

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
*INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS*  
*DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA*  
*Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia*

**SENSIBILIDADE DIFERENCIADA DOS NÚCLEOS ANTEROVENTRAL  
PERIVENTRICULAR E ARQUEADO AO ESTRADIOL COMO PARTE DOS  
MECANISMOS DE RETROALIMENTAÇÃO POSITIVA E NEGATIVA  
SOBRE O EIXO GONADAL**

PATRÍCIA COSTA HENRIQUES

Belo Horizonte

Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
*INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS*  
*DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA*  
*Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia*

**SENSIBILIDADE DIFERENCIADA DOS NÚCLEOS ANTEROVENTRAL  
PERIVENTRICULAR E ARQUEADO AO ESTRADIOL COMO PARTE DOS  
MECANISMOS DE RETROALIMENTAÇÃO POSITIVA E NEGATIVA  
SOBRE O EIXO GONADAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Mestranda: Patrícia Costa Henriques

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Belo Horizonte

Dezembro - 2017

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
por me darem todo o amor do mundo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional.

Ao Matheus, pelo companheirismo e por me proporcionar as melhores risadas.

Ao Raphael, por ser um orientador sempre presente, paciente e disposto a ajudar.

Aos membros da banca examinadora, professora Maristela de Oliveira Poletini e professor Bruno Rezende de Souza, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

À Nayara, Roberta e Juneo, por me ensinarem todas as técnicas e, principalmente, pela amizade!

À Dani e à Kaoma, por me proporcionarem momentos de diversão nesta reta final do meu mestrado.

Ao Lucas, pela amizade e pela paciência de instalar várias vezes o EndNote e o Prisma no meu computador!

À Laísa, Ana, Helton, Quézia, Paulo, Gleisy, Fred, Paola, Nayara, Thaís, Flavinha e por todas as pessoas que passaram pelo Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, tornando o meu dia-a-dia mais divertido e agradável.

À Simone, por estar sempre disposta a ajudar.

À Cyntia e ao Rodner, por se mostrarem sempre muito prestativos e por resolverem meus problemas com muita presteza.

Ao professor Jônatas Abrahão, do departamento de microbiologia, por me abrir as portas para o meio acadêmico.

Aos animais, pelo sacrifício.

Aos bioteristas, por serem sempre tão cuidadosos e prestativos.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo financiamento deste trabalho.

## RESUMO

O pico na secreção de hormônio luteinizante (LH) é um evento chave para a ovulação e fertilidade em fêmeas. A liberação do LH está sob o controle do estradiol ( $E_2$ ) através de mecanismos de retroalimentação negativa e positiva que parecem envolver, respectivamente, o núcleo anteroventral periventricular (AVPV) da área pré-óptica (POA) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). Neste trabalho, investigamos se AVPV e ARC responderiam de forma diferenciada a níveis de  $E_2$  que exercem efeitos de retroalimentação negativa ou positiva. Para isto, foram utilizadas ratas ciclando em diestro (DI) ou proestro (PRO) e ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com óleo ou diferentes doses de  $E_2$  (OVX+ $E_2$ ). No experimento 1, foram feitas coletas seriadas de sangue das 13:00 h às 18:00 h, para análise dos níveis de  $E_2$ , LH e prolactina (PRL). Após a última coleta, as ratas foram perfundidas e os cérebros processados para análise imunohistoquímica. No experimento 2, as ratas foram decapitadas e POA e ARC foram dissecados para análise do RNAm de *Kiss1*, *Esr1* e *Esr2*. Os níveis plasmáticos de  $E_2$  se encontraram aumentados no PRO. Os tratamentos com  $E_2$  aumentaram o  $E_2$  plasmático, sendo os níveis encontrados em ratas tratadas com dose de 20  $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{dia}$  de  $E_2$  (OVX+ $E_2$ 20) semelhantes aos do PRO. Ratas em PRO exibiram o pico preovulatório de LH, o qual foi replicado em ratas OVX+ $E_2$ 20. Por outro lado, ratas tratadas com 1  $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{dia}$  de  $E_2$  (OVX+ $E_2$ 1) apresentaram redução dos níveis de LH em relação a ratas OVX. Todas as doses de  $E_2$  utilizadas foram capazes de promover um pico de secreção de PRL, semelhante ao pico do PRO. Consistente com a ocorrência do pico de LH, a expressão de receptor para progesterona (PR) e c-Fos no AVPV aumentou apenas nas ratas em PRO e OVX+ $E_2$ 20. No ARC, em contrapartida, ambas as doses de  $E_2$  nas ratas OVX+ $E_2$ 1 e OVX+ $E_2$ 20 induziram aumento da marcação de PR, aumento da expressão de PR em neurônios kisspeptina e redução do número de neurônios kisspeptina-

imunorreativos (ir), à semelhança de ratas em DI e PRO. A porcentagem de neurônios-ir à receptor para estrógeno do tipo alfa ( $ER\alpha$ ) foi aumentada no AVPV de ratas OVX+E<sub>2</sub>20. O RT-PCR revelou um efeito dose-resposta do E<sub>2</sub> sobre o RNAm de *Kiss1*, com aumento na POA e diminuição no ARC. Ainda, o ARC apresentou maior expressão de *Esr1* em comparação ao AVPV em ratas OVX+E<sub>2</sub>1 e maior razão *Esr1/Esr2*, independente do nível de E<sub>2</sub>. Os resultados demonstram que neurônios do ARC e AVPV respondem a baixos e altos níveis de E<sub>2</sub>, respectivamente. Baixos níveis de E<sub>2</sub> inibem, enquanto altos níveis estimulam a secreção de LH. Assim, a diferença de sensibilidade ao E<sub>2</sub> no ARC e AVPV parece exercer um importante papel na gênese dos efeitos de retroalimentação negativa e positiva sobre a secreção de LH.

Palavras-chave: estradiol, hormônio luteinizante, núcleo anteroventral periventricular, núcleo arqueado, kisspeptina, prolactina.

## ABSTRACT

The preovulatory surge of luteinizing hormone (LH) is a key event responsible for ovulation and fertility in females. LH secretion is under estradiol ( $E_2$ ) control, through negative and positive feedback mechanisms that seem to evolve, respectively, the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) of the preoptic area (POA) and the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC). Here, we investigated whether the AVPV and the ARC would respond differently to negative and positive feedback levels of  $E_2$ . We used cycling rats on diestrus (DI) or proestrus (PRO) and ovariectomized (OVX) rats treated with oil or  $E_2$  (OVX+ $E_2$ ) in different doses. In experiment 1, serial blood collection was performed from 13:00 h to 18:00 h, in order to analyze  $E_2$ , LH and prolactin (PRL) levels. After the last blood sampling, rats were perfused and the brains were processed for immunohistochemistry. In experiment 2, rats were decapitated and the POA and ARC were dissected for *Kiss1*, *Esr1* and *Esr2* mRNA analysis. Plasma  $E_2$  levels were elevated in PRO.  $E_2$  treatments increased plasma  $E_2$  levels, with rats treated with 20  $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$  (OVX+ $E_2$ 20) displaying similar values to PRO. Rats on PRO exhibited the preovulatory LH surge, which was replicated in OVX+ $E_2$ 20 rats. On the other hand, rats treated with 1  $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$   $E_2$  (OVX+ $E_2$ 1) showed only a decrease in LH levels compared to OVX rats. All  $E_2$  doses were able to promote surges of PRL secretion, likewise PRO. Consistent with the occurrence of the LH surge, expression of progesterone receptor (PR) and c-Fos in the AVPV increased only in PRO and OVX+ $E_2$ 20 rats. However, in the ARC, both low and high levels of  $E_2$  in OVX+ $E_2$ 1 and OVX+ $E_2$ 20 rats, respectively, increased PR single labeling, PR coexpression in kisspeptin neurons and decreased the number of kisspeptin-immunoreactive (ir) neurons, to the levels found in DI and PRO rats. The percentage of estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ )-ir neurons increased in the AVPV of OVX+ $E_2$ 20 rats. RT-PCR revealed

dose-response effects of E<sub>2</sub> on *Kiss1* mRNA levels, with stimulation in the POA and inhibition in the ARC. Moreover, the ARC showed higher *Esr1* expression compared to the AVPV in OVX+E<sub>2</sub>1 rats, and a higher *Esr1/Esr2* ratio regardless of the E<sub>2</sub> levels. The results demonstrate that neurons in the ARC and AVPV respond selectively to low and high levels E<sub>2</sub>, respectively. Low E<sub>2</sub> inhibits, while high E<sub>2</sub> stimulates LH secretion. Thus, the differential sensitivity of ARC and AVPV neurons to E<sub>2</sub> seems to play a role in the switch between negative- and positive-feedback effects on LH secretion.

Key-words: estradiol, luteinizing hormone, anteroventral periventricular nucleus, arcuate nucleus, kisspeptin, prolactin.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
Ciclo reprodutivo: mecanismos de controle .....	11
Kisspeptina: papel no controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG).....	13
ERs e o controle do eixo reprodutivo .....	16
Ciclo ovariano e secreção hormonal.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
OBJETIVO GERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
Animais.....	25
Planejamento experimental.....	26
Experimento 1: Efeito de diferentes níveis de E <sub>2</sub> sobre a secreção de LH e parâmetros funcionais de neurônios do AVPV e ARC .....	26
Experimento 2: Efeitos de doses de retroalimentação negativa e positiva de E <sub>2</sub> sobre a expressão de Kiss1, Esr1 e Esr2 no AVPV e ARC de ratas OVX .....	26
Anestésicos e drogas.....	27
Cirurgias .....	27
Ovariectomia .....	27
Coleta de sangue.....	28
Imunohistoquímica – Marcação Fluorescente.....	30
ELISA.....	31
Radioimunoensaio .....	32
RT-PCR em tempo real .....	32
Análise Estatística .....	34
4. CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS .....	36

## **1. INTRODUÇÃO**

### **Ciclo reprodutivo: mecanismos de controle**

Em mamíferos, o ciclo reprodutivo é controlado por um eixo composto por três estruturas: o hipotálamo, a hipófise anterior e as gônadas. O hipotálamo constitui a estrutura central regulatória desse eixo. Seus neurônios se projetam para a eminência mediana, onde secretam hormônios no sistema porta-hipofisário para agir na hipófise anterior que, por sua vez, exerce controle sobre as gônadas (Clarke, 2015).

Os neurônios hipotalâmicos responsáveis por essa regulação central do eixo reprodutivo são neurônios produtores de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que, em roedores, residem majoritariamente na área pré-óptica (POA) e cuja secreção

pulsátil induz a produção e secreção de gonadotrofinas pela hipófise anterior. As gonadotrofinas estimulam a gametogênese e a produção de esteroides pelas gônadas. Estes esteroides, por sua vez, participam da regulação dos processos de retroalimentação negativa e positiva no hipotálamo e na hipófise anterior (Christian & Moenter, 2010; Clarke, 2015).

Em ratas, os níveis hormonais variam durante o ciclo ovariano, que dura de 4 a 5 dias (Smith et al., 1975). Para que a ovulação ocorra, é essencial que haja um pico na liberação do hormônio luteinizante (LH), produzido pela hipófise anterior. Na maior parte do ciclo, o estradiol ( $E_2$ ) exerce o efeito de retroalimentação negativa sobre a função dos neurônios GnRH, inibindo a sua secreção e, conseqüentemente, a secreção do LH (Shupnik et al., 1988; Caraty et al., 1989; Shupnik, 1996). No entanto, é necessário ocorrer um aumento significativo dos níveis de  $E_2$ , consistente com a secreção durante a fase folicular tardia, para que ocorra a ovulação (Moenter et al., 1990). Neste ponto, o  $E_2$  passa a exercer o efeito de retroalimentação positiva nos neurônios GnRH, estimulando um aumento da liberação de GnRH (Moenter et al., 1990; Moenter et al., 1991), que induz um pico na secreção de LH pela hipófise anterior, processo chave para a ovulação (Levine et al., 1991; Christian & Moenter, 2010). Por sua vez, na ausência de  $E_2$ , o pico de LH e ovulação não ocorrem (Neill et al., 1971). Ao mesmo tempo, o tratamento de ratas ovariectomizadas (OVX) com  $E_2$  promove picos diários de LH no período da tarde (Caligaris et al., 1971; Legan & Karsch, 1975).

Em roedores, além do aumento dos níveis de  $E_2$ , para que o pico de GnRH/LH ocorra, é necessário que haja também um sinal circadiano, emitido pelo núcleo supraquiasmático (SCN) (Kriegsfeld, 2013). Este sinal sincroniza a ocorrência do pico (e da ovulação) com o comportamento sexual (Herbison, 2006). Portanto, o pico de

GnRH/LH só acontece quando o sinal de altos níveis de E<sub>2</sub> e o sinal do relógio circadiano coincidem (Chappell, 2005). Assim, mesmo que o E<sub>2</sub> esteja presente em concentrações elevadas durante todo o dia, o pico de LH ocorre apenas no final da tarde.

No entanto, a ação do E<sub>2</sub> sobre a atividade dos neurônios GnRH ocorre de forma indireta, uma vez que estes neurônios não expressam o receptor para estrógeno do tipo alfa (ER $\alpha$ ), o qual é responsável pelos efeitos de retroalimentação negativa e positiva (Wintermantel et al., 2006; Glidewell-Kenney et al., 2007). Como será exposto em seguida, esse controle do E<sub>2</sub> sobre os neurônios GnRH é mediado de forma indireta via interneurônios, como por exemplo neurônios kisspeptinérgicos (Shivers et al., 1983; Popa et al., 2005).

### **Kisspeptina: papel no controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG)**

Dentre os neurônios de primeira ordem que se projetam para os neurônios GnRH, há um tipo neuronal considerado atualmente essencial para o funcionamento do eixo reprodutivo: os neurônios kisspeptinérgicos, responsáveis pela produção de kisspeptina. Kisspeptinas são peptídeos pertencentes à família de peptídeos RF-amida, assim denominada por todos os seus membros compartilharem entre si uma sequência comum de arginina-fenilalanina-NH<sub>2</sub> na porção C-terminal. Esta característica é indispensável para a atividade biológica desses peptídeos (Tsutsui et al., 2010). As kisspeptinas são essenciais para a reprodução e, recentemente, têm sido estudadas para a sua utilização no tratamento de disfunções hormonais e de fertilidade. Elas são codificadas pelo gene *Kiss1*, que foi descoberto em 1996 como um gene supressor de metástase em células de melanoma (Lee et al., 1996). Por ter sido descoberto na cidade de Hershey, famosa pela fábrica dos chocolates “Kisses”, esse gene recebeu o nome de *Kiss1* (Lee et al., 1996). O gene *Kiss1* é traduzido em um peptídeo inativo de 145 aminoácidos, que é clivado em fragmentos ativos de 54, 14, 13 ou 10 aminoácidos,

coletivamente denominados kisspeptinas (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). As kisspeptinas se ligam ao receptor acoplado à proteína G GPR54, também denominado Kiss1r, localizado em diferentes tecidos, entre eles, nos neurônios GnRH (Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005), os quais recebem projeções dos neurônios kisspeptinérgicos (Clarkson & Herbison, 2006). Han e colaboradores mostraram em 2005 que aproximadamente 90% dos neurônios GnRH expressam o GPR54 (Han et al., 2005). A kisspeptina age estimulando esses neurônios, cujo aumento da atividade pulsátil é o marco do início da puberdade (Popa et al., 2005; Seminara & Kaiser, 2005; Herbison, 2016).

A kisspeptina, através do seu receptor GPR54, tem efeito estimulatório na excitabilidade elétrica dos neurônios GnRH (Liu et al., 2008). A administração central de kisspeptina aumenta a frequência de disparo desses neurônios (Han et al., 2005), além de induzir a expressão de c-Fos em aproximadamente 85% deles (Irwig et al., 2004). Assim, a kisspeptina induz a secreção de GnRH e, conseqüentemente, de gonadotrofinas (Gottsch et al., 2004; Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005; Navarro et al., 2005). Por outro lado, camundongos que tiveram deleções no gene *Kiss1* apresentam quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico, caracterizado por redução na secreção de gonadotrofinas, redução do tamanho das gônadas e atraso no início da puberdade (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007). Humanos e camundongos com mutações no gene que codifica o GPR54, com perda de função desse receptor, também apresentam hipogonadismo hipogonadotrófico (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Experimentos em camundongos knockout (KO) para GPR54 mostraram que a infusão de kisspeptina nesses animais não é capaz de estimular a secreção de gonadotrofinas (Messenger et al., 2005), e que o tratamento desses animais com E<sub>2</sub> não é capaz de induzir a ativação dos neurônios GnRH (Dror et al., 2013). Assim, conclui-se

que a sinalização através da ligação da kisspeptina ao seu receptor é essencial para a maturação sexual e a regulação do eixo HPG (Seminara et al., 2003; Seminara & Kaiser, 2005).

Os neurônios kisspeptinérgicos expressam receptores para esteroides sexuais (Smith et al., 2005a) e, em roedores, estão localizados majoritariamente em duas regiões cerebrais: no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) da POA e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (Gottsch et al., 2004; Clarkson et al., 2009). A população de neurônios kisspeptinérgicos do ARC co-expressa três neuropeptídios: kisspeptina, neurocinina B e dinorfina. Por este motivo, estes neurônios também são denominados neurônios KNDy (Navarro et al., 2009).

A regulação da expressão de *Kiss1* em neurônios kisspeptinérgicos é exercida pelo E<sub>2</sub>. Porém, o efeito desse esteroide é diferente entre as duas populações neuronais. O E<sub>2</sub> aumenta a expressão de *Kiss1* no AVPV, enquanto diminui a sua expressão no ARC (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Este efeito diferenciado do E<sub>2</sub> entre as populações de neurônios kisspeptinérgicos tem embasado a hipótese de que essas duas regiões cerebrais estão envolvidas no controle dual do E<sub>2</sub> sobre a secreção de LH. Os neurônios do ARC estariam, então, envolvidos no mecanismo de retroalimentação negativa do E<sub>2</sub> sobre a secreção de LH, enquanto os neurônios do AVPV estariam envolvidos no mecanismo de retroalimentação positiva (Smith et al., 2005a).

Diversos estudos corroboram essa hipótese. Neurônios do AVPV expressam ER $\alpha$  e receptor para progesterona (PR) (Hoffman et al., 2005). Microimplantes de E<sub>2</sub> no AVPV de ratas induziram pico de LH (Goodman, 1978), enquanto microimplantes de anti-estrógenos nesta mesma região inibiram a ocorrência desse pico (Petersen & Barraclough, 1989). Além disso, lesões no AVPV em ratas causam distúrbios no ciclo

estral, com fêmeas persistindo no estro ou no diestro, a depender do nível em que a lesão foi feita (Wiegand et al., 1980).

A população de neurônios kisspeptinérgicos do AVPV é sexualmente dimórfica, havendo maior número de neurônios kisspeptinérgicos (Clarkson & Herbison, 2006), além de maior expressão de RNAm de *Kiss1* nesta área cerebral em fêmeas do que em machos (Kauffman et al., 2007). Esta diferença reflete o papel dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV na geração do pico preovulatório de LH, que ocorre apenas em fêmeas.

### **ERs e o controle do eixo reprodutivo**

Os ERs pertencem à superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição ativados por ligantes, cujos membros incluem os receptores para hormônios esteroides, hormônios tireoidianos, vit. D, entre outros (Evans, 1988). O ER $\alpha$ , em oposição ao ER $\beta$ , é o principal receptor responsável pelos mecanismos de retroalimentação do E<sub>2</sub> sobre o eixo gonadal (Couse et al., 2003; Sanchez-Criado et al., 2004; Wintermantel et al., 2006). Estudos com camundongos KO para ERs mostraram que no modelo de animais OVX tratados com esteroides gonadais, camundongos KO para ER $\beta$  apresentam um pico preovulatório de gonadotrofinas normal, enquanto em animais ER $\alpha$ KO o pico não ocorre (Wintermantel et al., 2006). Neste mesmo estudo, também foi feita a administração de agonistas de ER $\alpha$  e ER $\beta$  em camundongos WT. Os resultados mostraram que a administração de agonista para ER $\alpha$  é suficiente para gerar o mecanismo de retroalimentação positiva normal, enquanto a administração de ER $\beta$  não foi capaz de induzir o pico de LH (Wintermantel et al., 2006). Todavia, camundongos ER $\beta$ KO apresentam irregularidade de ciclo estral e menor pico de LH no proestro (Jays et al., 2014), e a infusão de antisense para ER $\beta$  no terceiro ventrículo é capaz de promover efeito semelhante em ratas (Orikasa et al., 2002). Desta forma,

embora não essencial, o ER $\beta$  parece exercer um efeito modulatório no mecanismo de retroalimentação positiva do estradiol.

Sabe-se que animais OVX tratados com E<sub>2</sub> apresentam um aumento na expressão de *Kiss1* no AVPV e diminuição no ARC. No entanto, essas populações de neurônios kisspeptinérgicos não respondem ao tratamento com E<sub>2</sub> em camundongos ER $\alpha$ KO. Por outro lado, animais ER $\beta$ KO apresentam a mesma resposta encontrada em animais wild type (Smith et al., 2005a). Ainda, o efeito inibitório do E<sub>2</sub> sobre o LH é mantido em camundongos transgênicos cujo ER $\alpha$  não apresenta capacidade de ligação ao elemento de resposta ao estrógeno (ERE) no DNA (Glidewell-Kenney et al., 2007). Neste caso, a ação do ER $\alpha$  ocorre de maneira não-clássica, independente da ligação ao ERE. Em conjunto, as evidências indicam que o principal receptor responsável pela mediação dos efeitos estimulatórios e inibitórios do E<sub>2</sub> sobre os neurônios kisspeptinérgicos é o ER $\alpha$ . Ainda assim, principalmente no que diz respeito ao efeito de retroalimentação positiva, a quantificação da expressão do ER $\beta$  também se faz importante, uma vez que este receptor modula a atividade transcricional do ER $\alpha$  (Hall & McDonnell, 1999). Assim, a depender das concentrações séricas de E<sub>2</sub>, o ER $\beta$  pode comprometer a ação do E<sub>2</sub> sobre o ER $\alpha$  (Hall & McDonnell, 1999).

Os neurônios do AVPV que expressam ER $\alpha$  recebem inputs diretos do SCN no rato. Este, então, pode ser um local de integração dos inputs circadianos e estrogênicos na regulação dos neurônios GnRH (Watson et al., 1995).

Os neurônios GnRH expressam apenas o ER $\beta$ , o que corrobora com a hipótese de que os principais efeitos do E<sub>2</sub> não acontecem diretamente sobre esses neurônios (Herbison & Pape, 2001; Hrabovszky et al., 2001). Por outro lado, virtualmente todos os neurônios kisspeptinérgicos, tanto do ARC como do AVPV, coexpressam ER $\alpha$  e, em

menor grau, ER $\beta$  (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2006). No entanto, o mecanismo através do qual o E<sub>2</sub> exerce efeitos contraditórios nessas duas populações de neurônios kisspeptinérgicos ainda não é conhecido.

### **Prolactina e seus mecanismos de controle**

A prolactina (PRL) é um hormônio adenohipofisário que exerce importantes efeitos reprodutivos. Além do papel primordial na lactação, a PRL modula a atividade do eixo HPG e participa do comportamento maternal (Freeman et al., 2000). Camundongos fêmea com deleção do receptor de PRL apresentam comprometimento da fertilidade (Bole-Feysot et al., 1998), o que ressalta a importância deste hormônio e do seu receptor no controle do eixo reprodutivo.

A PRL é um hormônio proteico, produzido e secretado pelos lactotrofos hipofisários, que foi primeiramente reconhecido pelo seu papel na promoção da lactação (Freeman et al., 2000). No entanto, este hormônio também exerce diversas outras funções, tendo papéis importantes na osmorregulação, crescimento e desenvolvimento, metabolismo, modulação de comportamentos e também na regulação do sistema imunológico (Bole-Feysot et al., 1998). Fatores como sucção do mamilo (Terkel et al., 1972), estresse (Gala, 1990), elevação dos níveis sanguíneos de E<sub>2</sub> (Maurer & Gorski, 1977) e estimulação do cérvix uterino na cópula (Smith et al., 1976) induzem a secreção da PRL pelos lactotrofos. Em 1986, Thomas e colaboradores mostraram que uma cirurgia desconectando o hipotálamo da hipófise causava aumento na secreção de PRL em ovelhas em anestro e em fase reprodutiva (Thomas et al., 1986). Este experimento mostrou que um fator hipotalâmico mantém um tônus inibitório sobre a secreção de PRL. Sabe-se que esse controle ocorre principalmente através da inibição e estimulação dos neurônios hipotalâmicos dopaminérgicos (Grattan & Kokay, 2008). Estes neurônios

secretam dopamina (DA), que inibe a secreção de PRL (Freeman et al., 2000). Os neurônios neuroendócrinos dopaminérgicos pertencem a três diferentes populações de neurônios hipotalâmicos: neurônios do sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA), neurônios do sistema tuberohipofiseal dopaminérgico (THDA) e neurônios do sistema periventricular hipofiseal dopaminérgico (PHDA). Os neurônios TIDA localizam-se no ARC e projetam-se para a zona externa da eminência mediana (EM) (Kawano & Daikoku, 1987). Os neurônios THDA, por sua vez, localizam-se no ARC rostral, e projetam-se para os lobos intermediário e neural da hipófise (Holzbauer & Racke, 1985). Finalmente, os neurônios PHDA estão localizados no núcleo periventricular hipotalâmico, com projeções para o lobo intermediário (Goudreau et al., 1995). Ao estimular a atividade desses neurônios produtores de DA, a PRL regula a sua própria secreção, através de um mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Um estudo eletrofisiológico feito em camundongos mostrou que há um rápido aumento na taxa de disparo dos neurônios TIDA após tratamento com PRL (Brown et al., 2012). Níveis de DA diminuem no sangue hipofisário de ratas em proestro (Ben-Jonathan et al., 1977; Lofstrom, 1977) e durante o pico de PRL no modelo de ratas OVX tratadas com E<sub>2</sub> (OVX+E<sub>2</sub>) (de Greef et al., 1985).

Sabe-se que fibras de neurônios kisspeptinérgicos do ARC se projetam para os neurônios TIDA, tanto em ratas intactas (Sawai et al., 2012) como em ratas OVX tratadas com E<sub>2</sub> (Szawka et al., 2010). Os neurônios dopaminérgicos podem ser inibidos por esses neurônios kisspeptinérgicos. A infusão intracerebral de kisspeptina aumenta a secreção de PRL de maneira dose-dependente (Szawka et al., 2010). Assim, a kisspeptina inibe os neurônios dopaminérgicos que, ao diminuírem a secreção de DA, possibilitam o aumento na secreção de PRL. No entanto, ao se comparar ratas OVX

tratadas com veículo e ratas OVX+E<sub>2</sub>, o aumento da PRL é observado apenas no grupo que recebeu tratamento hormonal, podendo-se concluir que este mecanismo é dependente de E<sub>2</sub> (Ribeiro et al., 2015). De maneira inversa, a PRL também exerce controle sobre os neurônios kisspeptinérgicos do ARC. A hiperprolactinemia suprime a expressão de kisspeptina no ARC, o que resulta na diminuição da secreção de LH, com possível impacto negativo sobre a fertilidade (Araujo-Lopes et al., 2014).

### **Ciclo ovariano e secreção hormonal**

Em ratas, os eventos do ciclo reprodutivo estão sob total influência do fotoperíodo e do controle hormonal. A ovulação ocorre a cada 4 a 5 dias durante todo o ano, e o ciclo é composto pelas fases de: proestro, estro, metaestro e diestro. A ação do E<sub>2</sub> sobre as células do epitélio vaginal possibilita a distinção dessas fases através da análise em microscópio do fluido vaginal das ratas (Freeman, 2006). O proestro constitui a fase em que o pico preovulatório de LH ocorre. Ele é caracterizado pela predominância de células epiteliais nucleadas, agrupadas em cachos (Hartman, 1944; Goldman et al., 2007). Em seguida, as fêmeas entram em estro. Nesta fase, elas se encontram receptivas para serem fecundadas e, em seu fluido vaginal, predominam células epiteliais cornificadas, cuja forma é irregular e não se pode observar núcleo. A próxima fase do ciclo estral é o metaestro ou diestro-1, em que as modificações do trato reprodutivo que ocorreram no estro voltam ao normal. O metaestro é caracterizado por uma combinação de leucócitos e células epiteliais cornificadas ou arredondadas. Finalmente, no diestro-2, caracterizado por grande predominância de leucócitos no fluido vaginal, secreções ovarianas preparam novamente o trato reprodutivo para a recepção do novo óvulo, que teoricamente será fecundado no estro do ciclo seguinte. O E<sub>2</sub> permanece baixo no estro, começa a aumentar no final do diestro-1 e esse aumento continua no diestro-2 até que atinge seu máximo na tarde do proestro. Já os níveis de

LH permanecem baixos ao longo do estro, diestro-1, diestro-2 e até meio dia do proestro. Ao longo da tarde do proestro, os níveis de LH se elevam, e um pico é observado ao final da tarde, sincronizado com o momento da transição claro-escuro. Este pico de LH é responsável pela indução da ovulação. Depois disso, os níveis de LH retornam ao seu nível basal na manhã do estro (Smith et al., 1975). O perfil de secreção de PRL ao longo do ciclo estral é caracterizado por uma secreção de níveis basais desse hormônio nas fases de diestro, com aumento desses níveis no proestro e estro (Szawka et al., 2005). Esse perfil hormonal de ratas descrito anteriormente pode ser observado na figura abaixo, reproduzida do estudo pioneiro de Smith e colaboradores (Smith et al., 1975).

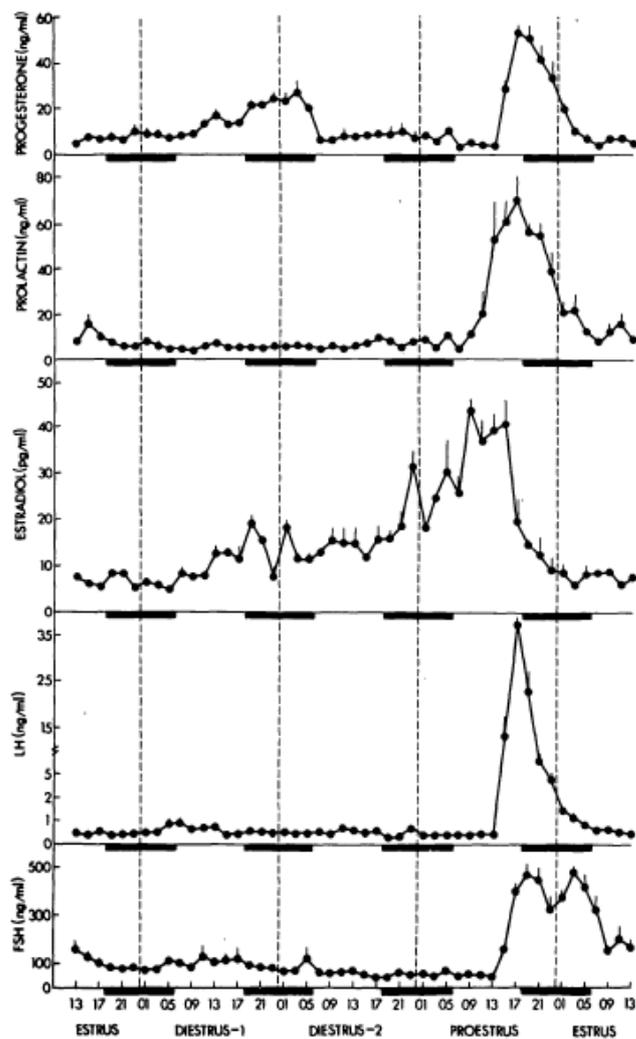


Figura de Smith et al. 1975 (Smith et al., 1975): Perfil de secreção de progesterona, prolactina, estradiol, LH e FSH ao longo das quatro fases do ciclo estral de ratas. Barras pretas representam a fase escura; Pontos pretos representam a média dos níveis hormonais detectados.

O aumento nos níveis de  $E_2$  produzido pelo folículo em desenvolvimento no proestro é responsável pela indução do pico na secreção de GnRH, que culmina no pico preovulatório de LH (Clarkson & Herbison, 2009). A imunoneutralização do  $E_2$  circulante bloqueia o pico de LH (Neill et al., 1971), enquanto que em ratas OVX o tratamento com  $E_2$  induz picos de LH no período da tarde semelhante ao do proestro (Legan & Karsch, 1975). Sabe-se que altas doses de  $E_2$  são capazes de promover tanto um efeito rápido de retroalimentação negativa quanto um efeito lento de retroalimentação positiva sobre a secreção de LH (Caligaris et al., 1971; Legan et al., 1975; Szawka et al., 2013). Entretanto, os mecanismos que determinam a ocorrência destes efeitos ora inibitórios ora excitatórios do  $E_2$  permanecem ainda pouco entendidos. Em roedores, modelos que utilizem diferentes doses de  $E_2$  para a promoção seletiva dos efeitos de retroalimentação negativa ou positiva ainda não estão claramente estabelecidos. Estudo prévio em ratas já avaliou o efeito de diferentes doses de benzoato de  $E_2$  sobre os níveis séricos de LH e PRL (doses de 0.05–50  $\mu$ g) (Mallampati & Johnson, 1973b). No entanto, neste estudo, a coleta de sangue foi feita apenas em um horário no período da manhã. Portanto, os resultados obtidos não mostraram o efeito das diferentes doses de  $E_2$  no período de ocorrência do mecanismo de retroalimentação positiva. Além disso, os efeitos neuronais desses tratamentos não foram analisados. No presente trabalho, os níveis sanguíneos de LH foram avaliados durante toda a tarde, incluindo o período de ocorrência do pico, e parâmetros de atividade neuronal foram avaliados no AVPV e ARC.

Síntese (Maurer & Gorski, 1977) e liberação de PRL (Caligaris et al., 1974) pela hipófise também são induzidas pela elevação nos níveis sanguíneos de E<sub>2</sub>. Assim, no presente trabalho, avaliamos também a secreção de PRL em resposta ao tratamento com diferentes doses de E<sub>2</sub> como um hormônio reprodutivo adicional, que também está sujeito aos efeitos do E<sub>2</sub>, mas que não pertença ao eixo gonadal e, portanto, não é regulado pelos efeitos de retroalimentação negativos e positivos do E<sub>2</sub>. Caligaris et al. (1974) já haviam verificado o efeito de diferentes doses de benzoato de E<sub>2</sub> sobre a secreção de PRL às 11:00 h e 17:00 h. Foi observado que doses bastante reduzidas de E<sub>2</sub> são capazes de promover o pico de PRL às 17:00 h. As doses de 1, 5 e 20 µg/rata promoveram aumentos de secreção de PRL de similar (Caligaris et al., 1974). Já doses menores do que 1 µg/rata resultaram em estímulos dose-dependentes. Outros estudos, avaliando um único tempo de coleta sanguínea, também observaram que baixas doses de benzoato de E<sub>2</sub> são capazes de aumentar a secreção de PRL (Mallampati & Johnson, 1973a).

A investigação dos efeitos de diferentes doses de E<sub>2</sub> faz-se importante para o estabelecimento de modelos experimentais que promovam os mecanismos de retroalimentação negativa ou positiva de forma seletiva sobre a secreção de LH, e seus efeitos sobre a ativação neuronal dos núcleos cerebrais responsáveis pela modulação desses mecanismos. A secreção de PRL, por sua vez, reflete efeitos do E<sub>2</sub> sobre os neurônios dopaminérgicos do hipotálamo e lactotrofos adenohipofisários.

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

A liberação do LH está sob o controle do estradiol (E<sub>2</sub>) através de mecanismos de retroalimentação negativa e positiva que parecem envolver, respectivamente, o ARC e o AVPV. Neste trabalho, testamos a hipótese de que AVPV e ARC responderiam de forma diferenciada a níveis de E<sub>2</sub> que exercem efeitos de retroalimentação positiva e negativa sobre a secreção de LH.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Padronizar doses de E<sub>2</sub> capazes de promover efeitos seletivos de retroalimentação negativa ou positiva sobre a secreção de LH em ratas OVX, e avaliar também o efeito destas doses sobre a secreção de PRL;
2. Avaliar os efeitos de doses de retroalimentação negativa e positiva de E<sub>2</sub> sobre parâmetros da atividade de neurônios do AVPV e ARC;
3. Avaliar os efeitos de doses de retroalimentação negativa e positiva de E<sub>2</sub> sobre a expressão dos genes *Kiss1*, *Esr1* e *Esr2* no AVPV e ARC.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar virgens de 2 a 3 meses de idade, com peso corporal entre 200-250 g provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de quatro por caixa (39 x 32 x 17 cm), em um ambiente de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luz (14:00 h claro / 10:00 h escuro; luzes acesas às 05:00 h) controladas, com água e ração *ad libitum*. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. As fêmeas tiveram seu ciclo acompanhado diariamente através da análise da citologia vaginal. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 100 / 2012).

## **Planejamento experimental**

### *Experimento 1: Efeito de diferentes níveis de E<sub>2</sub> sobre a secreção de LH e parâmetros funcionais de neurônios do AVPV e ARC*

As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral dez dias antes do experimento. Sete dias após a cirurgia, iniciou-se o processo de reposição hormonal. Os animais foram tratados diariamente às 09:00 h, durante três dias consecutivos, com injeções s.c. de óleo de milho (OVX, n = 8) ou E<sub>2</sub> nas doses de 1 (OVX+E<sub>2</sub>1; n = 5), 10 (OVX+E<sub>2</sub>10; n = 5) ou 20 µg/rata (OVX+E<sub>2</sub>20; n = 5), ou em doses crescentes, que consistiram em 5 µg/rata no primeiro dia, 10 µg/rata no segundo dia e 20 µg/rata no terceiro dia (OVX+E<sub>2</sub>5-20; n = 5). Os experimentos foram realizados entre 13:00 h e 18:00 h no quarto dia após o início dos tratamentos. Ratas intactas em proestro (PRO; n = 7) e diestro (DI; n = 6) foram utilizadas como referência de condições fisiológicas de altos e baixos níveis de E<sub>2</sub>, respectivamente. No dia anterior ao experimento, os animais tiveram a veia jugular canulada. No dia experimental, foram realizadas coletas de sangue em intervalos de 1 h, das 13:00 h às 18:00 h. Após a última coleta, as ratas foram perfundidas e os cérebros processados para análise imunohistoquímica da expressão de PR, c-Fos, kisspeptina, marcador nuclear neuronal (Neu-N) e ER $\alpha$  no AVPV e no ARC. As concentrações plasmáticas de LH e PRL das amostras de sangue foram determinadas por radioimunoensaio (RIE). Os níveis de E<sub>2</sub> no sangue dos animais foram determinados por ELISA.

### *Experimento 2: Efeitos de doses de retroalimentação negativa e positiva de E<sub>2</sub> sobre a expressão de Kiss1, Esr1 e Esr2 no AVPV e ARC de ratas OVX*

As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral dez dias antes do experimento. Sete dias após a cirurgia, iniciou-se o processo de reposição hormonal. Os animais foram tratados diariamente às 09:00 h, durante três dias, com injeções s.c. de

óleo (OVX, n = 6) ou E<sub>2</sub> em doses que exercem efeitos de retroalimentação negativa (1 µg/rata; OVX+E<sub>2</sub>1; n = 6) ou positiva (20 µg/rata; OVX+E<sub>2</sub>20, n = 6/grupo), conforme resultados obtidos no experimento 1. No quarto dia, as ratas foram decapitadas às 16:00 h e os cérebros foram retirados, rapidamente congelados em gelo seco e armazenados à -80 °C, para posterior análise da expressão do RNAm de *Kiss1* (codifica a kisspeptina), *Esr1* (codifica o ER $\alpha$ ) e *Esr2* (codifica o ER $\beta$ ) pela técnica de RT-PCR em tempo real.

### **Anestésicos e drogas**

Para a realização da ovariectomia e perfusão, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (cloridrato de cetamina; 80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Para a canulação da veia jugular, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,2,2-tribromoethanol 99%, Aldrich; 250 mg/Kg, i.p.). Após as cirurgias, os animais receberam tratamento profilático com antibiótico (Pentabiótico, Fort Dodge; 24000 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixin meglumina; Banamine, Schering-Plough; 2,5 mg/Kg peso corporal, s.c.). O E<sub>2</sub> (17 $\beta$ -estradiol; Sigma-Aldrich, EUA) foi administrado dissolvido em óleo de milho.

### **Cirurgias**

#### *Ovariectomia*

A ovariectomia foi realizada através da laparotomia bilateral. Após anestesia, foi feita a tricotomia e assepsia da região lateral do abdômen. Um corte foi realizado na região e, após incisão do tecido muscular, o tecido adiposo foi exteriorizado para que se obtivesse o acesso ao ovário. A tuba uterina foi clampeada, o ovário removido e as incisões no músculo e na pele foram suturadas.

#### *Canulação da veia jugular*

Após anestesia, foi realizada a tricotomia e assepsia da região clavicular direita, onde, após uma incisão, a veia jugular foi exposta. Um cateter de Silastic (10 cm de comprimento total, dividido em 3 e 7 cm por um ponto de ancoragem) foi implantado na veia jugular conforme previamente descrito (Harms & Ojeda, 1974). Um fio de aço inox (diâmetro 0,70 mm) foi utilizado para oclusão da cânula ao final da cirurgia.

### **Coleta de sangue**

No experimento 1, as amostras de 500 µL de sangue foram colhidas através da veia jugular nos horários determinados pelo protocolo experimental, e o mesmo volume foi repostado com solução de salina heparinizada (30 UI/mL) estéril. As amostras centrifugadas a 1200 g, por 20 min, a 4 °C e o plasma, armazenado a -20 °C até o momento das dosagens hormonais.

### **Perfusão e processamento do cérebro para imunohistoquímica**

Os animais foram perfundidos através da aorta ascendente, com 50 mL de tampão fosfato-salina (PBS) 0,01 M heparinizado (5 UI/mL), seguido de 400 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2 h e crioprotetidos em solução de sacarose 30% em PB 0,1M a 4 °C. Em seguida, foram congelados em isopentano 99% (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>), a -50 °C. Depois de congelados, os cérebros foram armazenados à -80 °C até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Quatro séries de secções coronais de 30 µm da extensão rostrocaudal da POA e ARC foram obtidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007). As secções foram armazenadas em solução crioprotetora a -20 °C (Watson et al., 1986) para a posterior realização de análises de imunohistoquímica para PR, c-Fos, kisspeptina, Neu-N e ERα no AVPV e no ARC, conforme protocolos previamente descritos (Aquino et al., 2016; Aquino et al., 2017).

## **Imunohistoquímica – Marcação método peroxidase**

Foi utilizado o método de free-floating para a realização da imunohistoquímica. As secções passaram por lavagens em PBS 0,01M em todos os passos do processo. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS contendo Triton X-100 (TX-100) 0,3% e albumina bovina (BSA) 1%. Para a marcação simples de PR e c-Fos, as secções foram retiradas da solução crioprotetora e lavadas 10 vezes durante 6 minutos com PBS 0,01M. Em seguida, as secções foram lavadas com glicina 0,1M por 10 min, para que os sítios antigênicos mascarados pelo PFA 4% utilizado para a fixação fossem expostos. Em seguida, as secções foram incubadas durante 30 min em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, com o objetivo de bloquear peroxidases endógenas, e depois incubadas durante 30 min em TX-100 0,4%. O TX-100 possui a função de permeabilizar a membrana celular, permitindo a penetração dos anticorpos. As secções foram incubadas em albumina bovina (BSA) 3% por 1 h, para evitar a formação de ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário, que foi o anti-c-Fos produzido em coelho (Ab-5; PC38, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha; 1: 20.000) ou o anti-PR produzido em coelho (A0098; Dako, EUA; 1: 400). A incubação foi feita por 48 h a uma temperatura de 4 °C. Foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na concentração de 1:2.000 por 2 h. As secções foram incubadas por 1 h em complexo avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories) a 1:300. A marcação foi revelada com solução contendo 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µL/mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e as lamínulas coladas com Entellan (Merck).

Imagens das secções foram obtidas em microscópio óptico utilizando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007) (Paxinos & Watson, 2007).

Para a dupla marcação de PR/kisspeptina, foi feito o mesmo procedimento realizado para a marcação simples, mas após a revelação da marcação para PR, foi feita uma nova incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% por 30 min, seguida da incubação com o anticorpo primário anti-kisspeptina-10 produzido em coelho (AB9754; Millipore, EUA) na concentração de 1:30.000. As secções foram mantidas a 4 °C por 48 h, e em seguida incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na concentração de 1:2.000 por 2 h. Foi feita uma segunda incubação em complexo avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories) a 1:300 por 1 h, e em seguida foi feita a revelação com solução de DAB (0,2 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.083µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão Tris-HCl. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e as imagens obtidas em microscópio óptico.

### **Imunohistoquímica – Marcação Fluorescente**

Para a dupla marcação de Neu-N e ER $\alpha$ , foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Assim como o método anterior, a imunofluorescência foi realizada por free-floating. Foram feitas lavagens em PBS 0,01M em todos os passos do processo, e os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS contendo Triton X-100 (TX-100) 0,3% e albumina bovina (BSA) 1%. As secções foram lavadas por 10 min com boridreto de sódio 0,1 M, e em seguida incubadas por 30 min em TX-100 0,4%. Após incubação de 1 h em BSA 3%, as secções foram incubadas nos anticorpos anti-NeuN produzido em camundongo (Millipore, Temecula, CA, EUA; 1:1.000) e anti-ER $\alpha$  produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA; 1:750) por 48 h. Após este período, as secções foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentes anti-camundongo Alexa Fluor 568 (Life Technologies, Eugene, OR,

USA; 1:1.000) e anti-coelho Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Eugene, OR, USA; 1:1.000) por 2 h. Os cortes foram lavados e montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e as lamínulas foram coladas com Krystalon (EMD). A análise e obtenção de imagens foram feitos em microscópio de fluorescência.

## **ELISA**

Para a dosagem de E<sub>2</sub>, utilizou-se amostras de plasma submetidas ou não a um processo de extração em éter. Para o processo de extração foi pipetado 1,5 mL de éter etílico grau HPLC em cada tubo adicionado 150 µL de plasma. Os tubos foram vedados com plástico filme e agitados duas vezes por 60 segundos. Os tubos foram, então, centrifugados a 4500 rpm por 20 min a 4 °C, e, em seguida, colocados no freezer -80 °C por 30 min. Após a retirada dos tubos do freezer, a fase líquida foi transferida para eppendorfs, que ficaram abertos overnight para evaporação do éter etílico. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 60 µL de tampão do ensaio e agitadas no vórtex 2 vezes por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem.

Os níveis plasmáticos de E<sub>2</sub> foram, então, dosados pelo kit DRG Estradiol ELISA (EIA-2693-96WELLS, DRG Diagnostics, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Foram pipetados 25 µL das soluções padrão e amostras na placa. Em seguida, foram adicionados 200 µL do hormônio conjugado com enzima peroxidase *horseradish* (HRP) e incubados por 2 h em temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µL de solução contendo substrato Tetrametilbenzidina (TMB). A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Não houve diferença de respostas entre amostras de plasma sem e com extração. Assim, os resultados apresentados referem-se a dosagem de plasma sem extração.

## **Radioimunoensaio**

As concentrações plasmáticas de LH e PRL foram determinadas por RIE de duplo anticorpo como previamente descrito (Szawka et al., 2007; Szawka et al., 2010). Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas no mesmo ensaio para se evitar variações inter-ensaio. Os anticorpos utilizados foram fornecidos pelo Programa Nacional de Peptídeos e Hormônios (Harbor-UCLA). O anticorpo para LH foi LH-S10 e o padrão de referência, LH-RP3. O anticorpo para PRL foi PRL-S9 e o padrão de referência, PRL-RP3.

## **RT-PCR em tempo real**

POA e ARC foram dissecadas para avaliação dos níveis de RNAm de *Kiss1*, *Esr1* e *Esr2*. Após a decapitação, os cérebros foram removidos e congelados em gelo seco. Em seguida, secções coronais foram obtidas em criostato na temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$  para realização de microdissecções pela técnica de “punch”, como previamente descrito (Helena et al., 2009). A APO e o núcleo ARC do hipotálamo foram dissecados em um e dois punches, respectivamente, utilizando-se uma agulha de 2 mm de diâmetro. Os punches foram homogeneizados em 500  $\mu\text{L}$  Tri-Reagent-LS (Life Technologies), utilizando uma seringa de 1 mL imediatamente após o experimento e então congelados à  $-80^{\circ}\text{C}$ . RNAm total foi extraído adicionando mais 500  $\mu\text{L}$  Tri-Reagent-LS aos eppendorfs contendo as amostras. 1  $\mu\text{g}$  de RNAm foi convertido em cDNA utilizando-se o kit Superscript III (Invitrogen). O cDNA sintetizado foi amplificado utilizando-se 4  $\mu\text{L}$  de cDNA, 600 nM de cada primer, 10  $\mu\text{L}$  do reagente SYBR Green água DNase e RNase-free conforme descrito pelo fabricante (kit Platinum® SYBR® GREEN qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen Life Technologies). Os ensaios foram realizados em um termociclador Applied Biosystems 7500 seguintes condições: 2 min a  $50^{\circ}\text{C}$ , 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido por 40 ciclos de 15 s a  $95^{\circ}\text{C}$ ; em seguida foi realizada análise da curva de

dissociação nas seguintes condições: 1 min a 60 °C, 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C e 80 ciclos de 10 s a 55 °C, com aumento gradativo de 0,5 °C. A análise da expressão de RNAm foi feita pela comparação do número de cópias do RNAm entre os grupos experimentais. O número de cópias foi inferido de acordo com o número mínimo de ciclos necessário para atingir um sinal de fluorescência superior ao nível basal (CT). A expressão relativa do RNAm de *Kiss1*, *Esr1* e *Esr2* foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001), onde o  $\Delta CT$  foi determinado pela subtração dos valores de CT do gene de interesse e do respectivo *Gapdh* (gene normalizador), e o  $\Delta\Delta CT$  foi obtido pela subtração do valor de  $\Delta CT$  de cada amostra pelo  $\Delta CT$  das amostras do grupo calibrador (determinado de acordo com os grupos experimentos de cada estudo). A exponencial negativa na base 2 do valor de  $\Delta\Delta CT$  forneceu a medida do número de vezes que o RNAm de *Kiss1*, *Esr1* e *Esr2* variou em relação ao grupo calibrador. A tabela 1 apresenta os primers utilizados para amplificação.

Gene	Primers	Número de acesso
<i>Kiss1</i>	Foward primer: 5'-GAGCCACTGGCAAAAATGGC-3'	NM_181692.1
	Reverse primer: 5'-ATTAACGAGTTCCTGGGGTCC-3'	
<i>Esr1</i>	Foward primer: 5'-GCACATTCCTTCCTTCCGTCT-3'	NM_012689.1
	Reverse primer: 5'-GCCGAGGTACAGATTGGCTT-3'	
<i>Esr2</i>	Foward primer: 5'-TGAGCAAAGCCAAGAGAAACG-3'	NM_012754.1
	Reverse primer: 5'-CCAGTTGCTCTGGACTCAAGGT-3'	

---

	Foward primer: 5'-ACAGCCGCATCTTCTTGTGC-3'	
<i>Gapdh</i>		NM_017008.4
	Reverse primer: 5'-GCCTCACCCCATTTGATGTT-3'	

---

**Tabela 1:** Genes e sequências de nucleotídeos dos primers utilizados no RT-PCR tempo real

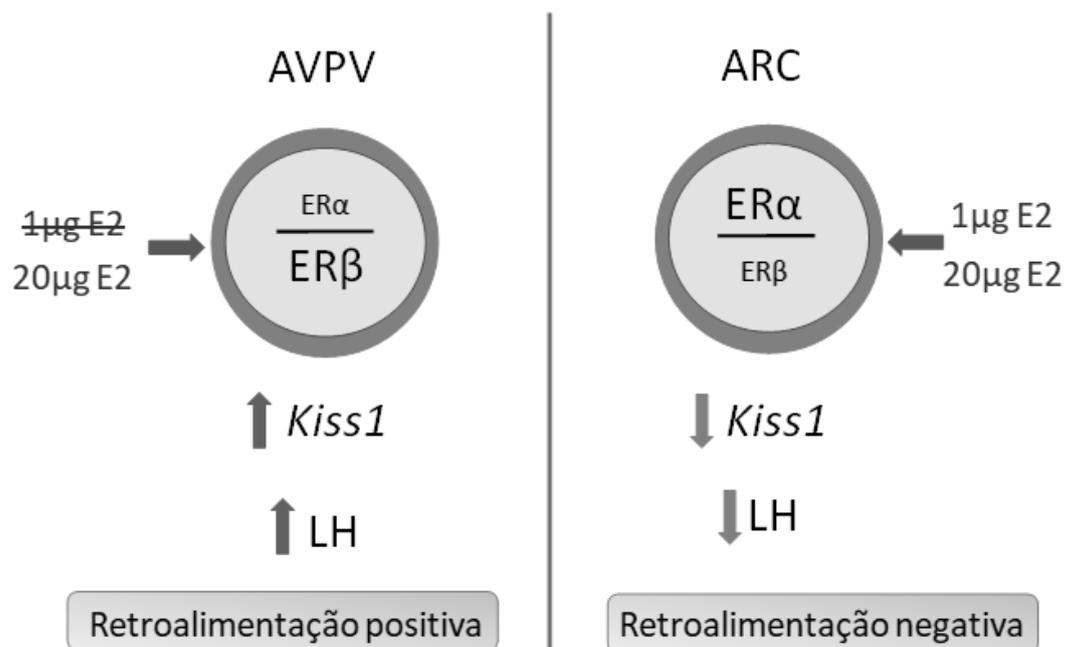
### **Análise Estatística**

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  EPM. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Newman-Keuls, conforme o número de grupos experimentais e ocorrência de um ou dois fatores de variação nos dados a serem analisados.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **4. CONCLUSÕES**

O  $E_2$  exerce um efeito ora inibitório ora estimulatório sobre a secreção de LH. O núcleo ARC está relacionado ao processo de retroalimentação negativa do  $E_2$  sobre a secreção de LH, enquanto o AVPV está envolvido no processo de retroalimentação positiva. Porém, o motivo pelo qual esses dois núcleos possuem diferentes responsabilidades ao  $E_2$  ainda não é conhecido. Para investigar essa questão, padronizamos doses de  $E_2$  que causassem efeitos de retroalimentação negativa ou positiva sobre a secreção de LH. A dose de 1  $\mu\text{g/rata}$  exerceu um efeito de retroalimentação negativa, inibindo a secreção do LH, à semelhança do dia de DI do ciclo estral. A dose de 20  $\mu\text{g/rata}$ , por sua vez, exerceu um efeito de retroalimentação positiva, estimulando um pico de LH semelhante ao pré-ovulatório do PRO. As análises de PR e c-Fos demonstraram que os neurônios do ARC são mais sensíveis ao  $E_2$  do que

os do AVPV. Nossos dados indicam que essa diferença de sensibilidade parece estar relacionada à expressão relativa dos subtipos de ERs nessas áreas, conforme representado na Figura 1. Sabe-se que ER $\beta$  diminui a potência das ações do ER $\alpha$  foi maior no ARC do que no AVPV, o que pode explicar o fato de serem necessários menores níveis de E<sub>2</sub> para gerar a ativação de neurônios do ARC. Desse modo, o ARC é um núcleo ativado por menores níveis de E<sub>2</sub>, presentes durante o efeito de retroalimentação negativa, enquanto o AVPV responde a altos níveis de E<sub>2</sub> que são característicos do mecanismo de retroalimentação positiva.



**Figura 1: Modelo proposto da diferença de sensibilidade dos núcleos AVPV e ARC a altas e baixas doses de E<sub>2</sub>.** No AVPV, a razão ER $\alpha$ /ER $\beta$  é baixa, o que significa que há uma forte influência de ER $\beta$  sobre a atividade transcricional de ER $\alpha$ . Dessa forma, baixas doses de E<sub>2</sub> não são capazes de ativar este núcleo. Apenas doses elevadas desse hormônio geram a ativação desse núcleo, estimulando a expressão de Kiss1 e,

consequentemente, a secreção de LH, num mecanismo de retroalimentação positiva. No ARC, por outro lado, a razão ER $\alpha$ /ER $\beta$  é alta e, consequentemente, a influência de ER $\beta$  sobre a atividade transcricional de ER $\alpha$  é baixa. Assim, tanto baixas como altas doses de E<sub>2</sub> ativam esse núcleo, inibindo a expressão de *Kiss1* e a secreção de LH, num mecanismo de retroalimentação negativa.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Aquino NS, Araujo-Lopes R, Batista IA, Henriques PC, Poletini MO, Franci CR, Reis AM, Szawka RE. Hypothalamic Effects of Tamoxifen on Oestrogen Regulation of Luteinising Hormone and Prolactin Secretion in Female Rats. *J Neuroendocrinol* 2016; 28.
2. Aquino NSS, Araujo-Lopes R, Henriques PC, Lopes FEF, Gusmao DO, Coimbra CC, Franci CR, Reis AM, Szawka RE. alpha-Estrogen and Progesterone Receptors Modulate Kisspeptin Effects on Prolactin: Role in Estradiol-Induced Prolactin Surge in Female Rats. *Endocrinology* 2017; 158: 1812-1826.
3. Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, Franci CR, Grattan DR, Szawka RE. Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. *Endocrinology* 2014; 155: 1010-1020.
4. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22: 724-763.
5. Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC. Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 1977; 100: 452-458.
6. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-268.
7. Brown RS, Piet R, Herbison AE, Grattan DR. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2012; 153: 2375-2384.
8. Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S. Release of luteinizing hormone induced by estrogen injection into ovariectomized rats. *Endocrinology* 1971; 88: 810-815.
9. Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 1974; 60: 205-215.

10. Caraty A, Locatelli A, Martin GB. Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J Endocrinol* 1989; 123: 375-382.
11. Chappell PE. Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 119-130.
12. Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 2010; 31: 544-577.
13. Clarke IJ. Hypothalamus as an endocrine organ. *Compr Physiol* 2015; 5: 217-253.
14. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147: 5817-5825.
15. Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 305-311.
16. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 673-682.
17. Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1039-1053.
18. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10714-10719.
19. de Greef WJ, Klootwijk W, Karels B, Visser TJ. Levels of dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in hypophysial stalk blood during an oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J Endocrinol* 1985; 105: 107-112.
20. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10972-10976.
21. Dror T, Franks J, Kauffman AS. Analysis of multiple positive feedback paradigms demonstrates a complete absence of LH surges and GnRH activation in mice lacking kisspeptin signaling. *Biol Reprod* 2013; 88: 146.
22. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
23. Freeman ME. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 2006: 2327-2386.
24. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80: 1523-1631.

25. Gala RR. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci* 1990; 46: 1407-1420.
26. Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 8173-8177.
27. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80: 84-97.
28. Goodman RL. The site of the positive feedback action of estradiol in the rat. *Endocrinology* 1978; 102: 151-159.
29. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 4073-4077.
30. Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 147-154.
31. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 752-763.
32. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999; 140: 5566-5578.
33. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005; 25: 11349-11356.
34. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* 1974; 36: 391-392.
35. Hartman CG. Some New Observations on the Vaginal Smear of the Rat. *Yale J Biol Med* 1944; 17: 99-112.
36. Helena CV, Szawka RE, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinising hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 805-812.
37. Herbison AE. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 2006: 1415-1482.
38. Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12: 452-466.
39. Herbison AE, Pape JR. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 292-308.

40. Hoffman GE, Le WW, Schulterbrandt T, Legan SJ. Estrogen and progesterone do not activate Fos in AVPV or LHRH neurons in male rats. *Brain Res* 2005; 1054: 116-124.
41. Holzbauer M, Racke K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 1985; 63: 97-116.
42. Hrabovszky E, Steinhäuser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z. Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 2001; 142: 3261-3264.
43. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 264-272.
44. Jayes FL, Burns KA, Rodriguez KF, Kissling GE, Korach KS. The naturally occurring luteinizing hormone surge is diminished in mice lacking estrogen receptor Beta in the ovary. *Biol Reprod* 2014; 90: 24.
45. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; 148: 1774-1783.
46. Kawano H, Daikoku S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1987; 265: 242-253.
47. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636.
48. Kriegsfeld LJ. Circadian regulation of kisspeptin in female reproductive functioning. *Adv Exp Med Biol* 2013; 784: 385-410.
49. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-1737.
50. Legan SJ, Karsch FJ. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology* 1975; 96: 57-62.
51. Legan SJ, Coon GA, Karsch FJ. Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 1975; 96: 50-56.
52. Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban JH, Vogelsong KM, Wolfe AM. Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in the rat. *Recent Prog Horm Res* 1991; 47: 97-151; discussion 151-153.
53. Liu X, Lee K, Herbison AE. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 2008; 149: 4605-4614.

54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
55. Lofstrom A. Catecholamine turnover alterations in discrete areas of the median eminence of the 4- and 5-day cyclic rat. *Brain Res* 1977; 120: 113-131.
56. Mallampati RS, Johnson DC. Serum and pituitary prolactin, LH, and FSH in androgenized female and normal male rats treated with various doses of estradiol benzoate. *Neuroendocrinology* 1973a; 11: 46-56.
57. Mallampati RS, Johnson DC. Serum and pituitary luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin levels in gonadectomized male, female and androgenized female rats treated with oestradiol benzoate. *J Endocrinol* 1973b; 59: 209-216.
58. Maurer RA, Gorski J. Effects of estradiol-17beta and pimozone on prolactin synthesis in male and female rats. *Endocrinology* 1977; 101: 76-84.
59. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1761-1766.
60. Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 1990; 127: 1375-1384.
61. Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 1991; 129: 1175-1182.
62. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009; 29: 11859-11866.
63. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005; 146: 1689-1697.
64. Neill JD, Freeman ME, Tillson SA. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* 1971; 89: 1448-1453.
65. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613-617.
66. Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS, Sakuma Y. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3306-3311.
67. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2007.

68. Petersen SL, Barraclough CA. Suppression of spontaneous LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats by microimplants of antiestrogens into the preoptic brain. *Brain Res* 1989; 484: 279-289.
69. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. A KiSS to remember. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 249-250.
70. Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE. Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 2015; 27: 88-99.
71. Sanchez-Criado JE, Martin De Las Mulas J, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A. Biological role of pituitary estrogen receptors ERalpha and ERbeta on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 247-258.
72. Sawai N, Iijima N, Takumi K, Matsumoto K, Ozawa H. Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. *Neurosci Res* 2012; 74: 10-16.
73. Seminara SB, Kaiser UB. New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1. *Endocrinology* 2005; 146: 1686-1688.
74. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614-1627.
75. Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 1983; 304: 345-347.
76. Shupnik MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 1996; 54: 279-286.
77. Shupnik MA, Gharib SD, Chin WW. Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcription in vivo. *Endocrinology* 1988; 122: 1842-1846.
78. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005a; 146: 3686-3692.
79. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006; 26: 6687-6694.
80. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005b; 146: 2976-2984.
81. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96: 219-226.

82. Smith MS, McLean BK, Neill JD. Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 1976; 98: 1370-1377.
83. Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 374-382.
84. Szawka RE, Helena CV, Rodovalho GV, Monteiro PM, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Locus coeruleus norepinephrine regulates the surge of prolactin during oestrus. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 639-648.
85. Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 3247-3257.
86. Szawka RE, Poletini MO, Leite CM, Bernuci MP, Kalil B, Mendonca LB, Carolino RO, Helena CV, Bertram R, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. *Endocrinology* 2013; 154: 363-374.
87. Terkel J, Blake CA, Sawyer CH. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 1972; 91: 49-53.
88. Thomas GB, Cummins JT, Cavanagh L, Clarke IJ. Transient increase in prolactin secretion following hypothalamo-pituitary disconnection in ewes during anoestrus and the breeding season. *J Endocrinol* 1986; 111: 425-431.
89. Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Seong JY, Vaudry H. Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 716-727.
90. Watson RE, Jr., Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides* 1986; 7: 155-159.
91. Watson RE, Jr., Langub MC, Jr., Engle MG, Maley BE. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Res* 1995; 689: 254-264.
92. Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE, Goy RW. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 1980; 31: 147-157.
93. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 2006; 52: 271-280.