



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2012; 26 (2): 73 - 77
http://www.fusabil.org

Emine KAÇAR
Haluk KELEŞTİMUR

Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
Elazığ, TÜRKİYE

Dişi Sıçanlarda Yağlı Diyetin ve Işık Uyarısının Pubertal Olgunlaşma ve Serum Leptin Seviyeleri Üzerine Etkileri

Amaç: Leptin büyük oranda yağ dokusundan salgılanır ve enerji dengesi ve gıda alımının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Leptin üreme fonksiyonları için gerekli enerjinin yeterli olduğu bilgisini beyne sağlayan böylece ergenliğin başlama zamanının belirlenmesinde önemli rol oynayan bir faktördür. Günün uzunluğu melatonin salınımını etkiler ve melatonin ile salınımı düzenlenen leptin sekresyonunda meydana gelen değişme leptinle düzenlenen fizyolojik fonksiyonları etkiler. Bu çalışmanın amacı yağdan zengin diyetle beslenen sıçanlarda gün uzunluğunda meydana gelen değişme ile serum düzeyi değişen leptinin pubertenin başlangıç zamanını nasıl etkilediğini tespit etmektir.

Gereç ve Yöntem: Wistar türü dişi sıçanlar %10 ve %45 yağ içeren pellet yemlerle beslendiler. Işığa maruziyet açısından 12 saat gündüz / 12 saat gece, 18 saat gündüz / 6 saat gece olmak üzere iki gruba ayrıldılar. Dişi sıçanlar 21. günde sütten kesildiler ve yağlı diyetle beslenmeye başlandılar. Yirmialtıncı günden itibaren günlük gıda alımı, vücut ağırlığı ve vajinal açıklık kontrolü yapılmaya başlandı. Vajinal smear yapılarak östrus dönemi tespit edilen sıçanlar dekapite edildi. Serum leptin ve östradiol düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: Yağdan çok zengin (% 45) diyetle beslenen sıçanlarda pubertenin erken başladığı gözlemlendi. Serum leptin düzeyleri % 10 ve % 45 ile beslenen gruplarda normal diyetle beslenen gruba göre belirgin olarak yüksek tespit edildi. Uzun süre ışığa maruz kalan (18 sa. gündüz/ 6 sa.gece) grupta da serum leptin düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi, ayrıca bu grupta her üç beslenme grubundaki sıçanlarda pubertenin geç başladığı gözlemlendi.

Sonuç: Işığa maruziyet süresi metabolik durumdan bağımsız olarak dişi sıçanlarda leptin salınımını ve pubertenin başlama zamanını etkiler.

Anahtar Kelimeler: Puberte, yağlı diyet, leptin, ışık uyararı

Effects of Fat Diet and Light Stimulus on Pubertal Maturation and Serum Leptin Levels in Female Rats

Objective: Leptin is predominantly secreted by adipocytes and plays a central role in the regulation of energy homeostasis and food intake. It is proposed that leptin provides information to the brain that there are enough energy stores for reproductive functions, thus becomes an important factor for determination of the start of puberty. Day length (DL) affects leptin secretion by modulating melatonin secretion and this secretion subsequently affects leptin-regulated physiological functions. The aim of this study was to investigate the effect of long DL induced serum leptin level changes on onset of puberty in female rats fed by high-fat.

Material and Methods: Wistar type female rats were fed by pellets containing 45%, 10% or 2.4% (control) fat. The groups were divided into two groups according to exposing either to 12-h light/dark or 18-h light/6-h dark cycles. Female rats were stopped milk feeding at day 21 and body weight, daily food intake and vaginal opening were controlled daily after day 26. The animals were decapitated when the estrus period was detected by vaginal smear. Serum leptin and estradiol levels were determined by ELISA method.

Results: Puberty onset was earlier in rats fed by very high fat diet (45%). Serum leptin levels were found to be significantly higher ($P<0.05$) in the groups fed by diets with 45% and 10% fat compared to the rats fed by diet with control. Serum leptin levels also increased significantly in rats exposed to long term light (18 h day light/ 6 h night), whereas puberty onset was delayed in all three groups.

Conclusion: Time of exposure to light independent from the metabolic state affects leptin release and onset of puberty in female rats.

Key Words: Puberty, fat diet, leptin, light stimulus.

Giriş

Pubertenin başlamasında meydana gelen en önemli nöroendokrin değişiklik, hipotalamusta bulunan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgılayan nöronların aktivitesindeki artıştır. GnRH nöronları neonatal dönemde aktifken, çocukluk çağı boyunca sessizliklerini korumakta ve puberteye yakın tekrar aktifleşmektedirler.

Geliş Tarihi :29.02.2012
Kabul Tarihi :14.09.2012

Yazışma Adresi Correspondence

Emine KAÇAR
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

dreminekacar@hotmail.com

Ciddi bir sağlık problemi olan obezite gelişiminde genetik, çevresel ve kültürel faktörler önemli role sahiptir (1). Gebelik döneminde, yüksek doğum ağırlığı ile yağ doku miktarı arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır (2). Çocukluk döneminde özellikle 5 yaşından sonraki periyotta, vücut yağ doku düzeyinde belirgin artış ortaya çıkmaktadır (adipozite reboundu). Erken bir adipozite reboundu daha sonra oluşacak yağ doku artışının bir habercisidir (3, 4). Obezite gelişimi için en son risk periyodu ergenlik dönemidir (5).

1994 yılında bulunan leptin hormonuyla ilgili araştırmalar ilerledikçe, pubertenin başlaması için yeterli yağ dokusunun gerekli olduğu gerçeği ortaya çıkmıştır. Normal fizyolojik süreçten önce yağ dokusunda oluşan artış, leptin salgılanmasını tetiklemekte ve pubertenin normal zamanından önce başlamasına neden olmaktadır. Aşırı kilolu kızların zayıflara göre daha erken puberteye girmeleri (6) vücut yağlanmasının, menstruasyonun başlamasına yol açan nöroendokrin olayları başlatabileceğini düşündürmüştür (7). Çok düşük dozda leptin uygulaması kemirgenlerde hipotalamus ve hipofiz düzeyinde gonadotropin salgılanmasını uyarılmaktadır (8). Obezite (ob) gen ürünü olan leptin, önemli ölçüde beyaz yağ dokusundan salgılanır ve beyine vücudun enerji kaynaklarına ilişkin sinyal gönderir (9). Besin alımını azaltarak ve metabolizmayı hızlandırarak vücut yağ dokusu miktarını ve ağırlığını kontrol eder (10, 11). İnsanda, serum leptin düzeyi ile vücut yağ oranı arasında pozitif bir korelasyon vardır (12,13). Leptin enjekte edilen dişi farelerde puberte belirtilerinin daha erken başlaması, leptinin üreme işlevi için ihtiyaç duyulan enerji kaynaklarının yeterli olduğu bilgisini beyine ileten bir sinyal olduğunu göstermektedir (14). Yapılan çalışmalar leptinin pubertenin tetiklenmesinden ziyade, pubertenin oluşması için gerekli metabolik bir sinyal olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır (15).

Puberte üzerinde etkili olan bir diğer hormon melatoninin (MT) sentez ve saliverilmesi sirkadiyen olarak özellikle gece daha fazla miktarlarda gerçekleşir. Işık ve karanlık, pineal bezden melatonin salgılanmasının düzenlenmesinde başlıca öneme sahiptir. Genel olarak ışık melatonin yapımını azaltır, karanlık ise artırır. Melatonin sirkadiyen bir ritimde ve karanlıkta salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer taraflarına zaman sinyali gönderir. Böylece günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (16). Yapılan çalışmalar melatoninin GnRH sekresyonunu baskıladığını ve puberteyi geciktirdiğini göstermektedir (17).

Bu çalışma; fonksiyonel pinealektomi yapılan hayvanlarda yağdan zengin diyetle beslenmenin ve farklı sürelerde ışığa maruz kalmanın puberte üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla gerçekleştirildi.

Gereç ve Yöntem

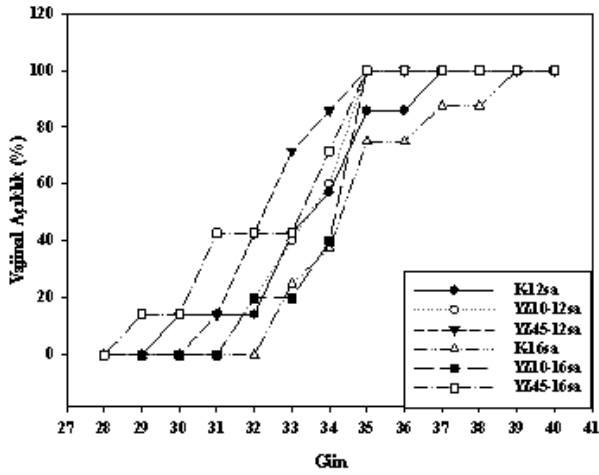
Bu çalışmada Wistar türü dişi sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar yağdan zengin (YZ) diyetle beslenerek fonksiyonel leptinemi ve ışık uyarısı etkisi artırılarak fonksiyonel pinealektomi gerçekleştirilmiştir. Deney süresince hayvanlar sabit sıcaklıkta (21 °C) tutuldular. Hayvanlara ışık uyarısı iki farklı protokolle uygulandı. Birinci protokol 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık ritmi, fonksiyonel pinealektomi olarak kabul edilen ikinci protokol ise, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık ritmi şeklinde uygulandı. Kontrol grubu (K) hayvanlar, standart sıçan yemi ile beslendi. Diğer iki gruptaki hayvanlar ise %10 ve %45 kcal içeren YZ özel pellet yemler (Research Diets, Inc., USA) ile beslendi. Her üç grup hayvanın yarısı 12 saat aydınlık/12saat karanlık (K-12sa, YZ10-12sa ve YZ45-12sa) diğer yarısı ise 16 saat aydınlık/8 saat karanlık (YZ-16sa, YZ10-16sa ve YZ45-16sa) ortamda tutuldular. Tüm hayvanlar 21. günde sütten kesildiler ve ayrı kafeslere konuldular. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Yirmi beşinci günden itibaren, günlük vücut ağırlığı ve yem tüketimi ölçümleri yapıldı. Pubertenin başlama zamanının belirlenmesi için günlük olarak vajinal açıklık (VA) kontrolü yapıldı ve VA gözlenen hayvanlarda her gün vajinal smear incelenerek östrus safhaları kaydedildi. Hayvanlardan elde edilen serum örnekleri hormon analizleri gerçekleştirilene kadar -20 °C de muhafaza edildiler. Dekapitasyonu takiben tüm hayvanlara ait ovariyumlar diseksiyonla çıkarılarak ağırlıkları belirlendi. Serum leptin (Linco Research) ve östradiol düzeyleri ELISA (The BioSource E2-EASIA) kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

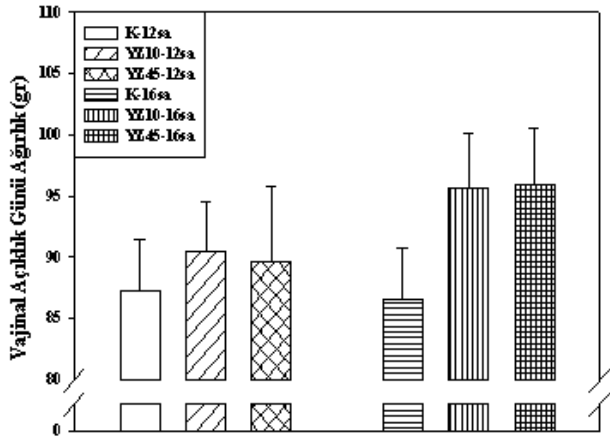
Bütün değerler; ortalama, standard hata (AO±SH) olarak belirlendi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 12.0 ve Sigma Plot 8.0 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirme, tek yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Tek yönlü varyans analizinin Post-Hoc hesaplaması için ise *Tukey* testi kullanıldı.

Bulgular

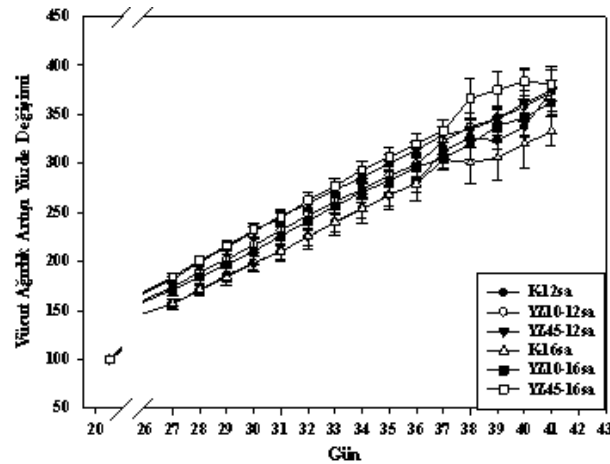
Gruplara ait vajinal açıklık (VA) ortalama gün ve kümülatif değerleri sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2 de gösterilmiştir. VA yağdan en zengin (%45 kcal %yağ) diyetle beslenen gruplarda (YZ45-12sa, n=7 ve YZ45-16sa, n=7), gerek kontrol (K-12sa, n=7 ve K16sa, n=7) ve gerekse %10kcal %yağ diyetle beslenen gruplara göre (K10-12sa, n=7 ve K10-16sa, n=7) bir gün önce başladı. VA günü grupların ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi (Şekil 3). Ancak, yağdan zengin diyetle beslenen YZ45-12sa (89.6±6.2 gr) ve YZ45-16sa (95.9±4.6 gr) gruplar, gerek YZ10-12sa (90.48±4.04 gr) ve YZ10-16sa (95.6±4.5gr), gerekse kontrol gruplardan (K-12sa: 87.2±4.21 gr ve K-16sa: 86.5±4.3 gr) daha yüksek vücut ağırlığında puberteye eriştiler (Şekil 2). Vücut ağırlık artışındaki yüzde değişim (Şekil 4) ve yem tüketimi (Şekil 5) yönünden gruplar arasında önemli farklılık gözlenmedi.



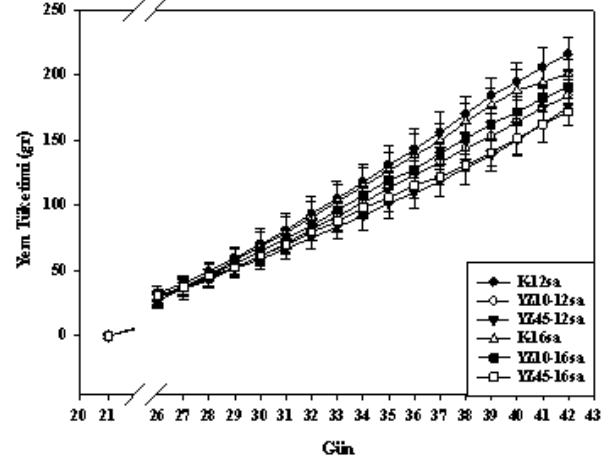
Şekil 1. Yağdan zengin beslenmede kümülatif vajinal açıklık günleri.



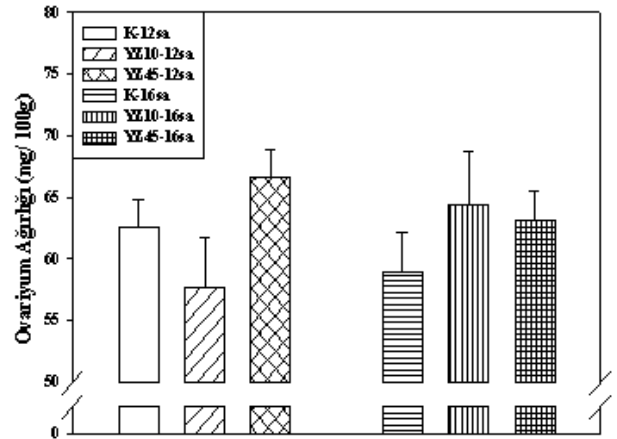
Şekil 2. Yağdan zengin beslenmede vajinal açıklık günü vücut ağırlığı.



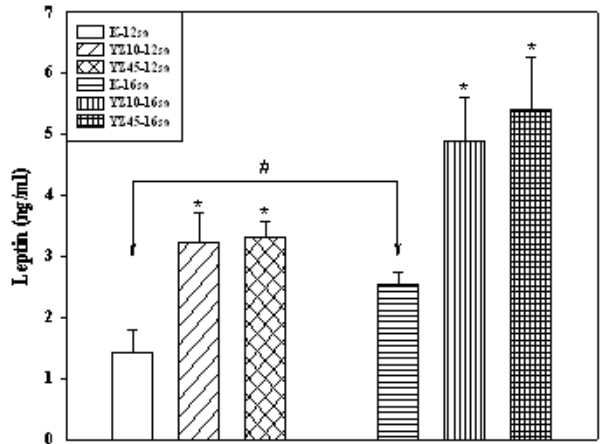
Şekil 3. Yağdan zengin beslenmede vücut ağırlığındaki % değişim.



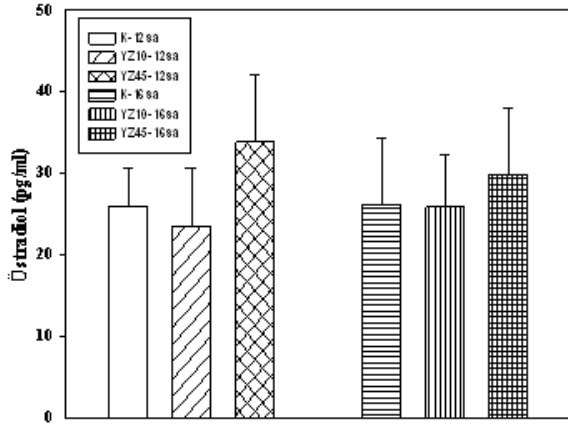
Şekil 4. Yağdan zengin beslenmede kümülatif yem tüketimi.



Şekil 5. Yağdan zengin beslenmede ovariyum ağırlıkları.



Şekil 6. Yağdan zengin beslenmede serum leptin düzeyleri



Şekil 7. Yağdan zengin beslenmede serum östradiol düzeyleri.

Serum leptin düzeyleri 12 saat ışık/12 saat karanlık ortamda tutulan %10 (3.23 ± 0.47 ng/ml, n=7) ve %45 (3.32 ± 0.25 ng/ml, n=7) YZ diyetle beslenen gruplarda normal diyetle beslenen gruba (1.44 ± 0.36 ng/ml, n=7) göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$, Şekil 6). Benzer şekilde, 16 saat ışık/8 saat karanlıkta muhafaza edilen %10 (4.89 ± 0.70 ng/ml, n=7) ve %45 (5.40 ± 0.85 ng/ml, n=7) yağdan zengin diyetle beslenen gruplarda normal diyetle beslenen gruba (2.55 ± 0.18 ng/ml, n=7) göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$, Şekil 7). Uzun süreli ışığa maruz kalan kontrol grubunda serum leptin düzeyi normal ışık ritimindeki gruba göre daha yüksek oldu ($p < 0.05$, Şekil 7). YZ diyetle beslenen gruplarda ışık uyarısının etkisiyle serum leptin düzeyinde artış gözlenmesine karşın, istatistiksel olarak bu artış anlamlı değildi.

Serum östradiol düzeyleri %45 lik yağdan zengin diyetle beslenen gerek 12 saat ışık/12 saat karanlık (33.84 ± 8.21 pg/ml, n=7) ve gerekse 16 saat ışık/8 saat karanlık (29.88 ± 8.08 pg/ml, n=7) ritimlerine maruz kalan gruplarda, %10kal%yağ (23.56 ± 7.07 pg/ml, n=6 ve 25.87 ± 6.30 pg/ml, n=7) ve ve normal diyetle beslenen gruplara (25.90 ± 7.43 pg/ml, n=7 ve 26.19 ± 8.21 pg/ml, n=7) göre daha yüksek olmasına rağmen, farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tartışma

Bu çalışma kapsamında, yağlı diyetle beslenmek suretiyle leptin salgılanmasında doğal artış meydana getirilen dişi sıçanlarda pubertal gelişme izlenmiştir. Leptin, pubertenin başlaması için önemli bir hormonal sinyaldir (18). Beyine, üreme faaliyetlerinin başlaması için vücudun yeterli enerji kaynağına sahip olduğuna ilişkin bilgiler nakleder. Üreme faaliyetleri, dişilerde daha fazla enerji harcanmasını gerektirdiğinden, leptin sinyali dişilerde pubertenin başlamasında daha önemli bir role sahiptir (19). Menarş ya da östrus siklusunun başlaması esnasında kanda leptin seviyesinde artış gözlenmektedir.

Genetik mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan leptin ya da leptin reseptörlerinin yokluğunda pubertenin başlamasını engellenmektedir.

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda leptinin intraserebroventriküler yolla doğrudan beyine verilmesinin pubertenin erken başlamasına yol açtığı, periferik leptin enfüzyonunun ise sadece yetersiz beslenmenin sebep olduğu pubertedeki gecikmeyi önlediği ortaya konulmuştur (20). Fareler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda ise, leptinin normal diyetle beslenen hayvanlarda da pubertenin erken başlamasına yol açtığı bildirilmiştir (21). Bu sonuçların ışığı altında, leptinin sadece pubertenin başlamasını kolaylaştıran metabolik bir sinyal olduğu görüşünün yanı sıra, puberteyi doğrudan başlatan bir etkiye sahip olabileceği de ileri sürülmektedir. Bunun yanında leptinin uterus ve over ağırlıkları üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir (15).

Yetişkin erkek sıçanlarda yapılan çalışmalarda pinealektomi sonucu leptin salgılanmasında artış meydana gelmiştir (22). Böylece, pineal bez veya melatonin-leptin ilişkisinin erkek ve dişi sıçanlarda farklılık gösterdiği söylenebilir.

Uzun süreli ışık uyarısı sadece kontrol grubunda serum leptin düzeyini önemli derecede artırdı. Buna karşılık, yağdan zengin beslenen gruplarda uzun süreli ışık uyarısının etkisiyle artış meydana gelmesine rağmen, istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Buna göre, uzun süreli ışığa maruz kalınmasının genel olarak leptin salgılanmasını artırdığını söylemek mümkün olabilir. Leptin salgılanmasındaki bu artış, ışığın etkisiyle melatonin azalmasından kaynaklanabilir. Pinealektomi uygulanan sıçanlarda leptin sentez ve salgılanmasında artış gözlenmesi (22, 23) ışık uyarısı ile oluşturulan fonksiyonel pinealektominin leptin salgılanması üzerinde benzeri etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Serum leptin seviyesi ve vücuttaki yağ dokusu arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu bildirilmektedir (24). Çalışmamızda elde edilen bu sonuç, serum leptin düzeyi ve yağ dokusu artışı arasındaki ilişkiyi doğrular niteliktedir. Vücut ağırlığı ve dolayısıyla vücut yağ dokusundaki artış ile pubertenin başlaması arasındaki ilişki gerek insan ve gerekse hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (25-29). İnsanda menarşın total yağ dokusundan ziyade, yağ dokusunun vücudun belirli bölgelerde toplanmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (30). Dişi sıçanlar üzerinde yürütülen bir çalışmada, yağdan zengin (%24.6) rasyonla beslenen hayvanlarda vajinal açıklığın 32.günde, %5 yağ içeren yemle beslenenlerde ise 34. günde meydana geldiği belirtilmiştir (31).

Bu çalışmanın sonuçları ve diğer araştırmacıların bulguları, besinlerde yağ oranının artmasıyla pubertenin daha erken başladığını göstermektedir. Ancak, ışık uyarısının puberte üzerindeki gerçek etkisinin anlaşılması için, daha uzun süren ışık periyotlarının uygulanması yararlı olacaktır.

Kaynaklar

1. Troiano F, Flegal K. Overweight children and adolescents: Description, epidemiology, and demographics. *Pediatrics* 1998; 101: 497–504.
2. Seidman DS, Laor A, Gale R, Stevenson DK, Danon YL. A longitudinal study of birth weight and being overweight in late adolescence. *Am J Dis Child* 1991; 145: 782–785.
3. Whitaker RC, Pepe MS, Wright JA, Seidel KD, Dietz WH. Early adiposity rebound and the risk of adult obesity. *Pediatrics* 1998; 101: E5.
4. Williams S, Davie G, Lam F. Predicting BMI in young adults from childhood data using two approaches to modeling adiposity rebound. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 348–354.
5. Dietz WH. Health consequences of obesity in youth: childhood predictors of adult obesity. *Pediatrics* 1998; 101: 518–525.
6. Garn SM, Haskell JA. Fat and growth during childhood. *Science* 1959; 130: 1711–1712.
7. Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance and onset. *Science* 1974; 185: 949–951.
8. Avelino-Cruz JE, Flores A, Cebada J, et al. Leptin increases L-type Ca^{2+} channel expression and GnRH-stimulated LH release in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 298: 57-65.
9. Elmquist JK. Anatomic basis of leptin action in the hypothalamus. *Front Horm Res* 2000; 26: 21–41.
10. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425–432.
11. Halaas JL, Gajiwala KS., Magherita M., et al. Weightreducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1996; 269: 543–546.
12. Falorni A, Bini V, Molinari D., et al. Leptin serum levels in normal weight and obese children and adolescents: relationship with age, sex, pubertal development, body mass index and insulin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 881-890.
13. Hassink SG, Sheslow DV, deLancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*, 1996; 98: 201–3.
14. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 391–395.
15. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, et al. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997; 138: 855–858.
16. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniv Sağlık Bil Dergisi* 1996; 10: 141-147.
17. Roy D, Belsham DD. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7Gn-RH neurons. Signal transduction mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 251–258.
18. Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, et al. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol* 1998; 10: 627-33.
19. Kiess W, Müller G, Galler A, et al. Body fat mass, leptin and puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13: 717-722.
20. Zeinoaldini S, Swarts JJ, Van de Heijning BJ. Chronic leptin infusion advances, and immunoneutralization of leptin postpones puberty onset in normally fed and feed restricted female rats. *Peptides* 2006; 27: 1652-1658.
21. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 9: 391–395.
22. Canpolat S, Sandal S, Yilmaz B, et al. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol* 2001; 428: 145-148.
23. Kus I, Sarsilmaz M, Colakoglu N, et al. Pinealectomy increases and exogenous melatonin decreases leptin production in rat anterior pituitary cells: an immunohistochemical study. *Physiol Res* 2004; 53: 403-408.
24. Roemmich JN, Rogol AD. Hormonal Changes During Puberty and Their Relationship to Fat Distribution. *American Journal of Human Biology* 1999; 11: 209–224.
25. Kaplowitz PB. Link Between Body Fat and the Timing of Puberty. *Pediatrics* 2008; 121: 208-217.
26. Frisch RE, Revelle R. Height and weight at menarche and a hypothesis of menarche. *Arch Dis Child* 1971; 46: 695–701.
27. Frisch RE, Revelle R, Cook S. Components of weight at menarche and the initiation of the adolescent growth spurt in girls: estimation total water, lean body weight and fat. *Hum Biol*. 1973; 45: 469–483.
28. Frisch RE, Wyshak G, Vincent L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *N Engl J Med* 1980; 303: 17–19.
29. Frisch RE. Body fat, menarche, fitness and fertility. *Hum Reprod* 1987; 6: 521–533.
30. Lassek WD, Gaulin SJ. Brief communication: menarche is related to fat distribution. *Am J Phys Anthropol* 2007; 133: 1147-1151
31. Frisch RE, Hegsted DM, Yoshinaga K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 4172-4176.