina. Ricerche precedenti, infatti, hanno mostrato che nei mammiferi il BDNF agisce come agente di regolazione in maniera paracrina o autocrina a livello ovarico (Yu et al., 2012; Wang et al., 2011; Zhao et al.,

2011) contribuendo, insieme alle gonadotropine, al corretto funzionamento dell'organo.

Nell'ovaio di cagne obese, invece, la mancata espressione di BDNF risulta un ulteriore elemento a supporto del ruolo rilevante svolto da tale sostanza nel corso di disfunzioni riproduttive. Bassi livelli di tale neurotrofina a livello ovarico, infatti, ne suggeriscono un alterato funzionamento con scarsa produzione oocitaria (Hock et al., 2001). In particolare, una notevole diminuzione dei livelli di BDNF è stata riscontrata nel liquido follicolare di donne affette da endometriosi (Buyuk & Seifer, 2008; Giannini et al., 2010). Tale riscontro potrebbe essere dovuto alla minor sensibilità delle cellule della granulosa all'ormone LH (Cahill et al., 2003) che, fisiologicamente, parrebbe aumentare a tale livello la produzione di BDNF (Feng et al., 2003).

Inoltre, l'influenza negativa dell'obesità sull'attività secretoria delle cellule della granulosa, potrebbe essere dovuta allo stress ossidativo con aumento della produzione di radicali liberi che si verifica in tale condizione (Szczepanska et al., 2003).

La presenza di TrkB nei follicoli primordiali è in accordo con quanto già noto in letteratura per altre specie (Paredes et al., 2004). Esso, inoltre, risulta presente a livello ovarico già in epoca neonatale

(Dissen et al., 1995). Il suo riscontro in entrambi i gruppi, senza differenze significative, suggerisce una mancanza di correlazione tra condizioni di nutrizione, espressione del TrkB e sviluppo follicolare almeno per quanto riguarda i primissimi stadi di sviluppo. Si potrebbe però ipotizzare che si tratti di una forma ancora inattiva e, pertanto, alterazioni nella sua espressione sarebbero rilevabili solo in stadi di sviluppo successivi considerando anche come, fisiologicamente, esso si trasformi nella forma matura grazie all'azione delle gonadotropine solo al momento della pubertà (Dorfman et al., 2014).

In conclusione l'analisi dei dati ricavati durante la presente ricerca conferma l'espressione di leptina, BDNF e rispettivi recettori nell'ovaio anche nella specie canina. Inoltre, la differente espressione riscontrata nei due gruppi oggetto della ricerca (CNTR e OB) lascia ipotizzare che lo stato di nutrizione possa giocare un ruolo di fondamentale importanza, così come dimostrato in altre specie, nella espressione delle molecole indagate e di conseguenza nel ruolo biologico da esse svolto a livello ovarico.

BIBLIOGRAFIA

Ahima RS. (2005) Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab.* 16(7): 307-313.

Ahima RS, Osei SY. (2004) Leptin signaling. *Physiol Behav.* 81: 223–241.

Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. (1998) Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest.* 101(5): 1020-1027.

Al-Azraqi AA. (2007) Effect of fasting on luteal function, leptin and steroids concentration during oestrous cycle of the goat in natural photo-status. *An Repr Science* 98: 343–349.

Albrizio M, Roscino MT, Trisolini C, Binetti F, Rizzo A, Sciorsci RL. (2013) The expression of leptin receptor in the ovary of the queen: Leptin receptor expression in queen ovary. *Res Vet Scie* 95 (2): 629-631.

Allison MB, Myers MG Jr. (2014) 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol.* 223(1): T25-35.

Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkan D, Homburg R, Lessing JB, Nevo N, Gertler A, Amsterdam A. (2001) Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol.* 183(12): 179-191.

Anderson RA, Bayne RAL, Gardner J, De Sousa PA. (2010) Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of human oocyte maturation and early embryo development. *Fertil Steril.* 93: 1394–1406.

Anderson RA, Robinson LLL, Brooks J, Spears N. (2002) Neurotrophins and Their Receptors Are Expressed in the Human Fetal Ovary, *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2): 890–897.

Antczak M, Van Blerkom J. (1997) 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.* 3(12): 1067-1086.

Attele AS, Shi ZQ, Yuan CS. (2002) Leptin, gut, and food intake. *Biochem Pharmacol.* 63(9): 1579-1583.

Baldwin K, Bartges J, Buffington T, Freeman LM, Grabow M, Legred J, Ostwald D Jr. (2010) AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 46 (4): 285-296.

Balogh O, Kowalewski MP, Reichler IM. (2012) Leptin and leptin receptor gene expression in the canine corpus luteum during diestrus, pregnancy and after aglepristone-induced luteolysis. *Reprod Domest Anim.* 47 (6): 40-42.

Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 137(7): 3144-3147.

Batista AM, Silva DM, Rêgo MJ, Silva FL, Silva EC, Beltrão EI, Gomes Filho MA, Wischral A, Guerra MM. (2013) The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Anim Reprod Sci.* 141(3-4): 142-147.

Brannian JD, Hansen KA. (2002) Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. *Semin Reprod Med.* 20(2): 103-112.

Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.* 7: 857–866.

Bjørbaek C, Kahn BB. (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 59: 305-31.

Boyer BB, Ormseth OA, Buck L, Nicolson M, Pellemounter MA, Barnes BM. (1997) Leptin prevents posthibernation weight gain but does not reduce energy expenditure in arctic ground squirrels. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 118(3): 405-412.

Burkholder WJ. (2000) Use of body condition scores in clinical assessment of the provision of optimal nutrition. *J Am Vet Med Assoc.* 217: 650–654.

Buyuk E, Seifer DB. (2008) Follicular-fluid neurotrophin levels in women undergoing assisted reproductive technology for different etiologies of infertility. *Fertil Steril.* 90: 1611-1615.

Cahill DJ, Harlow CR, Wardle PG. (2003) Pre-ovulatory granulosa cells of infertile women with endometriosis are less sensitive to luteinizing hormone. *Am J Reprod Immunol.* 49: 66-69.

Int J Cell Biol. 2010; 2010: 928169.

Cammisotto PG, Bendayan M, Sané A, Dominguez M, Garofalo C, Levy E. (2010) 2 Receptor-Mediated Transcytosis of Leptin through Human Intestinal Cells In Vitro. *Int J Cell Biol.* 2010: 928169.

Cammisotto PG, Renaud C, Gingras D, Delvin E, Levy E, Bendayan M. (2005) Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. *J Histochem Cytochem.* 53(7): 851-860.

Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. (1996) Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*. 45(11): 1455-1462.

Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF. (1997) Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 82(12): 4270-4273.

Chehab FF, Lim ME, Lu R. (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12(3): 318-320.

Chehab FF, Qiu J, Ogus S. (2004) The use of animal models to dissect the biology of leptin. *Recent Prog Horm Res*. 59: 245-266.

Chen X, Jia X, Qiao J, Guan Y, Kang J. (2013) Adipokines in reproductive function: A link between obesity and polycystic ovary syndrome. *J Mol Endocrinol*. 21–37.

Childs AJ, Kinnell HL, Collins CS, Hogg K, Bayne RA, Green SJ, McNeilly AS, Anderson RA. (2010) BMP signaling in the human fetal ovary is developmentally regulated and promotes primordial germ cell apoptosis. *Stem Cells*. 28(8): 1368-1378.

Chua SC, Jr, Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL. (1997) Fine structure of the murine leptin receptor gene: Splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics*. 45: 264–270.

Cinti S, de Matteis R, Ceresi E, Picó C, Oliver J, Oliver P, Palou A, Obrador A, Maffei C. (2001) Leptin in the human stomach. *Gut*. 49(1): 155.

Cohen-Cory S1, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. (2010) Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol*. 70(5): 271-88.

Copeland DL, Duff RJ, Liu Q, Prokop J, Londraville RL. (2011) Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. *Front Physiol*. 2: 26.

Craig J1, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. (2004) Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. 145(11): 5355-5363.

Crujeiras AB1, Carreira MC1, Cabia B1, Andrade S1, Amil M1, Casanueva FF. (2015) Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci*. 140: 57-63.

Dall'Aglio C, Maranesi M, Pascucci L, Mercati F, Ceccarelli P. (2012)a Immunohistochemical distribution of leptin receptor in the major salivary glands of horses. *Res Vet Sci*. 93(3): 1116-1118.

Dall'Aglio C, Mercati F, Pascucci L, Ceccarelli P. (2013) Immunolocalization of leptin and its receptor in the pancreas of the horse. *Acta Histochem*. 115(7): 757-760.

Dall'Aglio C, Polisca A, Boiti C, Ceccarelli P. (2012)b Immunolocalization of leptin and its receptor in the placenta of cats. *Acta Histochem*. 114(7): 719-722.

De Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, Lee J, Raybould HE (2012). Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats. *PloS One* 7, e32967.

De Matteis R, Dashtipour K, Ognibene A, Cinti S. (1998) Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proc Nutr Soc.* 57(3): 441-448.

Dissen, G.A., Hill, D.F., Costa, M.E., Les Dees, C.W., Lara, H.E., Ojeda, S.R. (1996). A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* 13: 198–209.

Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. (1995) Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology.* 136(10): 4681-4692.

Dockray GJ. (2013) Enteroendocrine cell signalling via the vagus nerve. *Curr Opin Pharmacol.* 13(6): 954-958.

Dorfman MD, Garcia-Rudaz C, Alderman Z, Kerr B, Lomniczi A, Dissen GA, Castellano JM, Garcia-Galiano D, Gaytan F, Xu B, Tena-Sempere M, Ojeda SR. (2014) Loss of Ntrk2/Kiss1r signaling in oocytes causes premature ovarian failure. *Endocrinol.* 155: 3098–3111.

Duggal PS, Ryan NK, Van der Hoek KH, Ritter LJ, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. (2002) 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.* 123: 891–898.

Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 5(4): 511-526.

Escobar-Morreale HF, San Millan JL. (2007) Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 18: 266–272.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, MA MC, O'Rahilly S. (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341: 879–884.

Feng B, Chen S, Shelden RM, Seifer DB. (2003) Effect of gonadotropins on brain-derived neurotrophic factor secretion by human follicular cumulus cells. *Fertil Steril*. 80: 658-659.

Frühbeck G. (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 393(Pt 1): 7-20.

Gavrila A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS. (2003) Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(6): 2838-243.

Genzer Y, Dadon M, Burg C, Chapnik N, Froy O. (2016) Effect of dietary fat and the circadian clock on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Mol Cell Endocrinol*. 430: 49-55.

Gratacòs M, González JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. (2007) Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 61(7): 911-922.

Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, Yanovski JA, El Gharbawy A, Han JC, Tung YC, Hodges JR, Raymond FL, O'Rahilly S, Farooqi IS. (2006) Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes*. 55(12): 3366-3371.

Germanà A, Laurà R, Montalbano G, Guerrera MC, Amato V, Zichichi R, Campo S, Ciriaco E, Vega JA. (2010)a Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in the lateral line system of zebrafish during development. *Cell Mol Neurobiol*. 30(5): 787-793.

Germanà A, Sánchez-Ramos C, Guerrero MC, Calavia MG, Navarro M, Zichichi R, García-Suárez O, Pérez-Piñera P, Vega JA. (2010)b Expression and cell localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB during zebrafish retinal development. *J Anat.* 217(3): 214-222.

Ghizzoni L, Mastorakos G, Street ME, Mazzardo G, Vottero A, Vanelli M, Bernasconi S. (2001) Leptin, cortisol, and GH secretion interactions in short normal prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(8): 3729-3734.

Giannini A, Bucci F, Luisi S, Cela V, Pluchino N, Merlini S, Casarosa E, Russo M, Cubeddu A, Daino D, Artini PG, Genazzani AR. (2010) Brain-derived neurotrophic factor in plasma of women with endometriosis. *J Endometr.* 2(3): 106-107.

Glintborg D, Andersen M. (2010) An update on the pathogenesis, inflammation, and metabolism in hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 26(4): 281-296.

Gorissen M, Bernier NJ, Nabuurs SB, Flik G, Huising MO. (2009) Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *J Endocrinol.* 201(3): 329-339.

Guo X, Roberts MR, Becker SM, Podd B, Zhang Y, Chua SC Jr, Myers G Jr, Duggal P, Houpt ER, Petri WA Jr. (2011) Leptin Signaling in Intestinal Epithelium Mediates Resistance to Enteric Infection by *Entamoeba histolytica*. *Mucosal Immunol.* 4(3): 294–303.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269(5223): 543-546.

Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 6(5): 845-858.

Hakimi O, Cameron LC. (2017) Effect of Exercise on Ovulation: A Systematic Review. *Sports Med.* 47(8): 1555-1567.

Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. (1994) The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron*. 13(1): 187-201.

Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. (1997) Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinol*. 47: 101–106.

Harel S, Jin S, Fisch B, Feldberg D, Krissi H, Felz C, Freimann S, Tan SL, Ao A, Abir R. (2006) Tyrosine kinase B receptor and its activated neurotrophins in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod*. 12: 357–365.

Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*. 19(1): 13-26.

Herpertz S, Albers N, Wagner R, Pelz B, Köpp W, Mann K, Blum WF, Senf W, Hebebrand J. (2000) Longitudinal changes of circadian leptin, insulin and cortisol plasma levels and their correlation during refeeding in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol.* 142(4): 373-379.

Hock DL, Sharafi K, Dagostino L, Kemman E, Seifer DB. (2001) Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med.* 46: 7-10.

Hotta K, Nakamura M, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M, Ueno T, Hamaguchi K, Tanaka K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Nakao K, Sakata T, Matsuzawa Y, Kamatani N, Nakamura Y. (2009) Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population. *J Hum Genet.* 54(12): 727-731.

Huang EJ, Reichardt LF. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24: 677-6736.

Ishioka K, Hatai H, Komabayashi K, Soliman MM, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. (2005) Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and re-feeding. *Vet J.* 169(1): 85-90.

Ishioka K1, Hosoya K, Kitagawa H, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. (2007) Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res Vet Sci.* 82(1): 11-15.

Iwase M, Kimura K, Sasaki N, Komagome R, Ishioka K, Morimatsu M, Murakami T, Saito M. (2000) Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Res Vet Sci.* 68(2): 109-114.

Jensen T, Johnson AL (2001) Expression and function of brain-derived neurotrophin factor and its receptor, TrkB, in ovarian follicles from the domestic hen (*Gallus gallus domesticus*). *J Exp Biol* 204: 2087–2095.

Jeusette IC, Detilleux J, Shibata H, Saito M, Honjoh T, Delobel A, Istasse L, Diez M. (2005) Effects of chronic obesity and weight loss on plasma ghrelin and leptin concentrations in dogs. *Res Vet Sci.* 79(2): 169-175.

Kale-Gurbuz T, Akhan SE, Bastu E, Telci A, Iyibozkurt AC, Topuz S. (2013) Adiponectin, leptin and ghrelin levels in obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 26(1): 27-30.

Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem.* 69(1): 34-42.

Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Gelpke MDS, Hsueh AJW. (2005) Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *PNAS* 102: 9206.

Kendall NR, Gutierrez CG, Scaramuzzi RJ, Baird DT, Webb R, Campbell BK. (2004) Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction.* 128(6): 757-765.

Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J.* 19(6): 1290-300.

Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. (2001) Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biol Reprod.* 65(1): 66-71.

Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M. (1991) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 66(2): 395-403.

Kohn J, Aloyz RS, Toma JG, Haak-Frendscho M, Miller FD. (1999) Functionally antagonistic interactions between the *TrkA* and *p75* neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J Neurosci.* 19(13): 5393-5408.

Kyriakidis M, Caetano L, Anastasiadou N, Karasu T, Lashen H. (2016) Functional hypothalamic amenorrhoea: leptin treatment, dietary intervention and counselling as alternatives to traditional practice - systematic review. *J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 198:131-137.

Kronfeld-Schor N1, Richardson C, Silvia BA, Kunz TH, Widmaier EP. (2000) Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in little brown bats. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(4): R1277-281.

Laferrère B, Caixas A, Fried SK, Bashore C, Kim J, Pi-Sunyer FX. (2002) A pulse of insulin and dexamethasone stimulates serum leptin in fasting human subjects. *Eur J Endocrinol.* 146(6): 839–845.

Laflamme D. (1997) Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract.* 22(4): 10-15.

Lamballe F1, Klein R, Barbacid M. (1991) TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* 66(5): 967-979

Lapchak PA, Hefti F. (1992) BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *Neuroreport.* 3(5): 405-408.

Lecke SB, Morsch DM, Spritzer PM. (2013) Association between adipose tissue expression and serum levels of leptin and adiponectin in women with polycystic ovary syndrome. *Genet Mol Res.* 12: 4292–4296.

Lee E1, Jeong YI, Park SM, Lee JY, Kim JH, Park SW, Hossein MS, Jeong YW, Kim S, Hyun SH, Hwang WS. (2007) Beneficial effects of brain-derived neurotropic factor on in vitro maturation of porcine oocytes. *Reproduction.* 134(3): 405-14.

Lee SJ, Verma S, Simonds SE, Kirigiti MA, Kievit P, Lindsley SR, Loche A, Smith MS, Cowley MA, Grove KL. (2013) Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript co-expressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice. *J. Neurosci* 33: 15306–15317.

Lewandowski K, Randeva HS, O'Callaghan CJ, Horn R, Medley GF, Hillhouse EW, Brabant G, O'Hare P. (2001) Effects of insulin and glucocorticoids on the leptin system are mediated through free leptin. *Clin Endocrinol.* 54(4): 533-539.

Lewin GR, Barde YA. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 19:289-317.

Li L, Lee KJ, Choi BC, Baek KH. (2013) Relationship between leptin receptor and polycystic ovary syndrome. *Gene* 527: 71–74.

Linher-Melville K1, Li J. (2013) The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation. *Reproduction.* 145(2): R43-54.

Liu X, Zhu Z, Kalyani M, Janik JM, Shi H. (2014) Effects of energy status and diet on Bdnf expression in the ventromedial hypothalamus of male and female rats. *Physiol Behav.* 130: 99-107.

Löffler S, Aust G, Kohler U, Spaniel-Borowski K. (2001) Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod.* 7: 1143–1149.

Lum T, Huynh G, Heinrich G. (2001) Brain-derived neurotrophic factor and TrkB tyrosine kinase receptor gene expression in zebrafish embryo and larva. *Int J Dev Neurosci.* 19(6): 569-587.

Madeja ZE, Warzych E, Peippo J, Lechniak D, Switonski M. (2009) Gene expression and protein distribution of leptin and its receptor in bovine oocytes and preattachment embryos produced in vitro. *Animal*. 3(4): 568–578.

Markwell P. J., van Erk W., Parkin G. D., Sloth C. J., Shantz-Christienson T. (1990) Obesity in the dog. *JSAP* 31 (10): 533–537.

Martins Da Silva SJ, Gardner JO, Taylor JE, Springbett A, De Sousa PA, Anderson RA. (2005) Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. *Reproduction*. 129: 423–434.

Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, Masuzaki H, Miyawaki T, Azuma N, Natsui K, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nishi S, Thompson DB, Nakao K. (1997) Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia*. 40(10): 1204-1210.

Mazaki-Tovi M, Feuermann Y, Segev G, Klement E, Yas-Natan E, Farkas A, Kol A, Shamay A. (2010) Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hypothyroidism. *Vet J.* 183(1):109-114.

Mendonça HC, Montenegro RM Jr, Foss MC, Silva de Sá MF, Ferriani RA. (2004) Positive correlation of serum leptin with estradiol levels in patients with polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res.*37(5): 729-736.

Mercer AJ, Stuart RC, Attard CA, Otero-Corchon V, Nillni EA, Low MJ. (2014) Temporal changes in nutritional state affect hypothalamic POMC peptide levels independently of leptin in adult male mice. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab.* 306: E904–E915.

Mizuno TM, Bergen H, Funabashi T, Kleopoulos SP, Zhong YG, Bauman WA, Mobbs CV. (1996) Obese gene expression: reduction by fasting and stimulation by insulin and glucose in lean mice, and persistent elevation in acquired (diet-induced) and genetic (yellow agouti) obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16;93(8): 3434-3438.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443(7109): 289-295.

Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, Sobreviela T. (1999) Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*. 57(4): 451-484.

Muñoz-Gutiérrez M, Findlay PA, Adam CL, Wax G, Campbell BK, Kendall NR, Khalid M, Forsberg M, Scaramuzzi RJ. (2005) The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction*. 130(6): 869-881.

Nagappan G1, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B. (2009) Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(4): 1267-1272.

Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C.(2011) The lighter side of BDNF. May; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 300(5): R1053-1069.

Paredes A, Romero C, Dissen GA, DeChiara TM, Reichardt L, Cornea A, Ojeda SR, Xu B. (2004) TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. Dev Biol. 267(2): 430-49.

Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. (2010) A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. Neurosci Lett. 482(3): 235-239.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science. 269(5223): 540-543.

Radakovich LB, Truelove MP, Pannone SC, Olver CS, Santangelo KS. (2017) Clinically healthy overweight and obese dogs differ from lean controls in select CBC and serum biochemistry values. Vet Clin Pathol. 46: 221–226.

Ribasés M, Gratacòs M, Fernández-Aranda F, Bellodi L, Boni C, Anderluh M, Cavallini MC, Cellini E, Di Bella D, Erzegovesi S, Foulon C, Gabrovsek M, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Holliday J, Hu X, Karwautz A, Kipman A, Komel R, Nacmias B, Renschmidt H, Ricca V, Sorbi S, Wagner G, Treasure J, Collier DA, Estivill X. (2004) Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet.* 13(12): 1205-1212.

Ricci R, Bevilacqua F. (2012) The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *Vet J.*191(3): 292-298.

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. (2001) Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol.* 15(10): 1748-1757.

Russo F, De Girolamo P, Neglia S, Gargiulo A, Arcamone N, Gargiulo G, Varricchio E. (2011) Immunohistochemical and Immunochemical Characterization of the Distribution of Leptin-Like Proteins in the Gastroenteric Tract of Two Teleosts (*Dicentrarchus labrax* and *Carassius auratus* L.) With Different Feeding Habits. *Microsc Res Tech.* 74: 714–719.

Russo N, Russo M, Daino D, Bucci F, Pluchino N, Casarosa E, Artini PG, Cela V, Luisi M, Genazzani AR. (2012) Polycystic ovary syndrome: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma and follicular fluid levels. *Gynecol Endocrinol.* 28: 241–244.

Ryan NK, Van der Hoek KH, Robertson SA, Norman RJ. (2003) Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. *Endocrinology* 144: 5006–5013.

Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. (2002) Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod.* 66: 1548–1554.

Ruiz-Cortés ZT, Men T, Palin MF, Downey BR, Lacroix DA, Murphy BD. (2000) Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. *Mol Reprod Dev.* 56(4): 465-474.

Russo F, Gatta C, De Girolamo P, Cozzi B, Giurisato M, Lucini C, Varricchio E. (2012) Expression and Immunohistochemical Detection of Leptin-Like Peptide in the Gastrointestinal Tract of the South American Sea Lion (*Otaria flavescens*) and the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Anat Rec.* 295(9): 1482–1493.

Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fujii S. (2002) Role of leptin in pregnancy--a review. *Placenta.* 23 Suppl A: S80-86.

Sánchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Picó C, Palou A. (2005) Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology.* 146(6): 2575-2582.

Sandøe P, Palmer C, Corr S, Astrup A, Reinhard Bjørnvad C. (2014) Canine and feline obesity: A One Health perspective. *Vet Rec.* 175: 610-616.

Sarkar M, Schilffarth S, Schams D, Meyer HH, Berisha B. (2010) The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev.* 77 (2): 174–181.

Schams D, Berisha B, Kosmann M, Amselgruber WM. (2002) Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Dom An Endocrinol* 22: 51–72.

Schoeller DA, Cella LK, Sinha MK, Caro JF. (1997) Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest.* 100(7): 1882-1887.

Seifer DB, Feng B, Shelden RM, Chen S, Dreyfus CF (2002) Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein. *J Clin Endocr Metab.* 87: 655–659.

Seifer DB, Feng B, Shelden RM. (2006) Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin-Trk receptor family in adult human preovulatory ovarian follicles. *Am J Obstet Gynecol.* 194(4): 1129-1134.

Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Schneyer AL. (2003) Ovarian brain-derived neurotrophic factor is present in follicular fluid from normally cycling women. *Fertil Steril.* 79(2): 451-2.

Shpilman M, Niv-Spector L, Katz M, Varol C, Solomon G, Ayalon-Soffer M, Boder E, Halpern Z, Elinav E, Gertler A. (2011) Development and characterization of high affinity leptins and leptin antagonists. *J Biol Chem.* 286: 4429–4442.

Smolinska N, Kaminski T, Siawrys G, Przala J. (2010) Leptin gene and protein expression in the ovary during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs. *Reprod Domest Anim.* 45 (5): E174–E183.

Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ. (2000) Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut.* 47(2): 178-183.

Song YM, Lee WJ, Chen MD, Kao CH, Sheu WH. (2000) Methylprednisolone increases plasma leptin levels in Graves' hyperthyroidism patients with active Graves' ophthalmopathy. *Horm Metab Res.* 32(7): 277-282.

Spanos N, Tziomalos K, Macut D, Koiou E, Kandaraki E, A, Delkos D, Tsourdi E, Panidis D. (2012) Adipokines, Insulin Resistance and Hyperandrogenemia in Obese Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Cross-Sectional Correlations and the Effects of Weight Loss. *Obes Facts.* 5: 495-504.

Speakman JR. (2013) Evolutionary perspectives on the obesity epidemic: adaptive, maladaptive, and neutral viewpoints. *Annu Rev Nutr.* 33: 289-317.

Spears N, Molinek MD, Robinson LL, Fulton N, Cameron H, Shimoda K, Telfer EE, Anderson RA, Price DJ. (2003) The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development.* 130(22): 5481-5491.

Spicer LJ. (2001) Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 21(4): 251-270.

Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. (2000) Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine*. 12(1): 53-9.

Srivastava RK, Krishna A. (2007) Adiposity associated rise in leptin impairs ovarian activity during winter dormancy in Vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Reproduction*. 133(1): 165-176.

Streiter S, Fisch B, Sabbah B, Ao A, Abir R. (2016) The importance of neuronal growth factors in the ovary. *MHR: Basic science of reprod med*. 22(1): 3–17.

Svendsen P, Christiansen M, Hedley PL, Nilas L, Pedersen SB, Madsbad S. (2012) Adipose expression of adipocytokines in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 98: 235.

Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypezak J, Mikołajczyk M. (2003) Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*. 79: 1288-1293.

Tapia-Arancibia L1, Rage F, Givalois L, Arancibia S. (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol.* 25(2): 77-107.

Tartaglia LA. (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem.* 272(10): 6093-6096.

Tataranni PA, Monroe MB, Dueck CA, Traub SA, Nicolson M, Manore MM, Matt KS, Ravussin E. (1997) Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 21(9): 818-821.

Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Thorlacius S, Jonsdottir I, Jonsdottir T, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, Jonsson T, Jonsson F, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Lauritzen T, Aben KK, Verbeek AL, Roeleveld N, Kampman E, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadottir L, Rafnar T, Becker DM, Gulcher J, Kiemeny LA, Pedersen O, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 41(1): 18-24.

Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. (2007) Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J Neurosci.* 27(52): 14265-14274.

Vecino E, García-Crespo D, García M, Martínez-Millán L, Sharma SC, Carrascal E.(2002) Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. *Vision Res.* 42(2): 151-157.

Wade, GN, Schneider, JE, Li, HY. (1996) Control of fertility by metabolic cues. *Am. J. Physiol.* 270: E1–E19.

Wang J1, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. (1998) Anutrient sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature.* 393(6686): 684-688.

Wang R, Li YH, Xu Y, Li YB, Wu HL, Guo H, Zhang JZ, Zhang JJ, Pan XY, Li XJ. (2010) Curcumin produces neuroprotective effects via activating brain-derived neurotrophic factor/TrkB-dependent MAPK and PI-3K cascades in rodent cortical neurons. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34(1): 147-153.

Wang X, Sun Z, Zhen J, Yu Q (2011) Brain-derived neurotrophic factor from follicular fluid is positively associated with rate of mature oocytes collected and cleavage rate in intracytoplasmic sperm injection patients. *J Assist Reprod Genet.* 28: 1053–1058.

Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 6(7): 736-742.

Yamanaka M, Itakura Y, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, Taiji M. (2007) Comparison of the antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor and thiazolidinediones in obese diabetic mice. *Diabetes Obes Metab.* 9(6): 879-888.

Yamanaka, M., Tsuchida, A., Nakagawa, T., Nonomura, T., Ono-Kishino, M., Sugaru, E., Noguchi, H. and Taiji, M. (2007) Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 9: 59–64.

Yang G, Ge H, Boucher A, Yu X, Li C. (2004) Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor. *Mol Endocrinol.* 18: 1354–1362.

Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG, Cole CR, Ziegler TR. (2011) Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition.* 27(3): 269-275.

Yildizhan R1, Ilhan GA, Yildizhan B, Kolusari A, Adali E, Bugdayci G. (2011) Serum retinol-binding protein 4, leptin, and plasma asymmetric dimethylarginine levels in obese and nonobese young women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 96(1): 246-250.

Yan Q, Radeke M J, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Felnstein SC. (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 378: 135–157.

Yilmaz Z1, Ilcol YO, Golcu E. (2007) Serum leptin and ghrelin levels in response to methylprednisolone injection in healthy dogs. *Res Vet Sci.* 82(2): 187-194.

Yu Y, Yan J, Li M, Yan L, Zhao Y, Lian Y, Li R, Liu P, Qiao J. (2012) Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. *Hum Reprod.* 27: 2146–2159.

Zhang J, Scarpace PJ. (2009) The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo. *Br J Pharmacol.* 158: 475–482.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425–432.

Zhao P, Qiao J, Huang S, Zhang Y, Liu S, Yan LY, Hsueh AJ, Duan EK. (2011) Gonadotrophin-induced paracrine regulation of human oocyte maturation by BDNF and GDNF secreted by granulosa cells. *Hum Reprod* 26: 695–702.