

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

*INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS*

*DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA*

*Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia*

**INIBIÇÃO DA SECREÇÃO PULSÁTIL DE HORMÔNIO LUTEINIZANTE  
PELOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS TUBEROINFUNDIBULARES:  
PAPEL FISIOLÓGICO E NA INFERTILIDADE INDUZIDA POR  
HIPERPROLACTINEMIA**

DANIELA DE OLIVEIRA GUSMÃO

Belo Horizonte- MG  
Fevereiro/ 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
*INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS*  
*DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA*

*Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia*

**INIBIÇÃO DA SECREÇÃO PULSÁTIL DE HORMÔNIO LUTEINIZANTE  
PELOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS TUBEROINFUNDIBULARES:  
PAPEL FISIOLÓGICO E NA INFERTILIDADE INDUZIDA POR  
HIPERPROLACTINEMIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Doutoranda: Daniela de Oliveira Gusmão

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Belo Horizonte- MG  
Fevereiro/ 2021

043 Gusmão, Daniela de Oliveira.  
Inibição da secreção pulsátil de hormônio luteinizante pelos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares: papel fisiológico e na infertilidade induzida por hiperprolactinemia [manuscrito] / Daniela de Oliveira Gusmão. - 2021.

109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia e Farmacologia. 2. Dopamina. 3. Prolactina. 4. Hormônio Luteinizante. 5. Hiperprolactinemia. 6. Infertilidade. I. Szawka, Raphael Escorsim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO Nº 331 DE DANIELA DE OLIVEIRA GUSMÃO**

***"Inibição Da Secreção Pulsátil De Hormônio Luteinizante Pelos Neurônios Dopaminérgicos Tuberoinfundibulares: Papel Fisiológico e Na Infertilidade Induzida Por Hiperprolactinemia"***

**DANIELA DE OLIVEIRA GUSMÃO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **11 de fevereiro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

- Profa. Dra. Renata Frazão** - ICB/USP
- Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis** - FM/UFMG
- Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura** - DCFIS/UERJ
- Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias** - FMRP/USP
- Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka** - ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 11 de fevereiro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Escorsim Szawka, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2021, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2021, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Renata Frazão, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

19/02/2021

SEI/UFMG - 0553139 - Folha de Aprovação



Documento assinado eletronicamente por **Egberto Gaspar de Moura, Usuário Externo**, em 11/02/2021, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucila Leico Kogohara Elias, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 22:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0553139** e o código CRC **F36A0809**.

Referência: Processo nº 23072.205755/2021-93

SEI nº 0553139

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Luiz Augusto e Angelita.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me guia e concede serenidade para enfrentar os obstáculos.

Aos meus pais, Angelita e Luiz Augusto, pelo amor e constante dedicação. Por sempre me incentivarem ir ao encontro dos objetivos. À minha irmã Gisele pelo apoio e carinho.

Ao professor Raphael pelo apoio e disponibilidade em orientar e dividir seu conhecimento durante os quatro anos de doutoramento. Pelos valorosos conselhos e por ter se tornado um amigo durante esta trajetória.

Aos amigos do grupo kissseptina, Patrícia, Nayara, Ana, Roberta, Kaoma e Fernanda, pela contribuição na realização dos experimentos, troca de experiências, agradável convivência e, sobretudo, pela importante presença durante os anos que vivi em Belo Horizonte.

Aos professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Cândido Celso Coimbra, Adelina Martha dos Reis, Maristela de Oliveira Poletini, Glauber dos Santos Ferreira da Silva e Paula Bargi de Souza por todos os ensinamentos e experiências compartilhados, e pela convivência harmoniosa.

A todos os membros do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pelo ótimo convívio, bons momentos compartilhados e por terem se tornado uma eterna família científica em minha vida.

Ao professor e pesquisador David Grattan, e aos pesquisadores Joe Yip e Sharon Ladyman pela receptividade durante o doutorado sanduíche na Nova Zelândia, e pelo auxílio e colaboração na realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar este trabalho e às instituições Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) que através de bolsas de estudo viabilizaram a execução desta pesquisa durante os quatro anos de doutorado.

*“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro”*

*René Descartes*



## RESUMO

A hiperprolactinemia suprime a secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH), o que causa infertilidade em homens e mulheres. Entretanto, os neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), os quais controlam a secreção de LH, não apresentam receptores para prolactina (PRL), o que sugere uma modulação neuroendócrina indireta da PRL sobre estes neurônios. A PRL regula a própria secreção por meio da ativação dos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares (TIDA), uma vez que esses liberam dopamina na eminência mediana (ME), que inibe a secreção de PRL. Neste trabalho, investigamos se a dopamina proveniente dos neurônios TIDA do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) estaria envolvida na inibição da secreção de LH em situações fisiológica e de hiperprolactinemia. Para demonstrar ação dos neurônios TIDA sobre a secreção de LH, realizamos ativação seletiva destes neurônios por meio do uso de DREADDs em ratos que expressam Cre-recombinase sob o controle do promotor da enzima tirosina hidroxilase (TH-Cre). De fato, encontramos redução da amplitude dos pulsos de LH em resposta à ativação dos neurônios TIDA. Em busca da função fisiológica deste efeito, avaliamos a participação destes neurônios sobre a pulsatilidade de LH e a fertilidade em ratas ciclando. Para tanto, induzimos lesão seletiva dos neurônios TIDA com 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A lesão aumentou a amplitude dos pulsos de LH, pronunciadamente, o que foi acompanhado do aumento dos níveis de estradiol (E2) e do número de corpos lúteos. Em experimento subsequente, determinamos o efeito agudo da PRL sobre a atividade dos neurônios TIDA em ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com E2 (OVX+E2). A PRL ovina (oPRL) aumentou seletivamente a atividade dos terminais dos neurônios TIDA na ME aos 30 e 60 min após a injeção intracerebroventricular em associação a inibição das concentrações plasmáticas de PRL e LH. Por fim, avaliamos se o bloqueio dopaminérgico afetaria a inibição da secreção pulsátil de LH pela PRL em modelo de hiperprolactinemia aguda. Para tanto, realizou-se injeção subcutânea aguda de oPRL precedida da administração icv de antagonista de receptor dopaminérgico do tipo D2 (sulpirida) ou D1 (SCH23390)

em ratas OVX+E2. Como esperado, a oPRL reduziu a frequência e amplitude dos pulsos LH e o LH médio. A sulpirida preveniu a redução da amplitude dos pulsos e do LH médio pela oPRL, enquanto o SCH23390 preveniu a inibição da amplitude dos pulsos. Desta forma, nossos resultados demonstram que a dopamina dos neurônios TIDA inibe a secreção pulsátil de LH em situações fisiológicas e de hiperprolactinemia. Estes achados sugerem uma nova via pela qual a PRL pode suprimir a secreção de LH e causar infertilidade.

Palavras-chave: dopamina, prolactina, hormônio luteinizante, hiperprolactinemia, infertilidade, DREADD.

**ABSTRACT**

Hyperprolactinemia suppress luteinizing hormone (LH) secretion, which causes infertility in men and women. However, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons, which control LH release, do not express PRL receptors suggesting an indirect neuroendocrine regulation through other PRL-sensitive pathways. PRL regulates its own secretion by the activation of tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) neurons, since these neurons release dopamine in the median eminence (ME) to inhibit PRL secretion. We investigated whether the dopamine from TIDA neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC) would suppress LH secretion in physiologic conditions and during hyperprolactinemia. To demonstrate the action of TIDA neurons on LH secretion we performed a selective activation of these neurons using DREADDs in transgenic rats expressing Cre-recombinase under the control of tyrosine hydroxylase (TH) promoter (TH-Cre). Indeed, the selective activation of TIDA neurons reduced the amplitude of LH pulses in male rats. In order to investigate the physiological relevance of this effect, we evaluated the role of TIDA neurons on LH pulsatility and fertility in female rats. For that we induced selective lesion of TIDA neurons with 6-hydroxydopamine (6-OHDA). TIDA ablation markedly increased the amplitude of LH pulses and was associated with increased secretion of estradiol (E2) and number of corpora lutea. In subsequent experiments, we investigated the acute effect of PRL on the activity of TIDA neurons in ovariectomized (OVX) rats treated with estradiol (OVX+E2). Intracerebroventricular (icv) ovine PRL (oPRL) selectively increased the activity of TIDA neuronal terminals in the ME at 30 and 60 minutes after injection and inhibited LH and PRL levels. We then evaluated whether dopaminergic blockade would impair the inhibitory effect of PRL on LH pulsatility in a model of acute hyperprolactinemia in female rats. An acute subcutaneous injection of oPRL was performed, preceded by the antagonists to dopamine receptor D2 (sulpiride) or D1 (SCH23390) in OVX+E2 rats. As expected, oPRL reduced the frequency and amplitude of the LH pulses and the mean LH. Sulpiride prevented the

reduction in pulse amplitude and mean LH by oPRL, while SCH23390 prevented the inhibition of pulse amplitude. Thus, taken together these results demonstrate that dopamine from TIDA neurons inhibits LH pulsatile secretion in physiological conditions and during hyperprolactinemia. These findings open a new perspective on the mechanism by which the PRL suppresses LH secretion and causes infertility.

Keywords: dopamine, prolactin, luteinizing hormone, hyperprolactinemia, infertility, DREADD.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Origem e projeções anatômicas dos neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos envolvidos no controle da secreção de PRL .....	28
<b>Figura 2</b> - Alça curta de retroalimentação negativa responsável pela regulação neuroendócrina da secreção de prolactina .....	31
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 1 .....	44
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 2 .....	45
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 3 .....	46
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 4 .....	47
<b>Figura 7</b> - Expressão seletiva de DREADDs em neurônios TIDA .....	65
<b>Figura 8</b> - Ativação de neurônios TIDA com CNO reduz a secreção plasmática de PRL em ratos TH-Cre .....	66
<b>Figura 9</b> - Ativação seletiva de neurônios TIDA reduz a amplitude dos pulsos de LH .....	67
<b>Figura 10</b> - Confirmação da efetividade da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA e seu efeito sobre a secreção de PRL .....	69
<b>Figura 11</b> - Expressão de kisspeptina no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) após lesão dos neurônios TIDA .....	71
<b>Figura 12</b> - Efeito da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA sobre a pulsatilidade de LH .....	72
<b>Figura 13</b> - Efeito da lesão dos neurônios TIDA sobre a morfologia ovariana e secreção de E2 e FSH .....	74

- Figura 14** - Atividade dos neurônios TIDA e secreção de PRL e LH em resposta à injeção aguda de PRL ..... 77
- Figura 15** - Atividade dopaminérgica na área pré-óptica (POA) e no núcleo caudado e putâmen (CPu) em resposta à injeção aguda de PRL ..... 78
- Figura 16** - Bloqueio dos receptores dopaminérgicos dos tipos 1 (D1R) e 2 (D2R) previne inibição da secreção pulsátil de LH pela PRL ..... 80
- Figura 17** - Mecanismo proposto para a ação inibitória da dopamina tuberoinfundibular sobre a secreção de LH ..... 96

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AAV** - vírus adeno-associado

**AMPc** - 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico

**ARC** - núcleo arqueado do hipotálamo

**AVPV** - núcleo anteroventral periventricular da área pré-óptica

**BSA**- albumina bovina

**CNO** - n-óxido clozapina

**cols.** - colaboradores

**CPu**- núcleo caudado e putâmen

**DAB** - 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloro

**DAT** - transportador de dopamina

**DOPAC** - ácido dihidroxifenilacético

**DREADDs** -

- Inglês: “*designer receptors exclusively activated by designer drugs*”
- Português: receptores projetados exclusivamente ativados por drogas projetadas

**D1R** - receptor para dopamina do tipo 1

**D2R** - receptor para dopamina do tipo 2

**ELISA** - do inglês “*enzyme-linked immunosorbent assay*”

**E2** - estradiol

**ER $\alpha$**  - receptor para estrógeno do tipo  $\alpha$

**FSH** - hormônio folículo estimulante

**GnRH** - hormônio liberador de gonadotrofinas

**GPCR** - receptor acoplado a proteína G

**HPG** - eixo hipotálamo-pituitária-gonadal

**HPLC-ED** - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica

**icv** - intracerebroventricular

**ip** - intraperitoneal

**im** - intramuscular

**KNDy**- kisspeptina, neurokinina B e dinorfina

**LH** - hormônio luteinizante

**ME** - eminência mediana

**min** - minutos

**NAT** - transportadores de noradrenalina

**NIL**- lobo neuro-intermediário da hipófise anterior

**OVX**- ovariectomizada

**OVX+E2** - ovariectomizada tratada com E2

**6-OHDA**- 6-hidroxidopamina

**oPRL** - PRL ovina

**PBS** - tampão fosfato-salina

**PBS-T** - tampão fosfato-salina acrescido de Tween-20

**PFA** - paraformaldeído

**PHDA** – periventricular hipofiseal dopaminérgico

**PIF**- fator inibidor de prolactina

**POA**- área pré-óptica

**PRF**- fator liberador de prolactina

**PRL** - prolactina

**PRL-R**- receptor para prolactina

**sc** - subcutâneo

**SF 0,9%** - solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%

**SNC** - sistema nervoso central

**STAT5** - transdutor de sinal e ativador de transcrição 5

**TIDA** - tuberoinfundibular dopaminérgico

**TH** - tirosina hidroxilase

**TH-Cre** - ratos geneticamente modificados que expressam cre recombinase sobre controle do promotor de tirosina hidroxilase

**THDA** - tuberohipofiseal dopaminérgico

**Veh** - veículo

**vs** - versus



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1. Regulação neuroendócrina da secreção do hormônio luteinizante (LH) e sua pulsatilidade .....	19
2. A importância da prolactina (PRL) para reprodução e a infertilidade induzida por hiperprolactinemia .....	24
3. O controle da secreção de PRL pela dopamina .....	27
4. O mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta entre PRL e dopamina .....	30
5. Interação entre neurônios TIDA, dopamina e a secreção de LH .....	32
6. Receptores projetados exclusivamente ativados por drogas projetadas (DREADDs) e seu uso na quimiogenética .....	35
7. A Neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) .....	37
8. Objetivos .....	40
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
1. Animais .....	42
2. Desenho Experimental .....	42
3. Drogas e anestésicos utilizados nos procedimentos cirúrgicos .....	47
4. Procedimentos cirúrgicos .....	49
5. Coleta seriada de sangue pela extremidade distal da cauda .....	52
6. ELISA para PRL, LH e FSH .....	53
7. ELISA para E2 .....	55
8. Histologia ovariana .....	55
9. Processamento dos cérebros para imunohistoquímica .....	56
10. Imunohistoquímica .....	57

11. HPLC-ED .....	60
12. Análise estatística .....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	62
Experimento 1: Efeito da ativação seletiva dos neurônios TIDA apor meio de DREADDs sobre a pulsatilidade do LH em ratos TH-Cre .....	63
Experimento 2: Efeito da lesão dos neurônios TIDA com 6-OHDA sobre a secreção pulsátil de LH e função ovariana em rata .....	68
Experimento 3: Efeito agudo da PRL sobre a atividade de neurônios dopaminérgicos e secreção de LH e PRL em ratas .....	75
Experimento 4: Envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito inibitório da PRL sobre a secreção pulsátil de LH em ratas .....	79
<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>CONCLUSÃO</b> .....	93
<b>MECANISMO PROPOSTO</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b>	

## **INTRODUÇÃO**

## **1. Regulação neuroendócrina da secreção do hormônio luteinizante (LH) e sua pulsatilidade**

O eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) é o pedestal da regulação endócrina das funções reprodutivas, e é composto por múltiplas alças de retroalimentação interconectadas. No controle mais alto desse eixo tem-se o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), um hormônio decapeptídeo sintetizado pelos neurônios GnRH hipotalâmicos e liberado no sistema vascular porta-hipofisário, na região da eminência mediana (ME), de modo a exercer o controle central da reprodução (1, 2). Em ratos, os neurônios GnRH apresentam seus corpos celulares distribuídos difusamente nas estruturas hipotalâmicas anteriores, mais precisamente entre a banda diagonal de Broca e a extensão rostral da área pré-óptica (POA) medial, enquanto o curso de suas projeções axônicas percorrem a área retroquiasmática, núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), e atingem a ME (3-5).

Na hipófise, o GnRH se liga ao receptor para o hormônio GnRH na superfície celular dos gonadotrofos, a fim de regular síntese e liberação do LH e do hormônio folículo estimulante (FSH), as gonadotrofinas. Assim, por meio de uma liberação pulsátil, o GnRH mantém a síntese e secreção de gonadotrofinas. As gonadotrofinas são secretadas na corrente sanguínea para agir nas gônadas de ambos sexos. Na mulher, é responsável pela foliculogênese, manutenção do corpo lúteo e síntese de hormônios ovarianos e, no homem, pela manutenção da espermatogênese e secreção de testosterona (6-8). Estudos tem mostrado que lentas frequências de pulsos, comuns após a ovulação, promovem a síntese de FSH. Por outro lado, rápida frequência de pulsos de GnRH (mais do que um pulso por hora), uma periodicidade comum da fase folicular, estimula, preferencialmente, a síntese de LH (9-12).

O LH é um hormônio glicoproteico heterodimérico, de extrema necessidade para as funções reprodutivas periféricas, tais como produção de gametas e dos hormônios esteroides pelas gônadas, em ambos os sexos (13). Além disso, é essencial para o

desenvolvimento puberal, uma vez que sua ausência culmina em hipogonadismo e infertilidade em ambos os sexos (14). Nos homens, promove a secreção de testosterona pelas células de Leydig, o que contribui para a maturação das células germinativas primordiais. Nas mulheres, estimula a ovulação, formação de corpo lúteo, síntese de estrogênio e progesterona nos ovários (15). Evidencia-se a importância do LH para reprodução quando se observa estudos em camundongos com deficiência isolada de LH e sem qualquer alteração nas concentrações de FSH. Nesses modelos, as fêmeas apresentam-se com hipogonadismo e concentrações plasmáticas reduzidas de estradiol (E2) e progesterona, enquanto os machos apresentam-se com diminuição de testículos, hipoplasia das células de Leydig, bloqueio de espermatogênese e redução dos níveis de testosterona (16-18).

A liberação de LH ocorre de duas maneiras distintas em fêmeas. A forma predominante é o padrão secretório episódico do hormônio, denominado secreção pulsátil de LH, a qual é decorrente da liberação pulsátil de GnRH e culmina em uma liberação igualmente pulsátil do LH (19-21). O segundo padrão de secreção trata-se do pico pré-ovulatório de LH, o qual ocorre em um período curto e delimitado, decorrente de alta concentração de E2 no final da fase folicular, sendo responsável por induzir a ovulação (22-26). Pico e pulso de LH são, portanto, eventos distintos sujeitos ao controle por retroalimentação positiva e negativa do E2, respectivamente. O controle neuroendócrino da pulsatilidade do LH configura-se como o principal objeto de estudo desta pesquisa.

A importância da pulsatilidade do LH para o controle neuroendócrino da reprodução foi estabelecida na década de 1970, quando, pela primeira vez, o padrão de secreção pulsátil do LH foi identificado (27), e, em seguida, ao se constatar a importância do GnRH para manutenção das concentrações de LH e FSH (19), ambas descobertas em *macaco rhesus*. A liberação pulsátil de GnRH foi confirmada 5 anos mais tarde, quando foi observado uma liberação episódica de GnRH nos vasos portais de ovelhas, estreitamente relacionada à secreção igualmente pulsátil de LH (1, 28).

Entre os mamíferos existe consistência no padrão de frequência de pulsos de LH no decorrer do ciclo ovariano. Em fêmeas, os pulsos de LH ocorrem em uma frequência aproximada de 1 pulso por hora, na fase folicular, e 1 pulso a cada três ou quatro horas, na fase lútea. Por outro lado, em machos ocorre a cada duas ou três horas (29). Maiores frequências de pulsos encontram-se em animais gonadectomizados, os quais apresentam pulsos entre 20 e 30 min (26, 30, 31). Ademais, uma vez que a secreção de LH ocorre em pulsos, é importante destacar que variáveis deste evento, como frequência e amplitude, são esperados (32, 33).

A regulação do LH pelo GnRH, a partir do hipotálamo, é sensível aos níveis circulantes dos hormônios sexuais, de modo que esses exercem influência inibitória sobre a pulsatilidade de LH. Sob esse aspecto, E2 e progesterona, em fêmeas, e testosterona, nos machos, exercem ações de retroalimentação negativa no sistema nervoso central e na hipófise e, desta forma, inibem a secreção de GnRH/LH por meio de um mecanismo de retroalimentação negativa (34, 35). Entretanto, os neurônios GnRH não apresentam receptor para estrógeno do tipo alfa (ER $\alpha$ ) ou receptor para progesterona (36, 37). Assim, em fêmeas, o envolvimento do E2 na manutenção das funções reprodutivas e fertilidade ocorre através de mecanismos indiretos, de forma que os receptores para os esteroides sexuais localizam-se em neurônios aferentes ao neurônio GnRH (38, 39). Nesse contexto, um dos principais neurônios com forte atuação no sistema reprodutivo através de vias aferentes para o neurônio GnRH é o neurônio produtor de kisspeptina.

A kisspeptina é um importante neuropeptídeo mediador da regulação neuroendócrina entre os neurônios GnRH e os hormônios sexuais e mostra-se essencial para puberdade em humanos (40, 41), além de ser um potente estimulador da secreção de LH nessa espécie (42-44). No campo da terapia para problemas relacionados à reprodução em humanos, a administração de kisspeptina-10, fragmento ativo de kisspeptina, em mulheres inférteis com amenorreia hipogonadotrófica induzida por hiperprolactinemia reestabeleceu as concentrações de FSH e pulsos de LH (45).

Adicionalmente, o importante papel da kisspeptina na reprodução também é observado em estudo com modelos animais. Além de apresentar o mesmo efeito estimulatório sobre a secreção de LH em diversas espécies, como ratos (46) e ovelhas (47), é considerada o mais potente estimulador da atividade neuronal de GnRH já identificado em camundongos (48, 49). Outros estudos em camundongos mostraram que a kisspeptina desempenha importante papel na fertilidade por meio da regulação da liberação de GnRH na indução do pico pré-ovulatório e ativação dos neurônios GnRH na puberdade (50). Ademais, a importância da kisspeptina para reprodução ficou evidenciada através de estudos em camundongos machos e fêmeas com mutação no gene *Kiss1*. Esses animais demonstraram baixas concentrações de LH, FSH e hormônios esteroides, bem como comprometimento de maturação sexual (51). Assim, atualmente, considera-se a kisspeptina como neuropeptídeo chave regulador das funções reprodutivas (52), o que a torna uma das principais vias sensíveis ao E2 investigada em hipóteses relacionadas ao controle neuroendócrino da reprodução .

Em roedores, os neurônios produtores de kisspeptina localizam-se no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) e no ARC (53, 54). Em relação ao pico pré-ovulatório de LH, a ativação dos neurônios GnRH ocorre através do envolvimento da população kisspeptina do AVPV (55-57) e fortes evidências indicam que esses neurônios o fazem via ativação de ER $\alpha$  (55). Por outro lado, a população de neurônios kisspeptina do ARC está mais diretamente relacionada ao padrão de secreção pulsátil de GnRH/LH (58-60), e foram denominados KNDy (61) porque co-expressam kisspeptina, neurocinina B e dinorfina em ratos (62), camundongos (63) e ovelhas (64). Desde a década de 1960, antes da constatação do inegável papel desempenhado pela kisspeptina na fertilidade, experimentos em ratos já demonstravam participação de neurônios localizados no hipotálamo médio basal, que contém o ARC, como mecanismo gerador de pulso de GnRH (65-67). Com a explosão de estudos na área, aventa-se o envolvimento dos neurônios KNDy como parte essencial do gerador de pulso de GnRH em ovelhas (68). Recentemente, um estudo em camundongos (69) demonstrou que os

neurônios KNDy apresentam sua atividade celular em sincronização com a liberação dos pulsos de LH, o que pode representar que essa população kisspeptinérgica do ARC seja o gerador de pulso de GnRH nessa espécie.

Adicionalmente, os neurônios GnRH são também regulados por inputs inibitórios, o que resulta em supressão do eixo HPG e conseqüentemente inibição da fertilidade. Sob esse aspecto, é reconhecido o papel inibitório da dopamina sobre a liberação de LH. Estudos demonstram efeito estimulatório de antagonistas dos receptores dopaminérgicos, principalmente os receptores do tipo 2 (D2R), sobre a secreção de LH em modelos animais (70-72) e em humanos (73). A ação inibitória direta da dopamina sobre a excitabilidade dos neurônios GnRH foi demonstrada mais recentemente em camundongos (74). Além disso, dados de um estudo de reconstrução anatômica de Herde & cols. (75) demonstraram que os neurônios GnRH de camundongos recebem conexões sinápticas ao longo de toda a extensão de suas projeções neurais em direção à ME, de modo a exibir uma morfologia bipolar diferenciada. Eles observaram que os neurônios GnRH apresentam uma zona dendrítica clássica próxima aos corpos celulares e uma projeção neuronal atípica em direção à ME, a qual apresenta capacidade mista de atuar como dendrito e axônio, denominada "dendron". Isto torna factível o recebimento de inputs sinápticos ao nível dos terminais GnRH na ME. De fato, Wang & cols. (76) demonstraram que a inibição quimiogénica dos dendrons *in vivo* foi capaz de afetar a secreção pulsátil de LH, enquanto similar inibição seletiva da região dendrítica proximal não desempenhou nenhum efeito sobre a pulsatilidade de LH. Somadas, essas recentes evidências apontam para a existência de novos mecanismos regulatórios da função dos neurônios GnRH, como por exemplo, uma ação inibitória da dopamina sobre a atividade dos terminais de neurônios GnRH na região da ME. Assim, neste projeto investigamos se a dopamina poderia ser responsável pela inibição da secreção pulsátil de LH em condições fisiológicas e durante uma hiperprolactinemia.



## **2. A importância da prolactina (PRL) para reprodução e a infertilidade induzida por hiperprolactinemia**

A PRL é um hormônio polipeptídico sintetizado pelos lactotrofos da hipófise anterior, os quais são tonicamente inibidos pela dopamina hipotalâmica (77). Em 1933, Riddle, Battes & Dykshorn (78) identificaram uma específica proteína hipofisária com função comum de secreção mamária em mamíferos, ação lactacional da qual originou sua nomenclatura. Contudo, atualmente a PRL é reconhecida por ser um hormônio pleiotrópico, o qual desempenha uma variedade de ações fisiológicas, além da lactação (79). Dentre a sua gama de funções, tem-se participação no balanço eletrolítico, crescimento e desenvolvimento, metabolismo, regulação imune e, em especial, destaca-se seu papel modulatório na reprodução e fertilidade, incluindo ação sobre o eixo HPG (79-81).

A investigação do envolvimento da PRL na reprodução teve seu início na década de 1970. Em roedores, dentre as principais contribuições da PRL para a viabilidade da reprodução, observa-se o breve e pronunciado pico de PRL que permeia as fases de proestro e estro (82), e o favorecimento da manutenção do corpo lúteo e consequente êxito da implantação (83). Seu envolvimento na reprodução é abrangente e está em constante descoberta, uma vez que, além de induzir diversas alterações fisiológicas no pós-parto (84), recentemente, constatou-se modulação de circuitos neurais relacionados ao estabelecimento do comportamento maternal pela PRL (85).

Contudo, de uma maneira inversa à sua contribuição positiva para reprodução, há muito sabe-se que no caso de altas concentrações de PRL, a exemplo do período de amamentação, observa-se amenorreia, inibição da ovulação e, conseqüentemente, infertilidade (86, 87). Ademais, da mesma forma que em mulheres, a hiperprolactinemia também causa infertilidade em homens (88, 89). Interessantemente, esse efeito dual da PRL sobre a reprodução configura-se em claro exemplo da alteração de uma importante função adaptativa corporal, como a que ocorre na hiperprolactinemia lactacional, para

uma de má adaptação em condição de desbalanço. Assim, observa-se que estados de hiperprolactinemia fisiológicos, como a lactação, são necessários e importantes para evitar a função reprodutiva e manter a demanda energética para qualidade da amamentação. Por outro lado, a ocorrência de uma hiperprolactinemia em outras circunstâncias pode representar perda de homeostase e má adaptação de funções corporais, quando a hiperprolactinemia ocorre devido a condições patológicas ou farmacológicas (79).

Acerca das causas da infertilidade induzida por hiperprolactinemia, é conhecido que durante uma alta concentração de PRL ocorre inibição da secreção de GnRH/LH (88, 90-93). Em diferentes espécies, a hiperprolactinemia causa redução da frequência e amplitude dos pulsos de LH, não somente em fêmeas mas também em machos (94-100), os quais podem ser restaurados através da normalização da concentração de PRL (101). Assim, apesar de não ser reconhecido o detalhamento do mecanismo, alta concentração de PRL culmina em hipogonadismo hipogonadotrófico por inibição da secreção pulsátil de GnRH (94, 102, 103), bem como parece inibir diretamente a função ovariana por redução de esteroidogênese (104). Apesar da PRL exercer efeitos reprodutivos por ação na hipófise e gônadas, as evidências apontam para a supressão da liberação do GnRH hipotalâmico como o cerne do seu efeito inibitório, visto que a reposição de GnRH pulsátil é suficiente para reversão da infertilidade induzida por hiperprolactinemia (94, 105-107). Assim, a reversão do quadro com a reposição de GnRH permite inferir sobre uma ação central da PRL, uma constatação que data do início dos anos 1980 quando já se observava redução da liberação de GnRH induzida por hiperprolactinemia por meio de aferições de GnRH no sangue porta-hipofisário (103, 108, 109). Contudo, apesar de ser central, não há clareza acerca do mecanismo exato pelo qual altas concentrações de PRL afetam a fertilidade, uma vez que os neurônios GnRH não expressam receptor para PRL (PRL-R) de maneira significativa (93, 110). Assim, acredita-se que a inibição dos neurônios GnRH induzida por hiperprolactinemia ocorra indiretamente, por ação da PRL em outros neurônios que sejam, ao mesmo

tempo, sensíveis à PRL e regulem os neurônios GnRH. Nessa perspectiva, acredita-se que a kisspeptina seja uma forte candidata a mediar o efeito. Embora em humanos ainda não seja descrito, foi identificada significativa expressão de PRL-R em neurônios kisspeptinérgicos do ARC e AVPV de ratos (110) e no ARC de ovelhas (111). Além disso, em modelos animais de indução de anovulação com injeção de PRL, a kisspeptina reestabelece a secreção de gonadotrofinas e ciclicidade ovariana (112). Adicionalmente, embora o tratamento com prolactina ative apenas 11% dos neurônios GnRH, e seja incapaz de alterar a atividade elétrica dos neurônios GnRH (113), a PRL foi capaz de induzir a fosforilação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 (STAT5), um marcador central de ativação de sinalização de PRL (110, 114), nas populações kisspeptinérgicas do ARC em ratos (115) e do AVPV e ARC em camundongos (114, 116).

Estudos prévios de nosso grupo demonstram que a kisspeptina também está envolvida no controle da secreção de PRL, pelo menos em parte, através da inibição dos neurônios TIDA (117-120). Dados de nosso grupo também demonstraram que a kisspeptina sofre inibição pela PRL em condições nas quais a PRL inibe o LH como lactação e hiperprolactinemia (115). Entretanto, o bloqueio da secreção de PRL com o agonista dopaminérgico bromocriptina não foi capaz de reverter a supressão da expressão de kisspeptina durante a lactação, sugerindo o envolvimento de outras vias não relacionadas à PRL (115). Usando modelo de hiperprolactinemia, recentemente Brown & cols. (116) demonstraram que os neurônios KNDy medeiam o efeito inibitório da PRL sobre a frequência de pulsos de LH em camundongos. Entretanto, este achado não exclui o envolvimento de outras vias neurais na inibição da secreção pulsátil de GnRH/LH pela PRL. É provável que outros neurônios hipotalâmicos estejam envolvidos no mecanismo pelo qual a hiperprolactinemia suprime a secreção de LH o qual ainda precisa ser melhor elucidado.

### 3. O controle da secreção de PRL pela dopamina

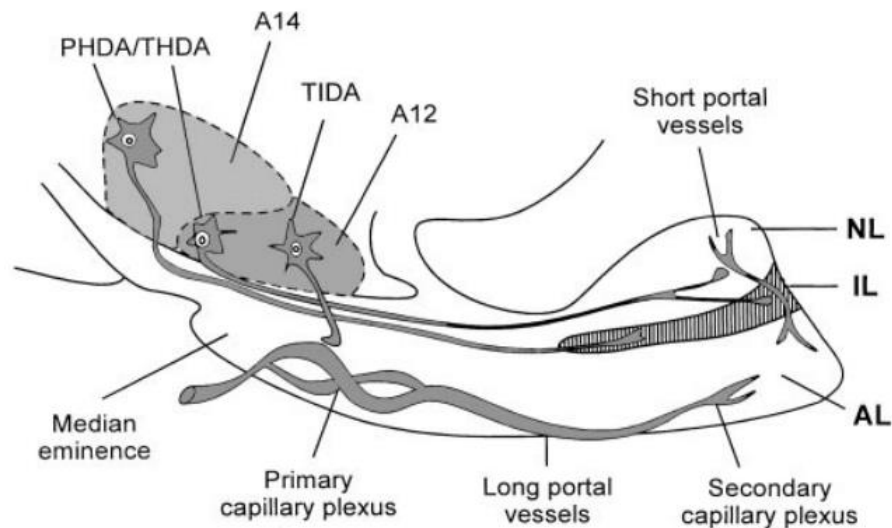
No passado, acreditou-se que a regulação da secreção da prolactina se daria por meio de um fator liberador de prolactina (PRF), similar aos demais hormônios hipofisários, que tem a secreção estimulada pelos hormônios hipotalâmicos. Contudo, a PRL foge à regra, e desde os anos 1950 já existiam evidências do hormônio estar sob uma regulação de caráter inibitório (79). Assim, nas décadas de 1970 e 1980 estudos mostravam que qualquer comprometimento da conexão hipotalâmica-hipofisária, a exemplo de secção da haste hipofisária ou lesão destrutiva do hipotálamo, tinha como resultante uma elevada concentração de PRL (121, 122). Dessa importante observação concluiu-se que um PRF não seria o principal regulador da secreção de PRL.

Ainda na década de 1950 foi também observado que estados de hiperprolactinemia eram um efeito colateral comum decorrente do uso de drogas antipsicóticas, da classe dos antagonistas para receptores dopaminérgicos (123-125). Anos mais tarde foi demonstrado que agonistas dopaminérgicos apresentavam o efeito de suprimir a secreção de PRL a partir de hipófise isolada de ratas (126) e que a dopamina de origem hipotalâmica apresentava importante papel na regulação funcional da hipófise anterior (127) até que, por fim, foi constatado o efeito inibitório da dopamina sobre a secreção de PRL, *in vivo* (128, 129). O conhecimento de papel crucial da dopamina na supressão endógena da PRL consolidou-se por meio da identificação de D2R nos lactotrofos da hipófise de ratos (130) e da observação de que camundongos sem o receptor eram hiperprolactinêmicos (131, 132). Desse modo, a dopamina é o principal fator inibidor de PRL (PIF) e principal regulador da secreção deste hormônio (77, 133-135).

A ação da dopamina é mediada por cinco tipos de receptores (D1, D2, D3, D4 e D5) categorizados em duas grandes famílias: tipo D1 (D1 e D5) e tipo D2 (D2, D3 e D4) (136). O receptor do tipo D1 (D1R) é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) estimulatória, Gs, que ativa a enzima adenilato ciclase e age como receptor pós-

sináptico excitatório. O D2R é um GPCR inibitório,  $G_i$ , e quando ativado inibe a adenilato ciclase, de modo a atuar como receptor pós-sináptico inibitório (137, 138).

Os neurônios dopaminérgicos que fazem o controle inibitório da secreção subdividem-se em três populações de acordo com a anatomia de suas projeções. Os primeiros a serem descobertos foram os neurônios dopaminérgicos tuberohipofisários (THDA), os quais surgem a partir do núcleo arqueado rostral e se projetam para os lobos neural e intermediário da hipófise (139, 140). Em seguida, identificou-se os neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA), com os corpos celulares localizados na porção dorsomedial do ARC e projeções para ME (141). Por fim, foram identificados os neurônios dopaminérgicos periventriculares hipofisários (PHDA), os quais surgem do núcleo periventricular e inervam exclusivamente o lobo intermediário (142). O controle inibitório da secreção da PRL por esses neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos é demonstrado de forma ilustrativa na figura a seguir.



**Figura 1: Origem e projeções anatômicas dos neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos envolvidos no controle da secreção de PRL.** Os neurônios TIDA originam-se na região A12 do núcleo arqueado dorsomedial. Eles apresentam axônios curtos que terminam na zona externa da eminência mediana (ME), próxima ao plexo capilar primário dos vasos portais. A dopamina tuberoinfundibular liberada é transportada pelos longos vasos portais até o lobo anterior (AL) da hipófise. Os neurônios THDA e PHDA possuem os corpos celulares na região do A12 e A14, respectivamente, e enviam projeções para os lobos neural (NL) e intermediário (IL) da hipófise. Os vasos portais curtos conectam o NL e o AL. Adaptado de Ben-Jonathan & Hnasko (138).

Devido aos neurônios TIDA liberarem a dopamina tuberoinfundibular na camada externa da ME no sistema porta-hipofisário, das três populações supracitadas eles são os maiores responsáveis pelo controle inibitório da secreção de PRL (141, 143-145). Nesse mecanismo, a dopamina tuberoinfundibular alcança a hipófise anterior por meio dos vasos portais longos e se liga ao D2R nos lactotrofos (146-149). Por outro lado, os neurônios THDA e PHDA contribuem para a regulação basal da secreção de PRL após o transporte da dopamina da neurohipófise para hipófise anterior através dos vasos portais curtos (150). Assim, os lactotrofos hipofisários estão sob constante inibição dopaminérgica neuroendócrina para manter a PRL em concentrações desejáveis (77). Além disso, por seu caráter robusto e inquestionável, o efeito inibitório da dopamina sobre a PRL é estudado sob diversos aspectos, e inclusive utilizado terapeuticamente na clínica médica (151). Nesse contexto, a utilização de agonistas dopaminérgicos no tratamento de prolactinomas e adenomas de hipófise produtores de prolactina mostram-se efetivos em suprimir a secreção de PRL na maioria dos pacientes (152, 153). Ademais, além do efeito direto sobre a secreção de PRL, a dopamina ainda suprime a enzima adenilato ciclase, o que culmina em redução da expressão gênica de PRL (154, 155), bem como é capaz de regular a proliferação de lactotrofos em cultura de células da hipófise (156). Assim, embora exista a influência dos próprios lactotrofos, por meio de regulação autócrina e parácrina, o principal mecanismo regulador ocorre por meio de D2R, especialmente a isoforma longa, a qual diminui a transcrição e secreção de PRL e é responsável por reduzir a proliferação dos lactotrofos (138).

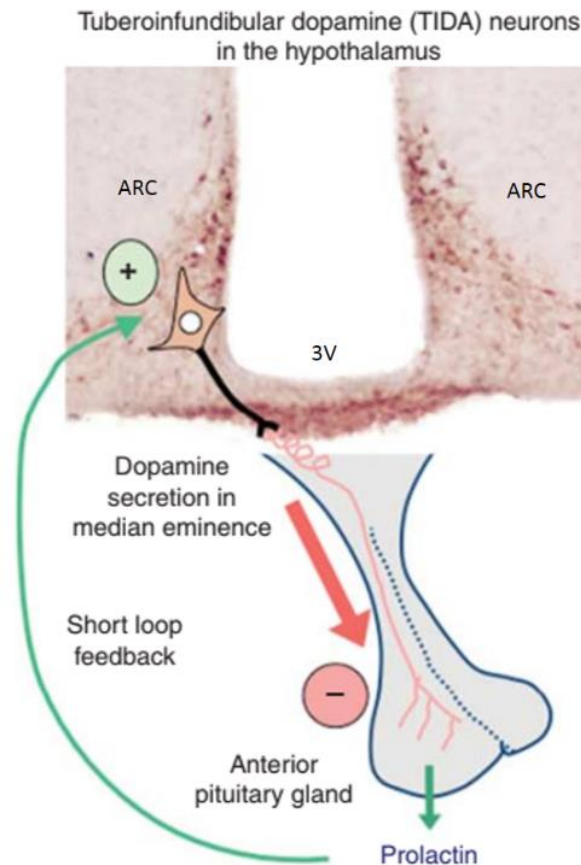
Em relação aos PRFs, atualmente considera-se que associado ao efeito majoritariamente inibitório exercido pela dopamina, ao invés da existência de um único PRF, tem-se diferentes fatores liberadores circunstanciais de PRL, os quais a estimulam em condições específicas (157), a exemplo do hormônio liberador de tireotrofina (158, 159), ocitocina (160, 161) e vasopressina (162, 163).

Quanto aos estímulos à secreção de PRL, observa-se e o estresse (164), a sucção do mamilo durante a lactação (165) e níveis aumentados de esteroides ovarianos (166).

Acerca dos esteroides sexuais, é sabido que os neurônios TIDA expressam ER $\alpha$  e receptores para progesterona, os quais são responsáveis pela ação central dos esteroides ovarianos na secreção de PRL (118, 167). Dentre esses fatores, sem dúvida o E2 é um dos mais importantes. O E2 apresenta efeito estimulatório sobre a secreção de PRL por meio de uma via clássica genômica, na qual regula a expressão gênica da PRL (168) e o aumento do número dos lactotrofos (169-171). Adicionalmente, o E2 diminui tanto a expressão como a atividade da tirosina hidroxilase (TH) (138, 172), a enzima limitante para biossíntese de dopamina (173). Ademais, dada a relevância da kisspeptina para reprodução, é importante destacar que, de uma maneira dependente do E2, esse neuropeptídeo estimula a liberação de PRL também por meio da inibição de neurônios TIDA e consequente redução da liberação de dopamina (174).

#### **4. O mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta entre PRL e dopamina**

A PRL não apresenta um órgão alvo específico, o que resulta na ausência de um clássico hormônio regulador por retroalimentação, como ocorre com os demais hormônios da hipófise anterior. Entretanto, a forma de regulação deste eixo é também negativa, porém, a própria PRL é o sinal aferente do mecanismo através de sua ligação aos PRL-R localizados nos neurônios TIDA (175, 176). Esse mecanismo de retroalimentação negativa entre a PRL e a dopamina proveniente dos neurônios TIDA pode ser observado na figura 2 a seguir.



**Figura 2: Alça curta de retroalimentação negativa responsável pela regulação neuroendócrina da secreção de PRL.** A liberação de PRL pela hipófise anterior é inibida pela dopamina proveniente dos neurônios TIDA (demonstrado na seção coronal por meio de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase [TH], em marrom). Os corpos celulares dos neurônios TIDA são encontrados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), com projeções axônicas direcionadas para camada externa da eminência mediana (ME). 3V, terceiro ventrículo. Adaptado de Grattan (79).

Embasado no fato de que a origem da PRL que atua nos neurônios TIDA é hipofisária, e que a administração sistêmica de PRL ativa neurônios hipotalâmicos (177, 178), uma consideração importante a ser feita acerca desse mecanismo é a forma como a PRL atravessa a barreira hematoencefálica, visto que ela é um hormônio polipeptídico com dimensão relativamente grande (aproximadamente 21 KDa). A esse respeito, desde a década de 1980 evidências apontavam para um sistema de transporte mediado por transportador saturável (179). Entretanto, recentemente foi visto que o transporte de PRL para o cérebro é independente do receptor de prolactina em camundongos, uma vez que ocorreu normalmente em camundongos sem expressão de PRL-R (180).



Portanto, o preciso mecanismo pelo qual a PRL alcança os neurônios TIDA ainda é carente de elucidação.

No que diz respeito à identificação do mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta, desde a década de 1990 estudos neuroquímicos mostravam que após uma administração de PRL observava-se três respostas: 1) estímulo à síntese de dopamina (181) e turnover no hipotálamo (182, 183); 2) aumento do metabolismo da dopamina na ME (175); e 3) aumento da secreção de dopamina nos vasos portais (184). Isso mais tarde veio a ser corroborado pela identificação dos PRL-R nos neurônios dopaminérgicos (148, 185, 186). Através dos parâmetros de atividade dopaminérgica supracitados foi possível perceber que o curso de tempo de ação da PRL apresenta um componente rápido, com aumento da atividade entre duas e quatro horas após PRL exógena (176), e um componente tardio, observado em torno de doze horas após o tratamento com a PRL (187). No entanto, é importante ressaltar que devido a estudos posteriores demonstrarem registros eletrofisiológicos com ações ainda mais rápidas da PRL na atividade elétrica dos neurônios TIDA, em ratos (188) e camundongos (113, 189), atualmente acredita-se na existência de vários mecanismos de ação da prolactina sobre os neurônios dopaminérgicos, os quais seriam mediados em diferentes cursos de tempo. Assim, neste projeto investigamos também se a rápida ativação de neurônios dopaminérgicos pela PRL seria temporalmente coerente com a inibição da secreção pulsátil de LH em condições de alta concentração de PRL central.

## **5. Interação entre neurônios TIDA, dopamina e a secreção de LH**

Em meados da década de 1970, antes mesmo de ser estabelecido que a dopamina seria o principal PIF (190), iniciaram discussões acerca do envolvimento da dopamina e outras catecolaminas no controle da secreção de GnRH/LH. Mais precisamente em 1978, por meio de uma investigação anatômica com ratos Sprague-Dawley, McNeill & Sladek (191) trouxeram a ideia na qual a dopamina poderia afetar

tanto a liberação de hormônios da pituitária anterior quanto do hormônio hipotalâmico GnRH. No referido estudo, eles observaram a presença simultânea de dopamina e do hormônio GnRH na ME, o que culminou no conceito de uma potencial regulação inibitória axo-axônica entre os mesmos, uma vez que já havia sido identificado projeções dos neurônios TIDA na camada externa da ME (143). Ademais, estudos de rastreamento retrógrado também demonstraram que entre 50% e 70% dos neurônios GnRH de ratos projetavam-se para a região da ME (4, 192), tornando assim factível a interação entre os neurônios TIDA e GnRH. Em relação à interações entre neurônios GnRH e dopaminérgicos, ainda na década de 1980, estudos demonstraram conexões sinápticas entre terminais dopaminérgicos e axônios de GnRH na ME de ovelhas (193) e POA de ratos (194), região onde encontram-se os corpos de GnRH. Nos anos 1990, um estudo em ratos mostrou que neurônios TH positivos projetam-se para os corpos celulares de GnRH na POA de ratas (195) e, mais recentemente, Clarkson & cols. (196) quantificaram que um quarto dos corpos de GnRH de camundongos exibem justaposição com fibras TH positivas.

Em outras espécies, estudos acerca do envolvimento da dopamina na reprodução apresentam-se em maior número, o que resultou em uma gama de achados importantes. Em sapos, a combinação do análogo de GnRH (des-Gly10, D-Ala6, Pro9-GnRH-ethylamide) com metoclopramida ou domperidona, ambos antagonistas para receptor de dopamina, são efetivos em induzir desova (197). Em rãs da espécie *Rana temporaria*, o tratamento *in vivo* com o agonista de D2R, bromocriptina, foi capaz de inibir a liberação de LH e ovulação (198), enquanto que o tratamento a longo prazo com um implante contendo o antagonista, metoclopramida, induziu ovulação. Nesses anfíbios, além do controle da liberação de LH pela pituitária, tem sido hipotetizado que a dopamina pode ter um papel peculiar e adicional na reprodução relacionado à modulação das vocalizações sexuais. A esse respeito, foi visto que a ativação de D2R apresenta efeito inibitório sobre a vocalização, um evento relacionado à reprodução dos anfíbios (199). Em peixes, além dos neurônios dopaminérgicos e a liberação de

dopamina estarem envolvidos no efeito inibitório do estresse sobre o eixo reprodutivo (200), recentemente foi observado que a remoção da inibição dopaminérgica, via D2R, é capaz de estimular a síntese e liberação de GnRH/ LH, bem como reativar a função ovariana (201). Por fim, de maneira a evidenciar o potencial envolvimento da dopamina na reprodução, em peixes teleósteos foi visto que a expressão de D2R parece estar relacionada ao papel inibitório da dopamina ao longo do ciclo reprodutivo (202), bem como a dopamina foi considerada a principal substância inibitória para reprodução (203). Sob esse aspecto, Dufour & cols. (203) demonstram que o GnRH e dopamina formam um controle neuroendócrino dual da reprodução, na medida em que o GnRH e dopamina estimulam e inibem os gonadotrofos, respectivamente, a fim de manter a homeostase das funções reprodutivas.

Para além dos estudos supracitados nas espécies mencionadas, já foi visto que a dopamina ou a atividade do sistema dopaminérgico apresentaram efeito inibitório sobre a secreção de LH *in vitro* (204), em ratas (205-208) e em mulheres (209-211). E, de maneira inversa, estudos *in vivo* demonstraram efeito estimulatório de antagonistas de receptores dopaminérgicos sobre a secreção de LH, sobretudo o D2R, em modelos animais (70-72) e em humanos (73). Entretanto, existem algumas controvérsias acerca da participação da dopamina nesse mecanismo, tanto *in vitro*, como *in vivo*. A esse respeito, também foi observada: indução de liberação de GnRH pela dopamina *in vitro* (212-214); ausência de efeito do agonista dopaminérgico bromocriptina sobre secreção de GnRH *in vitro* (212) e sobre a secreção de LH *in vitro* (215) e em mulheres (210); bem como um efeito estimulatório da PRL sobre a liberação de LH, em concentrações hiperprolactinêmicas *in vitro* (216). Somadas, essas evidências reforçam a necessidade de maiores investigações acerca do envolvimento da dopamina e neurônios dopaminérgicos na regulação da secreção de GnRH/LH.

Diante do exposto, nós aventamos que a dopamina liberada pelos neurônios TIDA na ME possa estar envolvida na inibição da secreção de LH durante estados de hiperprolactinemia, e embasamos nossa hipótese em quatro evidências científicas, das

quais duas são importantes achados da última década. Primeiramente, devido a um consolidado conceito de que durante uma hiperprolactinemia primária observa-se liberação de dopamina, em associação ao fato de que os neurônios TIDA liberam a dopamina responsável pelo mecanismo de retroalimentação negativa do controle da secreção PRL (175, 176). Em segundo, porque os neurônios GnRH não apresentam receptores para PRL de maneira significativa (93, 110), o que torna necessário uma via transináptica que justifique o efeito inibitório da PRL nesses neurônios. Em terceiro, devido a dados de um estudo realizado em camundongos machos e fêmeas, no qual a dopamina mostrou-se como um potente inibidor direto da excitabilidade dos neurônios GnRH (74). E, por fim, devido à possibilidade dos dendrons de GnRH receberem inputs sinápticos na região da ME (75). Assim, fundamentado nessas evidências de interação entre os neurônios GnRH e TIDA e a consolidada estreita relação entre a dopamina a PRL, parece provável uma ação direta da dopamina sobre a regulação da liberação de LH. Desse modo, no presente estudo, investigamos o possível papel dos neurônios TIDA e da dopamina tuberoinfundibular na inibição da secreção pulsátil de LH, tanto no mecanismo fisiológico do controle de sua secreção como em condição experimental de hiperprolactinemia.

## **6. Receptores projetados exclusivamente ativados por drogas projetadas (DREADDs) e seu uso na quimiogenética**

Uma variedade de classes de proteínas, tais como quinases, enzimas não quinase, GPCRs e canais iônicos controlados por ligante foram geneticamente modificados para uso na quimiogenética (217). Das supracitadas, a mais amplamente utilizada atualmente tem sido os DREADDs, os quais são do tipo GPCR (218). Os DREADDs são receptores muscarínicos humanos mutados estimulatórios (hM3Dq) ou inibitórios (hM4Di) que perderam a capacidade de ser ativados por acetilcolina ou outros neurotransmissores endógenos, mas são exclusivamente ativados por um ligante

exógeno inerte e metabólito inativo da clozapina, a N-óxido clozapina (CNO). Quando ativado pelo CNO, o receptor hM3Dq ativa a cascata de sinalização da fosfolipase C, o que resulta em alteração de cálcio intracelular e conseguinte ativação neuronal, ou seja, uma versão projetada do receptor muscarínico M3. Por outro lado, após ligação da CNO ao receptor hM4Di ocorre hiperpolarização da membrana, conseguinte diminuição na sinalização do 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC) e aumento da ativação dos canais de potássio, de modo a produzir supressão temporária da atividade neuronal (218, 219). Ainda sobre a atuação desse ligante sintético nos DREADDs, é sabido que a CNO não atravessa a barreira hemato-encefálica, e, portanto, sua atuação é mediada pela forma convertida, clozapina, a qual apresenta afinidade preferencial de ligação por DREADDs em relação a outros sítios endógenos. Assim, em práticas experimentais com injeção sistêmica de CNO, a clozapina convertida entra prontamente no cérebro e ocupa os DREADDs expressos no sistema nervoso central (220) de modo a ativá-los de maneira seletiva e reversível (221).

Devido à algumas vantagens, atualmente a tecnologia quimiogenética DREADD é amplamente utilizada com o intuito de manipular a atividade neuronal em animais que se movem livremente (222). Enquanto modelos de lesões químicas ou elétricas alcançam perda de função permanente, a tecnologia DREADD permite intervenções neuronais transitórias e repetíveis mediante a aplicação dos ligantes (223). Assim, após introdução no tecido neural por meio de estratégias de transferência de genes, esses receptores irão permitir a manipulação dos sistemas cerebrais como um “controle remoto” da atividade neural (219). Quando comparado à outras tecnologias inovadoras de objetivo comum como optogenética, os DREADDs oferecem duas vantagens adicionais: a primeira é o fato de não utilizar um método invasivo durante sua utilização, e a segunda, a maneira mais natural com a qual atua sobre a atividade cerebral, muito embora não tenha a precisão temporal da optogenética (223). Acerca do uso de diferentes doses e sua relação com a resposta neural observada em procedimentos com DREADDs em ratos, Vazey & Aston-Jones (224) demonstraram que o efeito observado

na taxa de disparo não sofreu variação com diferentes doses de 0.1 mg/kg ou 10 mg/kg de CNO. Ademais, no que diz respeito ao percentual de expressão de DREADDs após transfecção de vetor viral, é esperado a existência de um percentual de neurônios da região-alvo sem ou com baixa expressão de receptores. Sob esse aspecto, Smith & cols. (223) estimaram que o uso de vetores virais para introduzir receptores DREADDs nas células-alvo alcance um nível de penetrância em torno de dois terços da população neuronal, similar ao observado no estudo *in vivo* com camundongos (225), o qual demonstrou um registro de 60% de inibição de células do córtex orbitofrontal após o uso de CNO em um modelo com DREADD inibitório.

Assim, nesta pesquisa induzimos a expressão de um DREADD estimulatório através da injeção de um vírus adeno-associado (AAV) expressando um hM3Dq cre-dependente no ARC de ratos transgênicos TH-Cre (TH-Cre), modelo animal geneticamente modificado recentemente utilizado em um estudo sobre a plasticidade morfológica dos neurônios TIDA (226). Esses ratos expressam a enzima Cre-recombinase sob o controle do promotor do gene para a enzima TH, o que nos permitiu ativar seletiva e transitoriamente os neurônios TIDA do ARC nesse modelo animal.

## **7. A neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA)**

Um dos primeiros agentes químicos identificado com efeito neurotóxico específico para o sistema catecolaminérgicos foi a 6-OHDA (227). Ela é considerada uma neurotoxina clássica utilizada no estudo da doença de Parkinson, através de modelos de degeneração de projeções catecolaminérgicas centrais, incluindo o sistema nigroestriatal, *in vivo* e *in vitro* (228, 229). Os seus efeitos neurotóxicos foram inicialmente descritos por Porter, Totaro e Stone (230) quando foi demonstrado uma eficiente e duradoura depleção noradrenérgica na inervação simpática do coração após seu uso.

A 6-OHDA é um análogo hidroxilado do neurotransmissor natural dopamina com toxicidade relativamente seletiva para neurônios monoaminérgicos. Assim, a administração da 6-OHDA em núcleos cerebrais resultam em preferencial recaptção por transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NAT) e culmina em destruição rápida e seletiva de neurônios catecolaminérgicos. Assim, quando utilizada para lesão de célula dopaminérgica, a neurotoxicidade é dependente de sua captação do espaço extracelular (pelo transportador DAT) para o interior celular, a fim de comprometer função celular e produzir dano neuronal (231, 232). Interessantemente, embora existam algumas evidências de que a 6-OHDA pode destruir terminais nervosos adrenérgicos após injeção sistêmica (233, 234), ela é considerada uma droga que não atravessa a barreira hemato-encefálica e, portanto, requer injeção estereotáxica para ação intracerebral (235).

Dentro dos neurônios, após recaptção pelos transportadores, a 6-OHDA acumula no citosol e promove morte celular sem características apoptóticas (236) através da degeneração dos terminais axônicos pelo desenvolvimento de citolisossomos autofágicos (237). A toxicidade relaciona-se com o estresse oxidativo, de modo que o mecanismo de ação de degeneração neuronal envolve a geração de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (227).

Devido ao grande número de estudos que utilizaram a 6-OHDA com o intuito de induzir modelos de doença de Parkinson, é conhecido o tempo de ação necessário após injeção no trato nigroestriatal. Nesses casos, os neurônios começam a sofrer degeneração após 24 horas, seguido de depleção dopaminérgica dois a três dias depois (238). Entretanto, a magnitude da lesão é dependente do conteúdo de 6-OHDA injetado, do sítio de injeção, bem como de diferenças inerentes à sensibilidade entre diferentes espécies (239). Desse modo, há também relato de injeção de 6-OHDA no sistema nigroestriatal que produziu lenta degeneração retrógrada por um período de semanas, com redução dopaminérgica variável entre 80-90% (240). Assim, embasado no mecanismo de ação da 6-OHDA supracitado, e no fato de que a 6-OHDA apresenta

efetiva toxicidade para neurônios dopaminérgicos em ratos, gatos e primatas (241), neste estudo utilizamos injeção estereotáxica de 6-OHDA no ARC de ratas, com o intuito de induzir lesão seletiva de neurônios TIDA.



## 8. Objetivos

Investigar o envolvimento dos neurônios TIDA e da dopamina tuberoinfundibular na ação inibitória da PRL sobre secreção pulsátil de LH em situações fisiológicas e de hiperprolactinemia.

### 8.1. Objetivos específicos

- I. Determinar o efeito da ativação seletiva dos neurônios TIDA sobre a pulsatilidade de LH em ratos TH-Cre, por meio do uso de DREADDs.
- II. Investigar o efeito da lesão dos neurônios TIDA com 6-OHDA sobre a pulsatilidade de LH e parâmetros de fertilidade em ratas Wistar.
- III. Investigar a atividade dopaminérgica em resposta ao tratamento agudo com PRL ovina (oPRL) em ratas Wistar.
- IV. Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 na ação inibitória da PRL sobre a secreção pulsátil de LH em ratas Wistar.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1. Animais

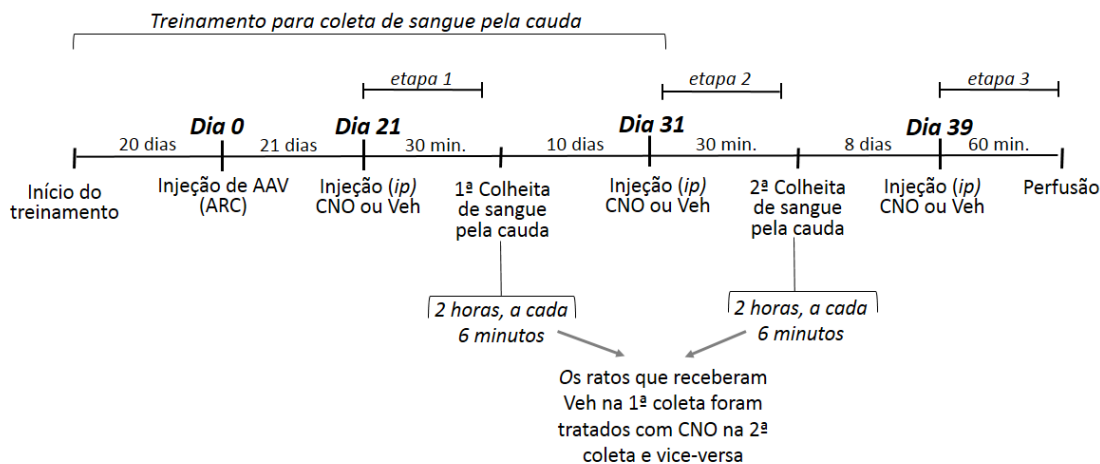
Para realização do experimento 1, foram utilizados ratos transgênicos TH-Cre machos adultos, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 450 g a 650 g. Os ratos TH-Cre da linhagem *Long Evans* expressam a enzima cre-recombinase sob o controle do promotor do gene para TH (242). Esses animais foram obtidos da Universidade de Stanford, Califórnia, EUA e criados na Unidade de Recursos Animais Taieri na Universidade de Otago (Dunedin, Nova Zelândia), mais precisamente no departamento de Anatomia (*Department of Anatomy/ University of Otago*). Os ratos foram mantidos em grupos de 2 ou 3 por caixa, com água e ração *ad libitum*, em um ambiente com condições controladas de temperatura e luz (temperatura:  $22 \pm 1$  °C; luzes acesas entre 6:00 horas e 18:00 horas). Procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade de Otago (*University of Otago Animal Ethics Committee*).

Para realização dos experimentos 2, 3 e 4 foram utilizadas ratas Wistar fêmeas provenientes do centro de bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO/UFMG), com 2 a 3 meses de idade e peso aproximado entre 250 g e 300 g. As ratas foram mantidas em grupos de 3 ou 4 animais por caixa, com água e ração *ad libitum* em um ambiente controlado (temperatura:  $22 \pm 2$  °C; luzes acesas entre 7:00 horas e 19:00 horas). Todos os procedimentos experimentais realizados no Brasil (experimentos 2, 3 e 4) estiveram de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG; protocolo nº 43/2016, aprovação em 21 de junho de 2016).

## 2. Desenho Experimental

### *Experimento 1: Efeito da ativação seletiva dos neurônios TIDA por meio de DREADDs sobre a pulsatilidade de LH em ratos TH-Cre*

Com o intuito de investigar as ações específicas da ativação dos neurônios TIDA sobre a pulsatilidade de LH, induzimos a expressão cre-dependente de DREADDs nos neurônios TIDA de ratos TH-Cre (218), através de injeção bilateral com 1  $\mu$ L de AAV ( $2.6 \times 10^{13}$  GC/mL) no ARC. O vetor viral codificava a sequência de expressão para um receptor muscarínico estimulatório modificado “hm3Dq” acoplado a uma proteína fluorescente “mCherry” (AAV2-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry) (217). A detecção da proteína mCherry possibilitou a visualização dos neurônios que efetivamente expressaram DREADDs em neurônios TH do ARC. Após três semanas da transfecção viral, os animais receberam CNO (3 mg/kg) por via intraperitoneal (ip) para ativar os DREADDs expressos nos neurônios TIDA, em três etapas distintas. Na etapa 1 (21 dias após a transfecção viral), os ratos foram injetados com CNO ou veículo (Veh) às 9:00 h. Após 30 minutos (min), um volume de 10  $\mu$ L de sangue foi coletado a cada seis min durante 2 h, para posteriores dosagens de LH e PRL por ELISA. Após 10 dias, realizou-se a etapa 2, na qual o experimento foi repetido, porém os ratos que tinham recebido CNO na etapa 1 receberam Veh na etapa 2, e vice-versa. Na terceira etapa, 8 dias após a segunda etapa, metade dos animais receberam Veh e a outra metade CNO e após 60 min, os cérebros foram fixados por perfusão transcardíaca para avaliar dupla marcação por imunofluorescência para TH e mCherry no ARC e dupla marcação por imunoperoxidase para mCherry e c-Fos. Ao final, obtivemos um n experimental de 4 ratos. Os procedimentos descritos podem ser visualizados em formato de esquema, na figura 3 a seguir.

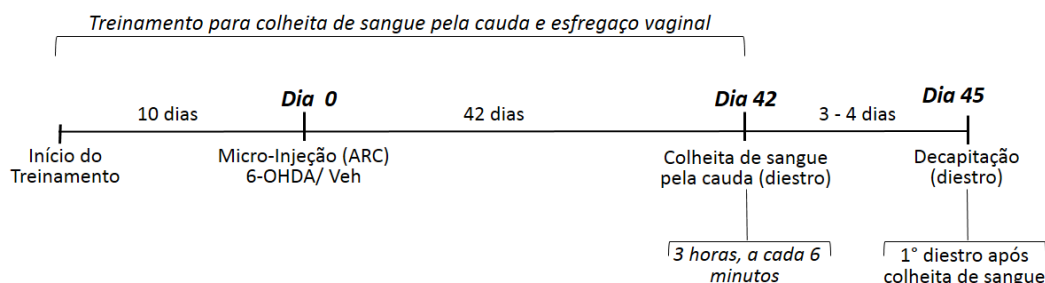


**Figura 3:** Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 1.

*Experimento 2: Efeito da lesão dos neurônios TIDA com 6-OHDA sobre a secreção pulsátil de LH e função ovariana em ratas*

Com o objetivo de investigar um papel fisiológico dos neurônios TIDA sobre o controle da secreção pulsátil de LH em ratas, neste experimento realizamos ablação seletiva desses neurônios com a neurotoxina 6-OHDA. Para tanto, ratas com, no mínimo, 5 ciclos regulares consecutivos foram submetidas à estereotaxia e receberam 4 microinjeções de 6-OHDA (16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; grupo 6-OHDA,  $n = 6$ ) ou Veh (grupo Veh,  $n = 6$ ) no ARC. Quarenta e dois dias após a cirurgia estereotáxica, na fase de diestro do ciclo estral, realizou-se coleta seriada de sangue pela cauda, 10  $\mu\text{L}$  de sangue a cada 6 min das 9:00 h às 12:00 h, a fim de avaliarmos os parâmetros de secreção pulsátil de LH pelo método ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). No primeiro diestro após a coleta seriada de sangue, as ratas foram decapitadas e o plasma utilizado para dosagem de PRL, FSH e E2 por ELISA. Cérebros e ovários foram dissecados e fixados por imersão a fim de avaliar, por imunohistoquímica, a expressão de TH e kisspeptina no ARC. Devido à formação de um corpo lúteo ser indicativo de ovulação (243, 244), realizou-se histologia dos ovários para contagem de folículos atresicos e de corpos lúteos, a fim de proceder análise como um parâmetro de fertilidade embasado na função ovariana. Esfregaço vaginal foi realizado antes e após cirurgia estereotáxica

para avaliação do ciclo estral. Os procedimentos descritos podem ser visualizados em formato de esquema, na figura 4 a seguir.

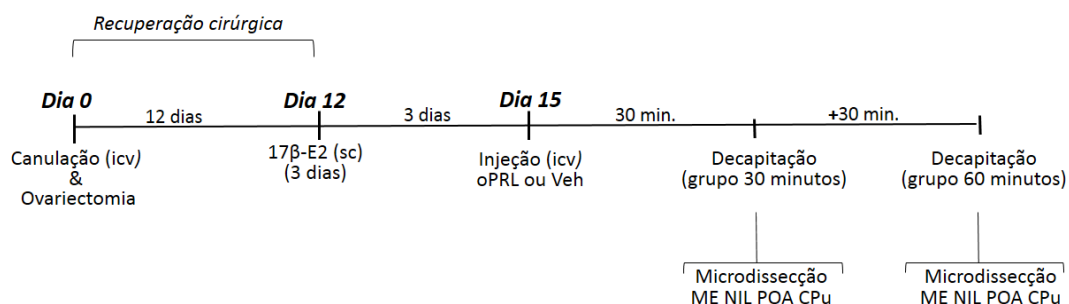


**Figura 4:** Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 2.

### *Experimento 3: Efeito agudo da PRL sobre a atividade de neurônios dopaminérgicos e secreção de LH e PRL em ratas*

Neste experimento avaliamos em quais regiões cerebrais a administração aguda de oPRL seria capaz de promover uma rápida ativação dopaminérgica e se esse efeito estaria correlacionado a alterações nas secreções de PRL e LH. Para tanto, ratas Wistar foram submetidas à cirurgia de implante de cânula guia no ventrículo lateral direito e à ovariectomia. Doze dias após a cirurgia, as ratas ovariectomizadas (OVX) receberam tratamento com  $17\beta$ -E2 subcutâneo (sc) (OVX+E2; 4  $\mu$ g/kg/dia) durante 3 dias consecutivos (35). Usamos o modelo OVX+E2 porque potencializa o efeito inibitório da PRL sobre a secreção pulsátil de LH, como demonstrado no artigo de Silva & cols. supracitado. No dia seguinte ao término do tratamento com E2, parte das ratas receberam injeção icv de oPRL (0.5  $\mu$ g/injeção, grupo oPRL, n = 8) ou Veh (grupo Veh, n = 8) e foi decapitada após 30 min, enquanto a outra parte foi decapitada após 60 min da injeção de oPRL (grupo oPRL, n = 8) ou Veh (grupo Veh, n = 8). A concentração utilizada de oPRL foi embasada em estudo prévio (245). ME, POA, lobo neurointermediário da hipófise (NIL) e núcleo caudado e putâmen (CPU) foram microdissecados e congelados para dosagens de dopamina e do ácido 3,4-

diidroxifenilacético (DOPAC) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED). Os procedimentos descritos podem ser visualizados em formato de esquema, na figura 5 a seguir.

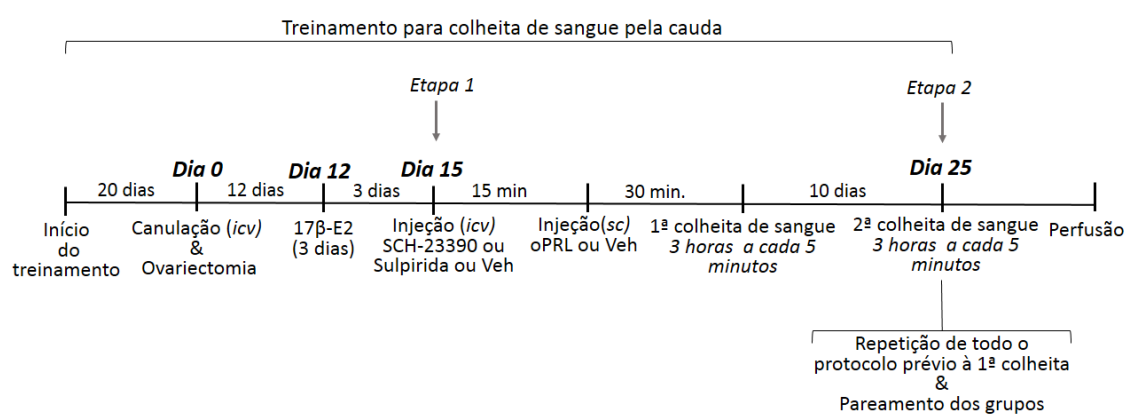


**Figura 5:** Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 3.

*Experimento 4: Envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito inibitório da PRL sobre a secreção pulsátil de LH em ratas*

A fim de investigar a participação dos receptores dopaminérgicos D1R e D2R no efeito inibitório da PRL sobre a secreção pulsátil de LH, analisamos se a ação inibitória da PRL poderia ser prevenida por meio do bloqueio desses receptores no SNC. Para tanto, ratas Wistar foram submetidas à cirurgia de implante de cânula icv e à ovariectomia. Doze dias após a cirurgia, as ratas OVX foram tratadas com 17β-E2 (4 µg/kg/dia, sc), durante três dias consecutivos. No dia seguinte, um volume de 10 µL de sangue foi coletado cada 5 min das 9:00 h às 12:00 h, por meio de um pequeno corte na extremidade distal da cauda, a fim de dosar LH por ELISA. Trinta min antes do início da coleta de sangue, as ratas receberam injeções sc de oPRL (6 mg/kg) ou Veh. Quinze min antes da administração de oPRL ou Veh, os animais receberam injeção icv de sulpirida (antagonista D2R), SCH-23390 (antagonista D1R), ou Veh. Assim, com o delineamento experimental descrito, formaram-se 6 grupos experimentais de acordo com as drogas que as ratas receberam pelas vias sc e icv: 1) Veh (n = 10); 2) Sulpirida (n = 10); 3) SCH-23390 (n = 7); 4) oPRL (n = 10); 5) oPRL+Sulpirida (n = 10); 6)

oPRL+SCH-23390 (n = 7). Dez dias após a coleta seriada de sangue da etapa 1, foi realizada a etapa 2, na qual o experimento foi repetido, porém os animais que receberam uma combinação de drogas (icv e sc) na primeira etapa, receberam então a combinação oposta na etapa 2, e vice-versa, de modo a formar um pareamento entre grupos. O pareamento foi realizado dentro das 3 categorias de grupos experimentais (Veh, Sulpirida e SCH-23390) com e sem oPRL (pareamento 1: Veh e oPRL; pareamento 2: Sulpirida e oPRL+Sulpirida; pareamento 3: SCH-23390 e oPRL+SCH-23390).



**Figura 6:** Representação esquemática referente ao protocolo do experimento 4.

### 3. Drogas e anestésicos utilizados nos procedimentos cirúrgicos

A anestesia para cirurgia estereotáxica com fins de injeção de AAV, no experimento 1, foi realizada com o anestésico isoflurano (taxa de indução: 5%, fluxo de O<sub>2</sub> a 1 L/min; taxa de manutenção: 3%, fluxo de O<sub>2</sub> a 0.6 L/min). Cada injeção bilateral de vírus estimulatório (2.6 × 10<sup>13</sup> GC/ml, intra-ARC, AAV2-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry, Addgene, 44361) continha 1 μL. Após as cirurgias, os animais receberam tratamento profilático com o anti-inflamatório não esteroidal carprofeno (5 mg/kg; sc). Os animais receberam CNO (3 mg/kg, ip, Advanced Molecular Technologies, AMTA056-CO16) em 3 etapas ou Veh (SF 0.9%, DMSO 1%). Antes das perfusões, utilizou-se o anestésico pentobarbital sódico, na dose para eutanásia recomendada pelo comitê de



ética local (120 mg/kg, ip). Em todos os animais dos experimentos 2, 3 e 4 foi realizada antibióticoprofilaxia cirúrgica (24000 UI/kg, im, pentabiótico) e administração pós-operatória de anti-inflamatório (2.5 mg/kg, sc, flunixin meglumina). No experimento 2, as ratas receberam 1  $\mu$ L de 6-OHDA (16  $\mu$ g/ $\mu$ L, intra-ARC, hydroxidopamine hydrochloride, Sigma-Aldrich, H4381) ou de Veh (SF 0.9%, ácido ascórbico 0.1%). A concentração de 6-OHDA foi definida com base em um estudo prévio de Del-Bel & colaboradores (246). O uso do ácido ascórbico teve o objetivo de prevenir oxidação da droga, conforme recomendação do fabricante. Para injeção de 6-OHDA, o anestésico utilizado foi o isofluorano (taxas de indução: 4%, fluxo de O<sub>2</sub> a 2 L/min; taxa de manutenção: 1%, fluxo de O<sub>2</sub> a 2 L/min). Evitou-se utilizar solução anestésica de cetamina e xilazina visto que o dano aos neurônios dopaminérgicos é dependente do anestésico utilizado, de modo que essa combinação anestésica compromete a lesão neuronal decorrente da droga 6-OHDA (247, 248). Para realização do experimento 3, utilizamos 1  $\mu$ L de oPRL [0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L, icv; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program (NIDDK-NHPP); oPRL-21 AFP 10692-C], a qual foi diluída conforme orientação do fabricante em solução de NaCl 0.9% e NaOH 0.01 M (Veh). No experimento 4, foi administrado oPRL (6 mg/kg, sc; Sigma-Aldrich, L6520) em uma dose que inibe agudamente a secreção pulsátil de LH em ratas (35). A oPRL foi diluída conforme orientação do fabricante em solução composta de NaCl 0.9% e PBS 0.01M (Veh). Referente aos experimentos 3 e 4, ovariectomia e estereotaxia foram realizadas sob anestesia com solução de cetamina e xilazina (cloridrato de cetamina: 80 mg/kg e xilazina: 10mg/Kg, ip) e foi utilizado o 17 $\beta$ -E2 (4  $\mu$ g/kg/dia, sc; Sigma-Aldrich, E8875) diluído em óleo de milho (35). No experimento 4, os antagonistas dopaminérgicos para D1R (10  $\mu$ g/3 $\mu$ L, 3  $\mu$ L icv; SCH 23390 hydrochloride, Tocris Bioscience, 0925/10) e D2R (10  $\mu$ g/3 $\mu$ L, 3  $\mu$ L icv; Sulpirida, Tocris Bioscience, 0895/100) foram diluídos em DMSO 10% (veículo). A dose utilizada foi baseada em estudo prévio da literatura (249).

#### 4. Procedimentos cirúrgicos

##### *Ovariectomia*

Ratas dos experimentos 3 e 4 foram OVX bilateralmente sob anestesia com solução de cetamina/xilazina. Para tanto, realizou-se tricotomia e antissepsia da pele da região abdominal com solução hidroalcoólica de polivinilpirrolidona-iodo a 10% (PVP-I tópico). Após incisão bilateral dos flancos, foi realizado diérese do tecido subcutâneo e muscular por meio de divulsão, a fim de expor o tecido adiposo retroperitoneal onde se encontram os ovários. Tubas uterinas foram clampeadas e os ovários removidos. Hemostasia foi realizada com auxílio de uma pinça hemostática e, em seguida, o tecido adiposo retroperitoneal foi reposicionado na cavidade abdominal. Ao final, as incisões nos tecidos foram suturadas com fio de nylon cirúrgico.

##### *Cirurgia para implantação de cânula icv*

Esse procedimento cirúrgico foi realizado nos experimentos 3 e 4 para administração de drogas icv. Após anestesia com solução de cetamina/xilazina, tricotomia e antissepsia da calota craniana, as ratas foram então adaptadas a um estereotáxico para animais de pequeno porte (M-900, David Kopf Instruments; Tujunga, CA, EUA) e a barra de incisivos ajustada em -3,3 milímetros. Em seguida, anestésico local (cloridrato de lidocaína, 2%) foi injetado abaixo do periósteo, a fim de anestésiar localmente o sítio cirúrgico. A incisão, de extensão longitudinal, foi feita com lâmina de bisturi descartável, na porção superior do crânio (entre a linha dos olhos e as orelhas). Craniotomia foi realizada com o auxílio de uma broca odontológica, a fim de anexar uma cânula guia (16 mm de comprimento X 0.7mm de diâmetro) com auxílio de parafusos de aço inoxidável e acrílico odontológico autopolimerizável. A cânula foi fixada no ventrículo cerebral lateral direito, nas coordenadas previamente descritas no Atlas de Paxinos & Watson (250) (ântero-posterior: 1.0 mm posterior ao bregma; médio-lateral: 1.6 mm à direita da sutura longitudinal; dorso-ventral: 3.6 mm, abaixo da calota

craniana). Antes da fixação da cânula, o correto posicionamento no ventrículo lateral foi confirmado através do deslocamento do menisco em um manômetro de coluna líquida preenchido com SF 0.9%. Ao término da cirurgia, a cânula foi ocluída em toda a sua extensão com uma haste rígida de aço inoxidável, a fim de evitar entrada de impurezas. Para microinjeções de drogas icv no dia do experimento, uma agulha injetora de 22-gauge (acoplada a um tubo de polietileno PE-10) foi inserida na cânula guia fixada no ventrículo lateral direito. A extensão do tubo de polietileno foi conectada a uma microseringa (10  $\mu$ L, Hamilton Company; Reno, NV, EUA). O volume de injeção foi administrado em um fluxo de 1  $\mu$ L/min, com auxílio de uma bomba de infusão (modelo Legato 100, Kd Scientific; Holliston, MA, EUA). Para evitar refluxo do volume injetado, a agulha injetora permaneceu conectada à cânula guia por 1 min após o fim da injeção.

#### *Cirurgia para microinjeção de 6-OHDA no ARC*

No experimento 2, após indução anestésica com isoflurano em uma caixa de acrílico completamente vedada, as ratas foram transferidas para um estereotáxico ideal para animais de pequeno porte e a barra de incisivos foi ajustada em -3.3 mm. No estereotáxico, foi acoplada uma máscara confeccionada em impressora 3D, a fim de garantir firme ajuste à narina dos animais e evitar escape do gás inalatório durante o período cirúrgico. Após estabilização anestésica, confirmada com testes de sensibilidade na extremidade distal das patas traseiras, foi realizada tricotomia e antisepsia da calota craniana. Incisão cirúrgica foi feita na porção superior do crânio com lâmina de bisturi descartável, estendendo-se longitudinalmente da linha dos olhos até as orelhas. Craniotomia foi realizada com o auxílio de uma broca odontológica. Em seguida foram administradas 4 microinjeções de 1  $\mu$ L de 6-OHDA (16  $\mu$ g/ $\mu$ L, intra-ARC) ou Veh, em quatro sítios no ARC, em uma taxa de fluxo de 0.33  $\mu$ L/min (total 3 min). A agulha foi mantida no sítio por 3 min após o término da microinjeção e antes da remoção, a fim de evitar refluxo e garantir a difusão da droga no sítio de interesse. Devido à extensão do ARC, as quatro microinjeções de 6-OHDA foram feitas 2 x 2 bilateralmente,

conforme descrito por Mittelman-Smith & cols. (251) (nível rostral, ântero-posterior 2.4 mm posterior ao bregma, médio-lateral  $\pm 0.5$  mm lateral ao seio venoso, dorso-ventral 9.8 mm abaixo da dura-máter; Nível caudal, ântero-posterior 3.5 mm posterior ao bregma, médio-lateral  $\pm 0.5$  mm lateral ao seio venoso, dorso-ventral 9.7 mm abaixo da dura-máter). A droga foi injetada com agulha do tipo gengival de 30-gauge, fixada previamente no estereotáxico. A agulha foi conectada a um tubo de polietileno (PE-10) com extensão até uma microseringa (10  $\mu$ L, Hamilton Company; Reno, NV, EUA) a qual, por sua vez, estava acoplada a uma bomba de infusão (modelo Legato 100, Kd Scientific; Holliston, MA, EUA).

#### *Cirurgia para Injeção estereotáxica de AAV no ARC de ratos TH-Cre*

A microinjeção de AAV intra-ARC realizada no experimento 1 seguiu protocolos e normas do Comitê de Ética da Nova Zelândia. A fim de precisar a localização do ARC nos ratos TH-Cre, primeiramente realizamos um experimento piloto com intuito de confirmar as coordenadas precisamente. Para tanto, utilizou-se uma agulha bilateral (25 gauge, espaçamento de 2 mm entre duas agulhas) acoplada a uma microseringa (1  $\mu$ L, Hamilton Company; Reno, NV, EUA), a qual seria utilizada no experimento propriamente dito e, então, definiu-se as coordenadas (ântero-posterior 2.8 mm posterior ao bregma, médio-lateral  $\pm 1.0$  mm lateral ao seio venoso, dorso-ventral 0.9 mm abaixo da dura-máter). Por se tratar de um experimento com AAV, antes do procedimento cirúrgico, bancada e equipamentos foram protegidos com plástico transparente, para posterior descarte adequado seguido de higienização criteriosa dos instrumentos, equipamentos e de toda área de trabalho. Após indução anestésica realizou-se tricotomia e antisepsia da calota craniana. Incisão na porção superior do crânio foi feita com lâmina de bisturi descartável, estendendo-se longitudinalmente da linha dos olhos até as orelhas. Craniotomia foi realizada com o auxílio de uma broca odontológica. Após inserida a agulha, a mesma foi mantida em repouso durante três min e, em seguida, o vírus foi lentamente injetado por meio da movimentação do êmbolo da seringa manualmente

(aproximadamente 100 nL/min, tempo total de injeção 10 min). Após o término da microinjeção de 1 µL de AAV, a agulha foi mantida no sítio por 5 min e, por fim, removida lentamente (tempo de remoção 5 min).

### **5. Coleta seriada de sangue pela extremidade distal da cauda**

Todas as avaliações de secreção pulsátil de LH e da concentração de PRL (experimento 1) foram realizadas através do método não invasivo de coleta seriada de sangue a partir da extremidade distal da cauda dos animais, conforme descrito na literatura em camundongos (252) e em estudos prévios do nosso laboratório com ratos (35, 119). Dado o conhecido efeito inibitório do estresse sobre o eixo HPG (253, 254) e devido à PRL ser considerada um marcador de estresse (255-257), optamos por esse método que viabiliza a análise da secreção pulsátil de LH sem a necessidade de colher considerável volume de sangue, o que o torna isento de estresse cirúrgico e hemodinâmico. Pelos mesmos motivos, todas as coletas de sangue para mensuração de LH e PRL foram precedidas de habituação dos animais com o experimentador e simulação do procedimento manual de coleta pela cauda (sem realização do corte), diariamente por pelo menos 1 mês. Esse processo de habituação permitiu aos animais aceitarem livre e tranquilamente o procedimento nos dias experimentais, de modo a evitar o estresse.

O procedimento de coleta inicia-se com a realização de um pequeno corte na extremidade distal da cauda (de 1 a 2 mm). Em seguida, deposita-se uma gota de sangue em placa de Petri e, com auxílio de um pipetador automático, aspira-se 10 µL de volume de sangue, o qual é imediatamente diluído em tampão fosfato-salina (PBS 0.01M) acrescido de Tween-20 a 0.05% (PBS-T, pH 7.4), e rapidamente congelado a -20 °C. Na Nova Zelândia, a coleta seriada de sangue foi embasada no mesmo princípio, entretanto, realizou-se incisão na veia lateral da região distal da cauda, uma vez que o comitê de ética local vigente não aprovou o corte da extremidade distal da cauda em

ratos. O tempo total de coleta foi de 3 horas nos experimentos 2 e 4, e de 2 horas no experimento realizado na Nova Zelândia (experimento 1). O intervalo entre as coletas foi de 6 min nos experimentos 1 e 2, e a cada 5 min no experimento 4. Nas coletas de sangue do experimento 1, o tempo “0” nos gráficos de LH ou PRL se referem ao início da coleta seriada, o qual ocorreu 30 min após injeção de Veh ou CNO. No experimento 4, o tempo “0” nos gráficos de LH se refere ao início da coleta seriada, 30 min após injeção de Veh ou oPRL.

## 6. ELISA para PRL, LH e FSH

Para dosagens dos hormônios LH e PRL em sangue total, bem como para dosagens de PRL e FSH em plasma (referente ao experimento 2) foi realizado o método ELISA conforme descrito na literatura em camundongos (252) e em estudos prévios do nosso laboratório com ratos (35, 119). A dosagem de FSH foi recentemente padronizada em nosso laboratório, seguindo protocolo semelhante de ELISA. Inicialmente, em uma placa de 96 poços (microplaca 9018, Corning; St. Louis, MI, EUA) foi pré-adsorvido 50 µL de anticorpo de captura em PBS 0.01 M e incubado *overnight* a 4 °C (para PRL, guinea pig anti-rat PRL, AFP65191, NIDDK-NHPP, 1:1.500; para LH, anti-bovine LHβ monoclonal, 518B7, UC Davis, 1:2.500; para FSH, guinea-pig anti FSH-β, AFP28122491, NIDDK- NHPP, 1:1.500). Após incubação, o conteúdo dos poços foi vertido e, a fim de minimizar ligações inespecíficas do anticorpo de captura, os poços foram incubados com 200 µL de tampão de bloqueio (leite em pó 5% em PBS-T) por um período de 120 min. Em seguida, os poços foram lavados 5 vezes a cada 3 min com PBS-T. As placas foram então incubadas com 50 µL de amostras e curva padrão de LH, PRL ou FSH. As respectivas curvas padrões foram feitas a partir de diluições seriadas de cada padrão. Referente ao LH, utilizou-se o padrão de LH de rato (RP-3, AFP718B, NIDDK-NHPP), com o primeiro ponto da curva em 5 ng/mL e último em 0.010 ng/mL. Referente à PRL, utilizou-se o padrão de PRL de rato (RP-3, AFP4459B, NIDDK-NHPP)

com concentração do primeiro ponto em 15 ng/mL e do último em 0.030 ng/mL. Referente ao FSH utilizou-se o padrão de FSH de camundongo (RP, AFP5308D, NIDDK-NHPP) com concentração do primeiro ponto em 10 ng/mL e do último em 0.020 ng/mL. Em todos os ensaios, um pool de amostra criado no laboratório foi utilizado como controle de qualidade. Após 24 h de incubação em temperatura ambiente, os poços foram então incubados com 50 µL dos anticorpos de detecção diluídos em tampão de bloqueio por 24 h a 4 °C (para PRL, rabbit anti-rat prolactin antiserum, NIDDK-Anti-rPRL-S-9, AFP131581570, 1:70.000; para LH, rabbit anti-rat LH, AFP240580Rb, NIDDK-NHPP, 1:40.000; para FSH, rabbit anti-rat FSH $\beta$ , AFPHFSH6, NIDDK-NHPP, 1:5.000). Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 50 µL do anticorpo secundário (horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG, P044801-2, Dako Pathology Solutions, 1:2.000) diluído em 50% PBS-T e 50% de tampão de bloqueio durante 90 min. As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de solução de orto-fenilenediamina (OPD; o-Phenylenediamine, Sigma-Aldrich, P1526/Ref. 615-28-1) na concentração de 2 mg/mL diluído em tampão citrato (0.02% de peróxido de hidrogênio, pH: 5.0) durante 45 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido clorídrico (3 mol/L). A leitura óptica foi realizada com leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, EUA), em comprimento de onda de 490 nm. O comprimento de 650 nm foi utilizado para correção do background. As concentrações de hormônios nas amostras foram definidas a partir da interpolação dos valores de densidade óptica obtidos das respectivas curvas de calibração por regressão não linear. Para o LH, os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 6.7% e 10%, respectivamente. Para a PRL os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 7.1% e 10%, respectivamente. Para o FSH o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6.6%, o coeficiente de variação inter-ensaio não foi calculado uma vez que foi realizado apenas um ensaio até o momento.

## **7. ELISA para E2**

Para a dosagem das concentrações plasmáticas de E2 foi utilizado plasma proveniente de sangue do tronco após decapitação. Para tanto, utilizou-se um kit comercial de ELISA para E2 (EIA-2693, DRG Internacional, Alemanha) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A eficácia deste kit foi validada no laboratório utilizando-se amostras de concentrações baixas (ratas em diestro e OVX) e altas (ratas em proestro e OVX+E2) de E2 plasmático (35). Vinte e cinco  $\mu\text{L}$  de solução padrão ou de amostras foram pipetados na placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do hormônio conjugado à enzima horseradish peroxidase para incubação em temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução com substrato tetrametilbenzidina. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, EUA) em 450 nm de comprimento de onda.

## **8. Histologia ovariana**

Os ovários de ratas em diestro foram dissecados e fixados em PFA 4% durante 24 horas. Em seguida, os tecidos foram desidratados gradativamente em álcoois nas concentrações de 50% (30 min), 70% (1 hora), 80% (1 hora), 90%(1 hora), 100% (1 hora), 100% (overnight). Após a desidratação, os ovários foram diafanizados em 3 banhos de xilol, cada um de 30 min. Após o processo de diafanização, os ovários passaram por 3 banhos de parafina entre 59-62 °C (30 min por banho), a fim de ocorrer a impregnação da parafina, e, por fim, foram incluídos em parafina. Um ovário aleatório de cada animal foi seccionado por inteiro com auxílio de um micrótomo manual (Leica RM2125, Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os cortes histológicos foram seccionados a uma espessura de 7  $\mu\text{m}$ . Uma em cada dez secções foi corada com hematoxilina e eosina e analisada ao microscópio óptico com câmera acoplada (Axiovision 3.1, Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) nas objetivas de 20 x e 40 x. Foram quantificados corpos



lúteos, folículos saudáveis e folículos atrésicos em toda a área das secções (258). Corpos lúteos em regressão com predominância de células com citoplasma eosinófilo não foram incluídos na análise devido a possibilidade de terem sido originados de ovulações anteriores à lesão neuronal, visto que a atividade do corpo lúteo termina entre 12 e 14 dias após a ovulação (259), porém permanece evidente no ovário por tempo indeterminado (260). Folículos saudáveis foram classificados em primordiais, pequenos (<50 µm), médios (50 - 170 µm) e grandes (>170 µm) (261).

### **9. Processamento dos cérebros para imunohistoquímica**

Referente ao experimento 1, a perfusão foi realizada através da punção da artéria aorta ascendente, inicialmente com 50 mL de PBS 0.01 M (heparinizado: 5 UI/mL), seguido de 300 mL de PFA 4% diluído em tampão fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.4) durante 30 min, a fim de fixar os cérebros. Após a perfusão transcardíaca, os cérebros foram removidos e imersos em PFA 4% por duas horas. Em seguida, imersos em solução de sacarose 30%. Referente ao experimento 2, como os animais foram decapitados, a fixação com PFA foi feita pelo método de imersão. Para tanto, foi realizado um experimento piloto a fim de determinar o tempo necessário para a ideal fixação do tecido cerebral. Assim, os cérebros do experimento 2 foram fixados por imersão em PFA 4% durante 48 horas e, em seguida, imersos em solução de sacarose 30%. Após a etapa de fixação dos tecidos, o protocolo manteve-se igual para todos os experimentos em que se realizou imunohistoquímica, experimentos 1 e 2. Dessa forma, os cérebros foram congelados em isopentano a - 40 °C e armazenados a - 80 °C até o momento da obtenção dos cortes. Quatro secções coronais de 40 µm da extensão rostrocaudal do ARC foram obtidas em um criostato, de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (250). Após seccionados, os tecidos foram armazenados em solução crioprotetora a -20 °C (262) para posteriores análises por imunohistoquímica.

## 10. Imunohistoquímica

Todas as imunohistoquímicas realizadas neste estudo foram executadas pelo método de free-floating.

### *Marcação pelo método da peroxidase*

As marcações simples para TH e kisspeptina (referentes ao experimento 2) foram realizadas pelo método de marcação com peroxidase, conforme previamente descrito em Araujo-Lopes & cols. (115). As secções passaram por lavagens em PBS 0.01 M em todos os passos do processo. Em todo procedimento, os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução de Triton X-100 0.3% e albumina bovina (BSA) 1% em PBS 0.01 M. Inicialmente, as secções foram removidas da solução crioprotetora e lavadas 10 vezes, durante 6 min, com PBS 0.01 M. Em seguida, incubadas com glicina 0.1 M por 10 min, e com solução de peróxido de hidrogênio 1% por 30 min, para depois serem incubadas em solução de TX-100 a 0.4% e BSA 3% durante 1 hora. Após essa etapa inicial de preparação das seções, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários (mouse anti-TH, T1299, Sigma-Aldrich, 1:70.000) ou (rabbit anti-mouse kisspeptina-10, A.C. 564, 1: 5.000) durante 48 horas, em uma temperatura de 4 °C. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpos secundários para as marcações de TH (biotinylated anti-mouse IgG, BA2000, Vector Laboratories, 1:2.000) e kisspeptina (biotinylated anti-rabbit IgG, BA1100, Vector Laboratories, 1:2.000), respectivamente, durante 2 horas. Na etapa seguinte, as seções foram incubadas em complexo avidina DH-peroxidase biotinizada (ABC Elite, Vector Laboratories) na diluição de 1:300 durante 1 hora. A marcação foi revelada com solução composta de 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorato DAB (0.2 mg/mL, Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e 30% peróxido de hidrogênio (em tampão Tris-HCl 0.05 M; pH 7.6). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e as lamínulas fixadas com Entellan

(Merck). Imagens das secções foram obtidas em microscópio óptico a partir de referências anatômicas do atlas de Paxinos e Watson (250).

A dupla marcação para mCherry e c-Fos (experimento 1) foi realizada conforme descrito em Yip & cols. (263), excluindo-se a etapa de recuperação antigênica necessária para marcação de STAT5 referente ao artigo citado. As secções armazenadas em solução crioprotetora foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com Tris (TBS; Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.6). Em seguida, os tecidos foram incubados em solução de peróxido de hidrogênio acrescida de metanol (0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 40% metanol em TBS) durante 10 min, a fim de bloquear as peroxidases endógenas. Após lavagem com TBS, as secções foram então incubadas com o anticorpo primário (rabbit polyclonal anti-c-Fos, AB190289, Abcam, 1:10.000) diluído em solução TBS (0.03% Triton-X, 0.25% BSA, 2% soro de cabra), durante 48 horas a uma temperatura de 4 °C. No passo seguinte, os tecidos foram novamente lavados e incubados com o anticorpo secundário (biotinylated goat anti-rabbit IgG, B2770, Invitrogen, 1:500) durante 90 min. Realizou-se então uma incubação em complexo avidina DH-peroxidase biotinilada (ABC Elite, Vector Laboratories, 1:300) por 1 hora. A marcação para c-Fos foi então revelada com solução composta de DAB (0.2 mg/mL, Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e solução 30% de peróxido de hidrogênio (diluído em tampão Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6). A marcação das secções para mCherry foi alcançada repetindo-se a etapa de bloqueio de peroxidases endógenas seguida de incubação com anticorpo primário (polyclonal rabbit anti-mCherry, AB167453, Abcam, 1:10.000) durante 48 horas e secundário (goat anti-rabbit IgG, PI-1000, Vector Laboratories, 1:2.000) por duas horas. No passo seguinte, realizou-se uma segunda incubação em complexo avidina DH-peroxidase biotinilada. Em seguida, a marcação para mCherry foi revelada com a mesma solução de DAB supracitada, porém sem acréscimo de sulfato de níquel. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e as lamínulas foram fixadas com DPX (Sigma-Aldrich). Imagens das

secções foram obtidas em microscópio óptico a partir de referências anatômicas do atlas de Paxinos & Watson (250).

#### *Marcação por imunofluorescência*

As duplas-marcações por imunofluorescência para de TH e mCherry no ARC foram realizadas embasadas em Yip & cols. (264). Inicialmente as secções foram lavadas (3 vezes a cada 10 min) em TBS e incubadas com soro de cabra (5%), por 1 hora. Em seguida, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários (monoclonal mouse anti-TH, MAB318, Sigma-Aldrich, 1:5.000 e rabbit anti-mCherry, AB167453, Abcam, 1:10.000) em solução de Tris 0.05M, NaCl 0.15 M, 0.3% de Triton X-100, 0.25% de albumina bovina- BSA, 2% de soro de cabra, pH 7.6, durante 48 horas à 4°C, sob agitação. Omissão do anticorpo primário em uma secção teste foi utilizada como controle negativo. Todas as secções foram então lavadas em TBS e incubadas durante duas horas em temperatura ambiente com os anticorpos secundários (polyclonal Alexa green 488 goat anti-mouse IgG, A11029, ThermoFisher, 1:500; e polyclonal Alexa Red 568 goat anti- rabbit IgG, A11036, ThermoFisher, 1:500). Omissão do anticorpo primário resultou em imunofluorescência não detectável. Ao final, as secções foram lavadas e montadas em lâminas gelatinizadas. Lamínulas foram fixadas com Fluoromount G (Southern Biotech). As lâminas foram analisadas em microscópio Confocal Nikon 1 R.

#### **11. HPLC-ED**

O processo iniciou com a homogeneização das microdissecções da ME, POA, NIL e CPu as quais estavam armazenadas a -80°C (referentes ao experimento 3). Com sonificador as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0.15 M, acrescido de 0.1 mM de EDTA e 57 nM de 3.4-diidroxibenzilamina-DHBA (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), utilizado como padrão interno. Em seguida, procedeu-se centrifugação a 12.000 rpm por 20 min a 4 °C. O pellet foi direcionado à dosagem proteica por Bradford e o

sobrenadante removido para avaliação das concentrações de dopamina e DOPAC, como previamente descrito (119, 265). A fase móvel do sistema foi constituída de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM,  $\text{NaCl}$  10 mM, EDTA 0.1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0.38 mM, em água MilliQ e metanol 10%; pH 3.5 ajustado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . O fluxo da bomba do HPLC foi ajustado em 1.0 mL/min e o potencial do detector eletroquímico a +0,4 V (Decade II, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden). Com o auxílio do auto injetor do equipamento, 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram injetados no HPLC via auto injetor (SIL-10A autosampler, Shimadzu Corporation). As catecolaminas foram separadas em coluna de fase reversa (Purospher Star, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm; Merck) precedida de pré-coluna C18 (Lichrospher 5  $\mu\text{m}$ , 4 x 4 mm; Merck). O forno foi mantido a uma temperatura constante de 40 °C. Para análise dos dados cromatográficos foi utilizado o software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão). As concentrações de dopamina e DOPAC foram determinadas por meio das curvas de calibração obtidas com o método do padrão interno (DHBA). Considerou-se a concentração de dopamina como a estimativa do estoque desse neurotransmissor nas vesículas sinápticas, enquanto que os níveis de DOPAC foram definidos como a estimativa da liberação de dopamina (175). A razão DOPAC/dopamina foi utilizada como índice do turnover dopaminérgico. A fim de evitar a variabilidade inter ensaio, todas as amostras analisadas no HPLC foram diluídas em mesma solução e dosadas em única análise.

## **12. Análise estatística**

Nos experimentos 1, 2 e 4, a detecção dos pulsos de LH foi realizada por meio do algoritmo Dynpeak (266). A frequência dos pulsos foi quantificada como o número de pulsos por hora durante o período de coleta de sangue. A amplitude do pulso foi calculada como a diferença entre o maior e menor valor existente na linha ascendente de cada pulso detectado. Comparações entre dois grupos foram determinadas pelo teste *t* de Student. Nas análises que continham duas variáveis, as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA)

de duas vias, a saber: 1) Experimento 1: CNO e tempo; 2) Experimento 3: oPRL e tempo; 3) Experimento 4: antagonistas dopaminérgicos e oPRL. Todas as análises de variância foram seguidas do pós-teste Holm-Sidak. Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  SEM. Um  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

**RESULTADOS**

**Experimento 1:** *Efeito da ativação seletiva dos neurônios TIDA por meio de DREADDs sobre a pulsatilidade do LH em ratos TH-Cre*

A figura 7 apresenta imagens representativas do ARC de ratos machos TH-Cre com dupla marcação imunofluorescente para TH (verde) e mCherry (vermelho) no 39º dia após a injeção de AAV cre-dependente (AAV2-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry). A análise da dupla marcação mostrou que  $66.3 \pm 11.7\%$  dos neurônios TH do ARC expressaram hM3Dq-mCherry. Em relação à seletividade do método,  $82.8 \pm 4.0\%$  dos neurônios m-Cherry-ir expressaram TH ( $n = 4$ ). No exemplo representativo com sobreposição de imagens, a cor amarelo-laranja representa a co-expressão de TH e mCherry (fig. 7). Esses dados confirmam a efetividade e seletividade da expressão de DREADD nos neurônios TIDA na região do ARC.

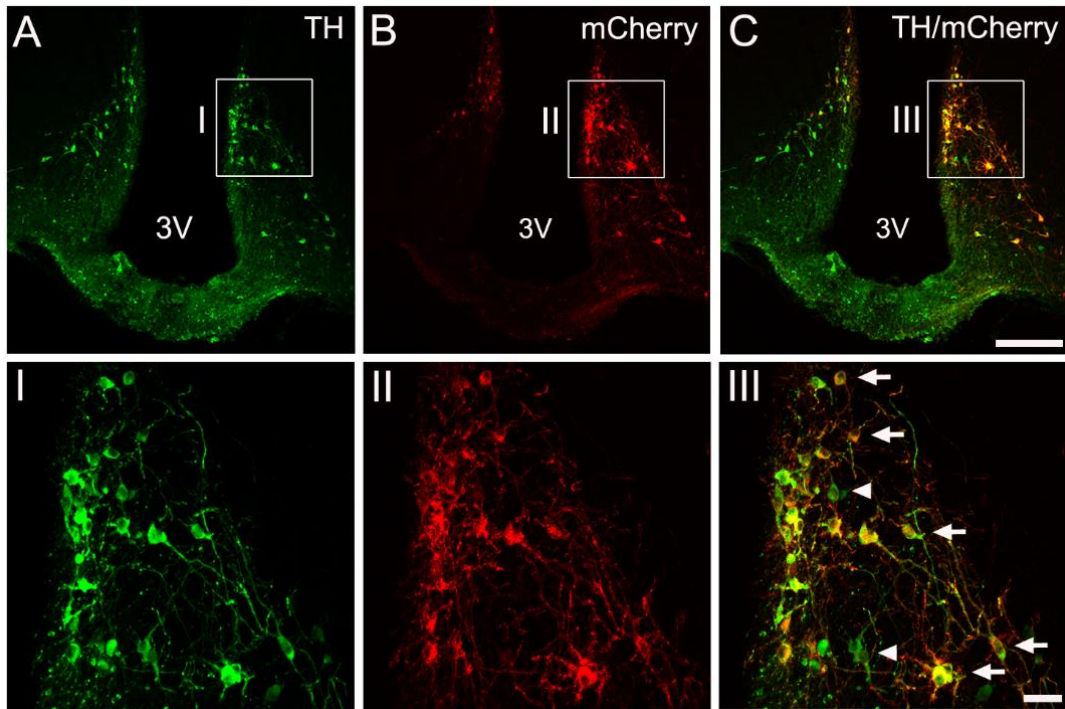
Além de confirmar a transfecção de DREADDs com a dupla marcação para TH e mCherry, adicionalmente, confirmamos a ativação dos neurônios TIDA pelo ligante sintético CNO. Para tanto, avaliamos a expressão de c-Fos nos neurônios imunorreativos à mCherry. A figura 8 apresenta imagens representativas de imunohistoquímica no ARC de ratos TH-Cre que receberam Veh e CNO. Como esperado, no grupo Veh (fig. 8A) observou-se um predomínio de marcação para mCherry sem a presença de co-expressão de c-Fos. Por outro lado, a predominância de expressão de c-Fos nos neurônios imunorreativos à mCherry observada no grupo injetado com CNO confirma a seletividade de ativação dos neurônios TIDA via DREADDs (fig. 8B). A comparação qualitativa de ambos os perfis pode ser observada através do percentual de expressão de cFos em neurônios mCherry, praticamente inexistente no grupo Veh em comparação à mais de 80% no grupo CNO (fig. 8C).

Juntas, a marcação dupla por imunofluorescência para TH e mCherry associada à imunohistoquímica para mChery e c-Fos no ARC demonstram que a utilização da tecnologia dos DREADDs em ratos TH-Cre foi capaz de ativar seletivamente os neurônios TIDA, fidedigna e reversivelmente, de modo a validar nosso modelo. Desse modo, para análise dos dados de PRL e LH foram utilizados apenas os ratos que

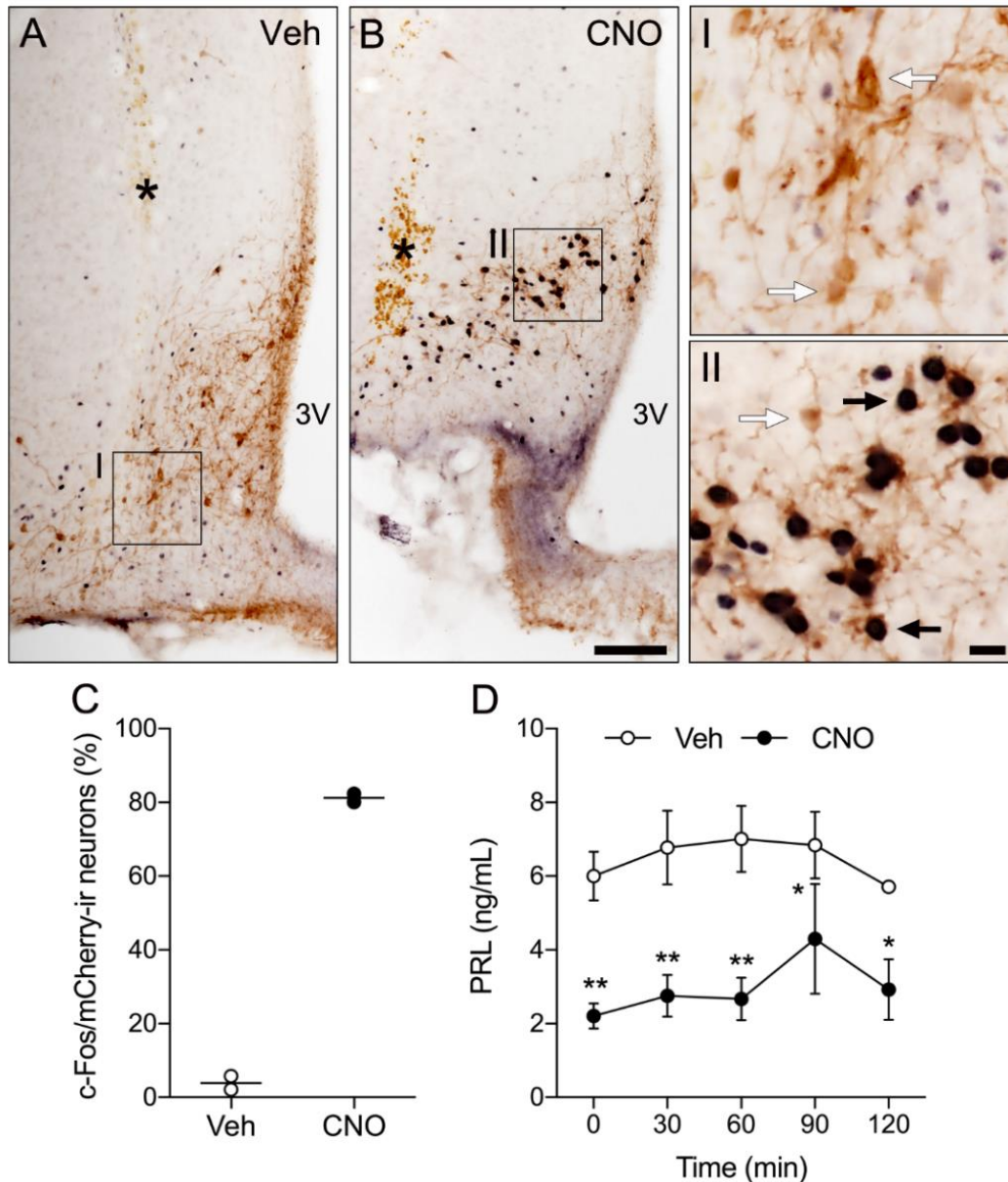


contemplaram o pré-requisito de efetiva transfecção de AVV (n = 4). Adicionalmente, como uma medida funcional, a ativação dos neurônios TIDA com CNO resultou em estável supressão da secreção basal de PRL nos ratos TH-Cre (fig. 8D). É importante salientar que os animais que receberam CNO são os mesmos animais que receberam o Veh, porém em dois momentos diferentes do experimento, conforme descrito na metodologia. Como determinado por ANOVA de duas vias, a concentração de PRL manteve-se reduzida após a injeção de CNO durante os tempos de coleta seriada 0, 30, 60, 90 e 120 min, quando comparado ao grupo Veh (\*p< 0.05 e \*\*p< 0.01). A redução da secreção de PRL induzida por CNO corrobora a validação do modelo de ativação de neurônios TIDA em nosso protocolo experimental, visto que demonstra o efeito esperado de menor liberação de PRL pela hipófise em decorrência da ativação dos neurônios TIDA e consequente maior liberação de dopamina.

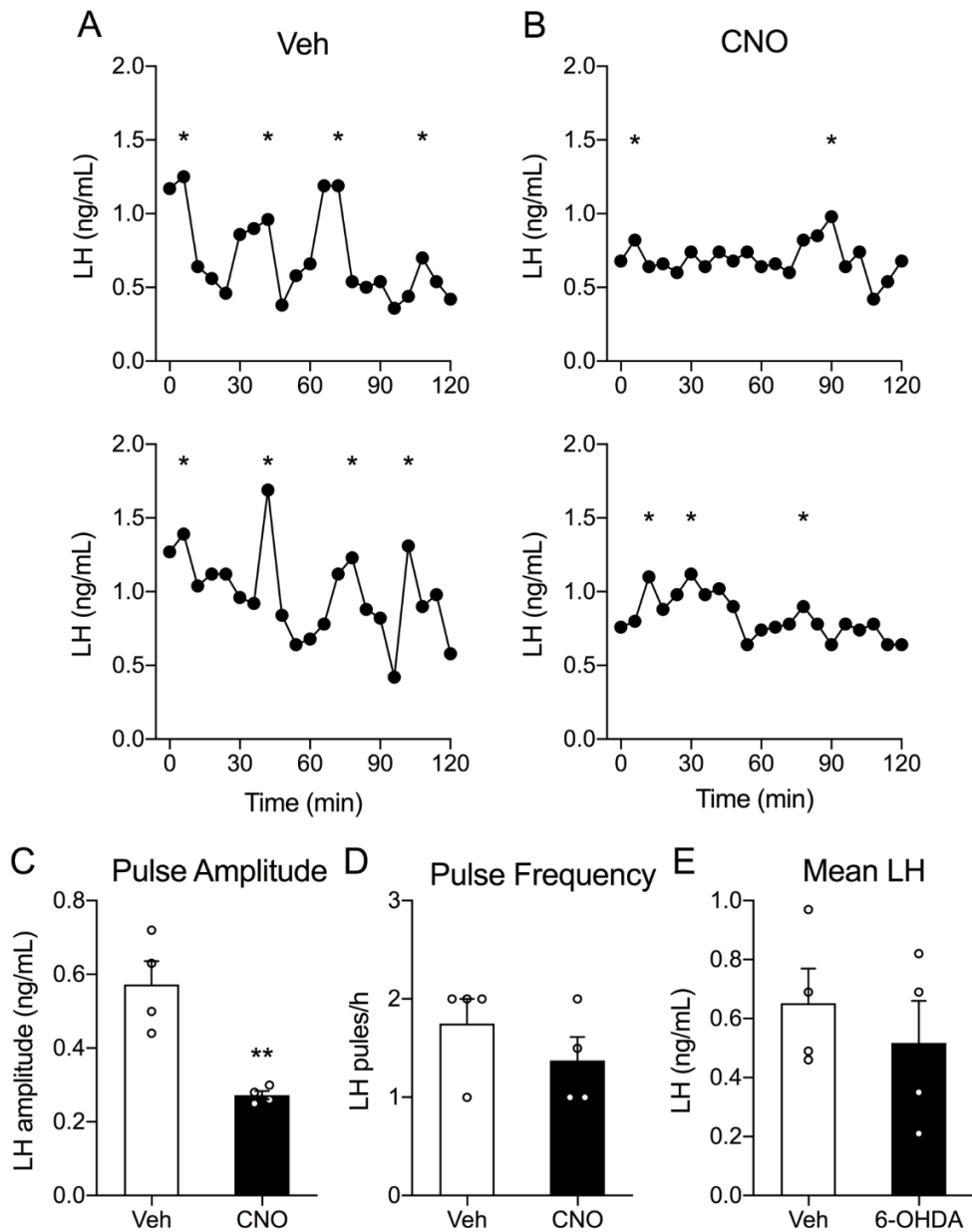
A figura 9 demonstra o efeito da ativação dos neurônios TIDA na secreção pulsátil do LH. Nas figuras 9A e B observa-se exemplos representativos da pulsatilidade de LH de dois ratos TH-Cre após 30 min do tratamento de Veh ou CNO, em dias experimentais diferentes. Os dados demonstram que a estimulação destes neurônios promoveu uma redução da amplitude dos pulsos de LH no grupo tratado com CNO ( $0.57 \pm 0.06$  vs  $0.27 \pm 0.01$  ng/mL, \*\*p< 0.01; fig. 9C). Entretanto, a frequência dos pulsos de LH (fig. 9D) e o LH médio (fig. 9E) não sofreram variação com a estimulação dos neurônios TIDA.



**Figura 7: Expressão seletiva de DREADDs em neurônios TIDA.** Ratos TH-Cre machos receberam injeção de vírus adeno-associado (AAV) carreando DREADDs (hm3DqmCherry) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). Após 39 dias, foi realizada dupla marcação imunofluorescente para tirosina hidroxilase (TH) e mCherry em seções coronais no ARC. (A, B) Imagens de microscopia confocal representativas da marcação de neurônios imunorreativos à TH (verde) e a mCherry (vermelho). (C) Sobreposição de imagens da dupla marcação para TH e mCherry. Setas brancas indicam exemplos de neurônios co-expressando TH e mCherry. 3V, terceiro ventrículo. Escalas, (A-C) 200  $\mu$ m e (I-III) 30  $\mu$ m.



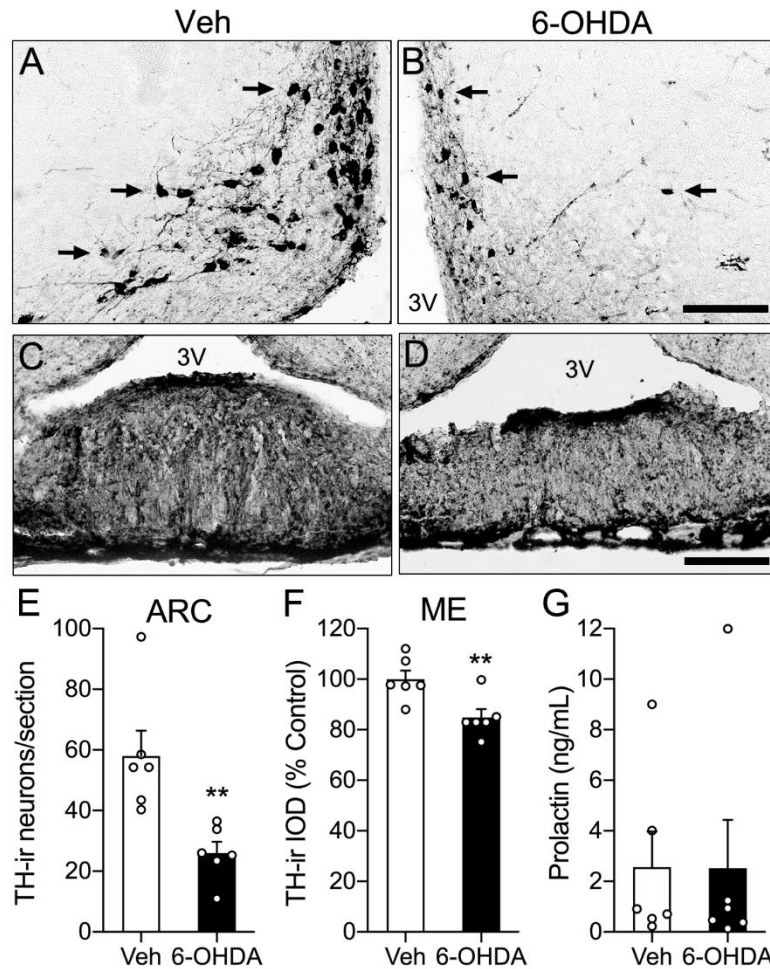
**Figura 8: Ativação de neurônios TIDA com CNO reduz a secreção plasmática de PRL em ratos TH-Cre.** Ratos TH-Cre machos receberam injeção de vírus adeno-associado (AAV) carregando DREADDs (hm3DqmCherry) no ARC. Após 21 dias, realizou-se uma coleta seriada de sangue pela cauda, a cada 6 min das 9:00 h às 11:00 h, após administração de Veh ou CNO (3 mg/kg, ip). Oito dias depois, os ratos receberam novamente Veh ou CNO e os cérebros foram fixados com PFA 4%. (A, B) Fotomicrografias representativas de dupla marcação para neurônios imunorreativos à mCherry (marrom) e c-Fos (preto) em seções coronais do ARC de ratos injetados com Veh (A) ou CNO (B). I e II apresentam as áreas delimitadas em maior aumento. Asterisco preto indica a cicatriz do percurso da agulha. Setas brancas indicam exemplos de expressão simples de mCherry e setas pretas indicam co-expressão de mCherry e c-Fos. (C) Percentual de expressão de c-Fos em neurônios mCherry em ratos Veh (n = 2) e CNO (n = 2). (D) Média ± EPM das concentrações sanguíneas de PRL após injeção de Veh (n = 4) ou CNO (n = 4). \*p < 0.05 e \*\*p < 0.01 vs Veh, determinado por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Sidak. 3V, terceiro ventrículo. Escalas, (A, B) 150  $\mu$ m e (I e II) 20  $\mu$ m.



**Figura 9. Ativação seletiva de neurônios TIDA reduz a amplitude dos pulsos de LH.** Ratos TH-Cre machos receberam injeção de vírus adeno-associado (AAV) carregando DREADDs (hm3DqmCherry) no ARC. Após 21 dias, realizou-se uma coleta seriada de sangue pela cauda durante 2 horas (9:00-11:00 h) a cada 6 min, após administração de Veh (n = 4) ou CNO (n = 4). Após 10 dias, o procedimento de coleta seriada de sangue foi repetido e os animais que foram injetados com Veh na primeira coleta, receberam CNO na segunda, e *vice-versa*. Pulsos detectados pelo algoritmo Dynpeak estão indicados com asterisco. (A e B) Dois exemplos representativos de secreção pulsátil de LH após injeção de Veh ou CNO em um mesmo animal. (C) Amplitude dos pulsos de LH,  $**p < 0.01$ . (D) Número de pulsos de LH por hora. (E) Concentração média de LH. Análise estatística determinada pelo teste *t* de Student. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  EPM.

**Experimento 2:** *Efeito da lesão dos neurônios TIDA com 6-OHDA sobre a secreção pulsátil de LH e função ovariana em rata*

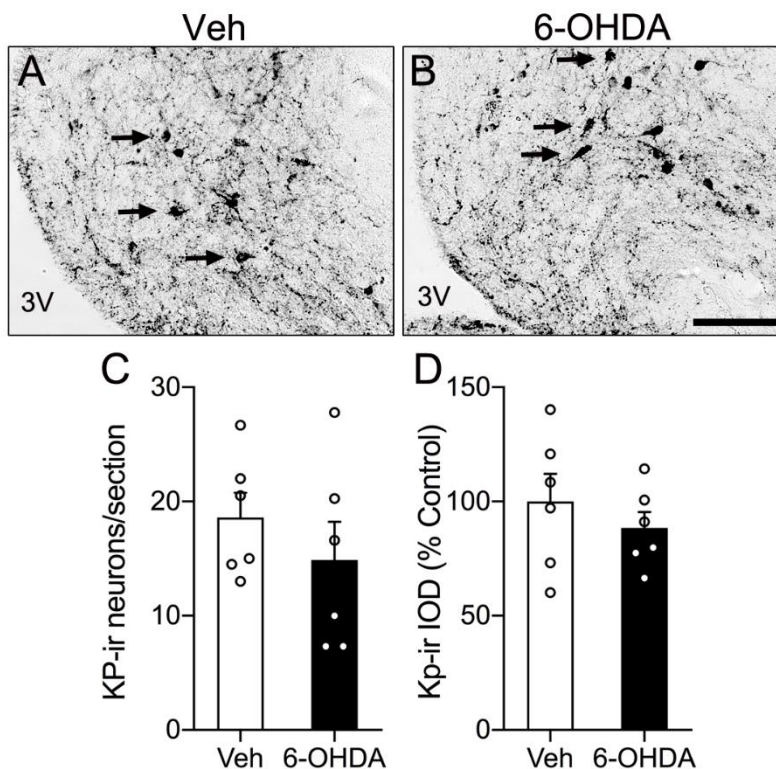
É conhecido que a dopamina tem efeito inibitório sobre a atividade elétrica dos neurônios GnRH (74), e que os neurônios TIDA fazem contatos com prolongamentos distais de GnRH na EM (193). Neste experimento, avaliamos o impacto fisiológico da lesão dos neurônios TIDA sobre a pulsatilidade de LH, secreção de FSH e função ovariana em ratas adultas. A figura 10 apresenta a imunorreatividade à TH no ARC e ME e a concentração plasmática de PRL de ratas na fase diestro do ciclo estral, após lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA. Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para TH no ARC e ME nos grupos Veh e 6-OHDA aparecem nas figuras 10A e B e 10C e D, respectivamente. A marcação simples para células imunorreativas à TH nessas imagens demonstram a efetividade da lesão dos neurônios TIDA com a neurotoxina 6-OHDA (fig. 10A, B). Houve uma redução média de aproximadamente 50% no número de neurônios imunorreativos à TH no ARC do grupo 6-OHDA comparado ao Veh, significativa de acordo com o teste *t* de Student ( $58.03 \pm 8.36$  vs  $26.02 \pm 3.66$  neurônios/secção,  $**p < 0.01$ , fig. 10E). Em consonância com esse dado, o grupo 6-OHDA demonstrou redução de fibras imunorreativas à TH na ME, porém uma redução menor, em torno de 20%. Essa redução pode ser observada pela quantificação da densidade óptica integrada expressa em % do grupo controle ( $100.00 \pm 3.45\%$  vs  $84.81 \pm 3.29\%$ ,  $**p < 0.01$ , Veh vs 6-OHDA respectivamente, fig. 10F). Apesar de lesão substancial dos neurônios TIDA, a redução de 20% nos terminais dopaminérgicos na ME não foi suficiente para alterar a concentração plasmática de PRL (fig. 10G).



**Figura 10: Confirmação da efetividade da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA e seu efeito sobre a secreção de PRL.** Após 45 dias da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA [quatro microinjeções de 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , cada, no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC)] ou injeção de veículo (Veh), ratas foram decapitadas na fase diestro do ciclo estral e cérebros foram fixados com PFA 4%, por imersão. (A e B) Marcação simples por imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) em seções coronais do ARC dos grupos Veh ( $n = 6$ ) e 6-OHDA ( $n = 6$ ). Setas pretas indicam neurônios TH-ir. (C e D) Marcação simples por imunohistoquímica para TH na eminência mediana (ME). (E) Número de neurônios TH-imunoreativos (ir)/secção no ARC, \*\*  $p < 0.01$ . (F) Densidade óptica integrada (IOD) de fibras TH-ir na ME, expresso como % do Veh (100%), \*\*  $p < 0.01$ . (G) Concentração plasmática de PRL, mensurada pelo método ELISA através de plasma proveniente de sangue do tronco. Resultados foram analisados pelo teste  $t$  de Student não pareado, e expressos como a média  $\pm$  EPM. 3V, terceiro ventrículo. Escala, 100  $\mu\text{m}$ .

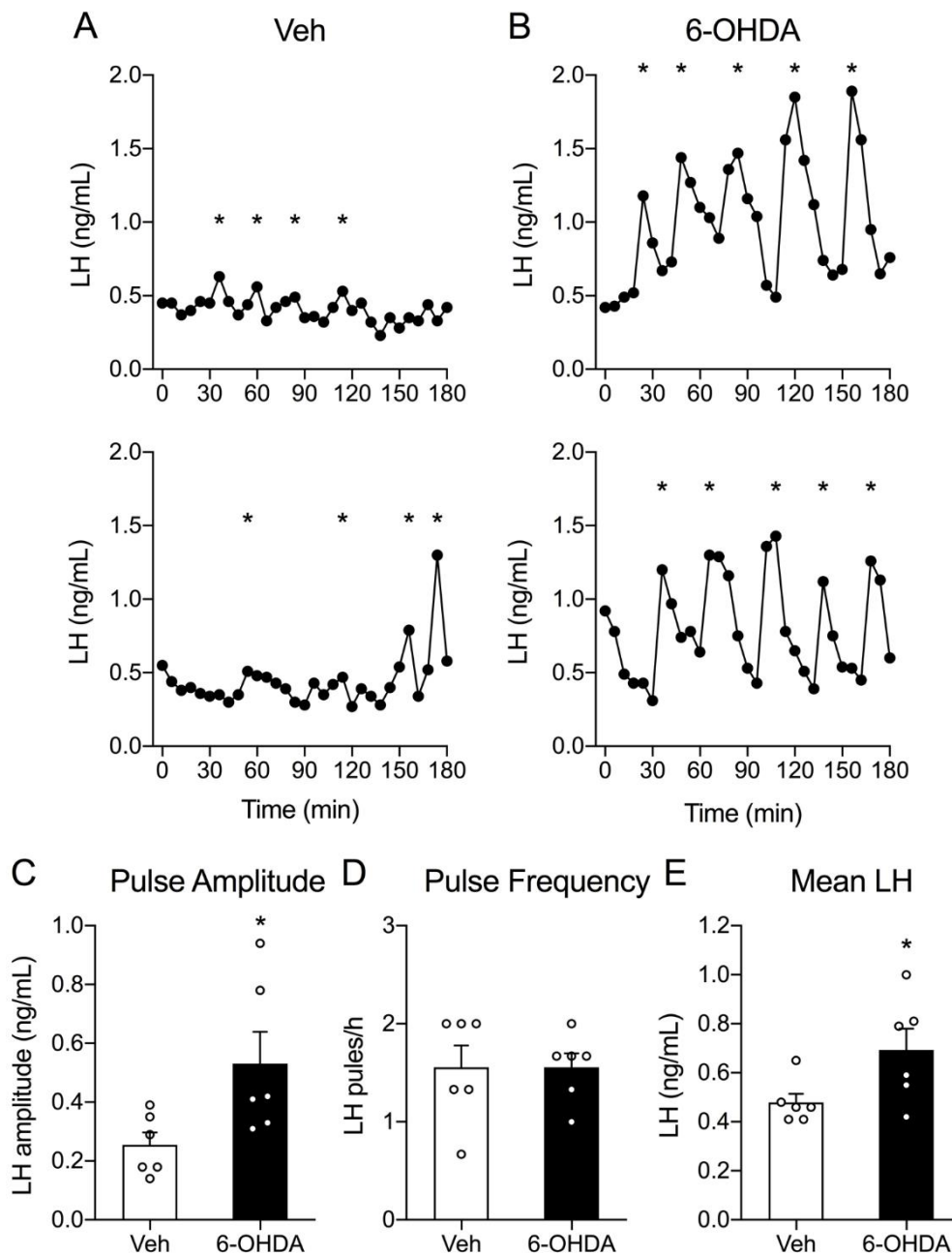
Embasado no conceito de que a secreção de LH é comprovadamente estimulada pela kisspeptina (174), foi investigado a expressão de kisspeptina no ARC com intuito de checar se os efeitos da lesão de TIDA seriam mediados por alteração da kisspeptina. A figura 11 mostra fotomicrografias representativas da imunorreatividade para kisspeptina no ARC dos grupos Veh (fig. 11A) e 6-OHDA (fig. 11B). Os resultados demonstram que não houve alteração do número de células imunorreativas à kisspeptina no ARC entre os grupos experimentais (fig. 11C). Também não houve variação na densidade de fibras imunorreativas à kisspeptina no ARC, representado pela quantificação da densidade óptica integrada expressa em % do grupo controle (fig. 11D).

A figura 12 retrata o efeito da lesão de neurônios TIDA sobre a pulsatilidade de LH de ratas em diestro. Nas figuras 12 A e B, observa-se dois exemplos representativos da pulsatilidade de LH nos grupos Veh e 6-OHDA, respectivamente. A análise com o teste *t* de Student não pareado mostrou, de uma maneira inversa à redução de amplitude após estimulação seletiva dos neurônios TIDA (fig. 9), que o grupo 6-OHDA apresentou um aumento robusto na amplitude dos pulsos de LH, de aproximadamente 100% ( $0.25 \pm 0.04$  vs  $0.53 \pm 0.11$  ng/mL, \* $p < 0.05$ , Veh vs 6-OHDA respectivamente, fig. 12C). Adicionalmente, houve aumento na média das concentrações plasmáticas de LH ( $0.47 \pm 0.04$  vs  $0.70 \pm 0.09$  ng/mL, \* $p < 0.05$ , Veh vs 6-OHDA respectivamente, fig. 12E). Entretanto, não houve alteração na frequência de pulsos de LH (fig. 12D).



**Figura 11: Expressão de kisspeptina no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) após lesão dos neurônios TIDA.** Após 45 dias da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA (4 microinjeções de 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , cada, no ARC) ou injeção de veículo (Veh), ratas foram decapitadas na fase diestro do ciclo estral e cérebros fixados com PFA 4%, por imersão. (A e B) Imagens representativas da marcação simples por imunohistoquímica para kisspeptina (Kp) em seções coronais do ARC dos grupos Veh (A) e 6-OHDA (B). (C) Número de neurônios Kp-ir/secção no ARC dos grupos Veh ( $n = 6$ ) e 6-OHDA ( $n = 6$ ). Setas pretas indicam exemplos de neurônios Kp-ir. (D) Quantificação da densidade óptica integrada (IOD) da imunorreatividade à Kp no ARC, expresso como % do grupo Veh (100%). Resultados foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado, e expressos como a média  $\pm$  EPM. 3V, terceiro ventrículo. Escala, 100  $\mu\text{m}$ .

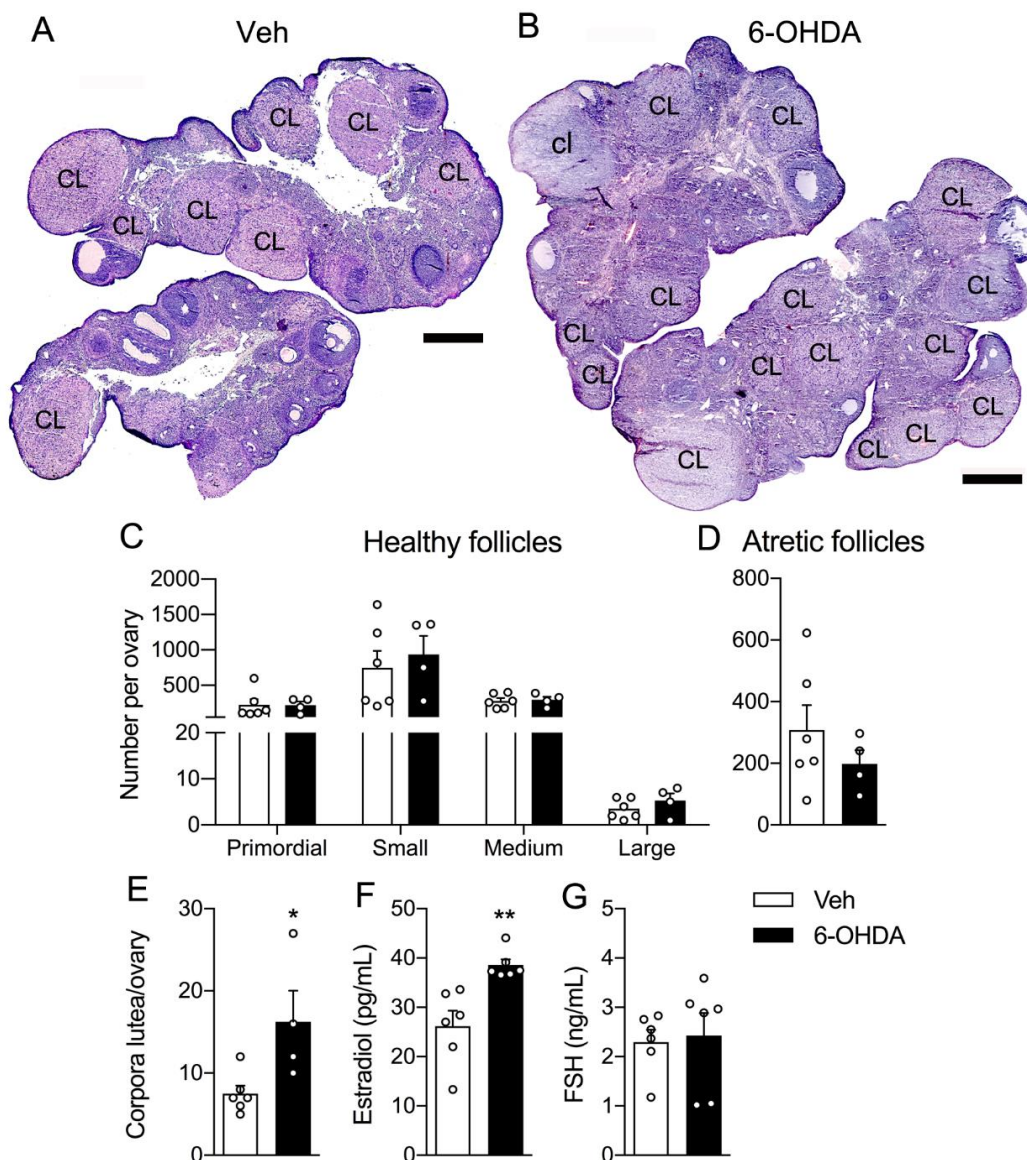




**Figura 12. Efeito da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA sobre a pulsatilidade de LH.** Após 42 dias da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA ( $n = 6$ ) ou injeção de veículo (Veh;  $n = 6$ ), foi realizada coleta de sangue pela cauda durante 3 horas, a cada 6 min (9:00 h -12:00 h), na fase diestro do ciclo estral. Concentração de LH foi mensurada pelo método ELISA. (A e B) Dois exemplos representativos da pulsatilidade de LH nos grupos Veh e 6-OHDA. Pulsos detectados pelo algoritmo Dynpeak estão indicados com um asterisco. (C) Amplitude dos pulsos de LH.  $*p < 0.05$ . (D) Número de pulsos de LH por hora (frequência de pulso). (E) Concentração média de LH.  $*p < 0.05$ . Análise estatística determinada pelo teste  $t$  de Student. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

A figura 13 demonstra os números de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, folículos atrésicos e corpos lúteos de ratas em diestro, após a lesão de neurônios TIDA. São apresentados exemplos representativos de seções coronais dos ovários referentes aos grupos Veh (fig. 13A) e 6-OHDA (fig.13B), nos quais a sigla CL indica presença de corpo lúteo. Conforme mostra a figura 13C, não houve diferença entre os grupos Veh e 6-OHDA, no que se refere ao número de folículos dos tipos primordial, pequeno, médio e grande. Também não foi observada diferença em relação ao número de folículos atrésicos entre os grupos Veh e 6-OHDA (fig. 13D). Entretanto, a análise histológica demonstrou que o grupo 6-OHDA apresentou duas vezes maior número de corpos lúteos ( $7.50 \pm 0.99$  vs  $16.25 \pm 3.79$ ,  $*p < 0.05$ , fig. 13E), o que sugere um aumento da taxa ovulatória no grupo 6-OHDA. Em consonância com estes dados, também observamos aumento na concentração plasmática de E2 no grupo 6-OHDA ( $26.21 \pm 3.09$  vs  $38.58 \pm 1.16$  pg/mL,  $**p < 0.01$ , fig. 13F). Por outro lado, a concentração de FSH não variou entre os grupos experimentais (fig. 13G).

Apesar das alterações de aumento no número de corpos lúteos, a análise da citologia vaginal demonstrou que a lesão dos neurônios TIDA não alterou a regularidade do ciclo estral. A frequência de ocorrência das fases de diestro (Veh,  $64.3 \pm 4.5\%$ ; 6-OHDA,  $64.0 \pm 8.6\%$ ;  $p = 0.97$ ) proestro (Veh,  $17.6 \pm 2.7\%$ ; 6-OHDA,  $14.8 \pm 1.7\%$ ;  $p = 0.40$ ) e estro (Veh,  $18.1 \pm 1.6\%$ ; 6-OHDA,  $24.5 \pm 6.8\%$ ;  $p = 0.38$ ) não diferiram entre os grupos experimentais.



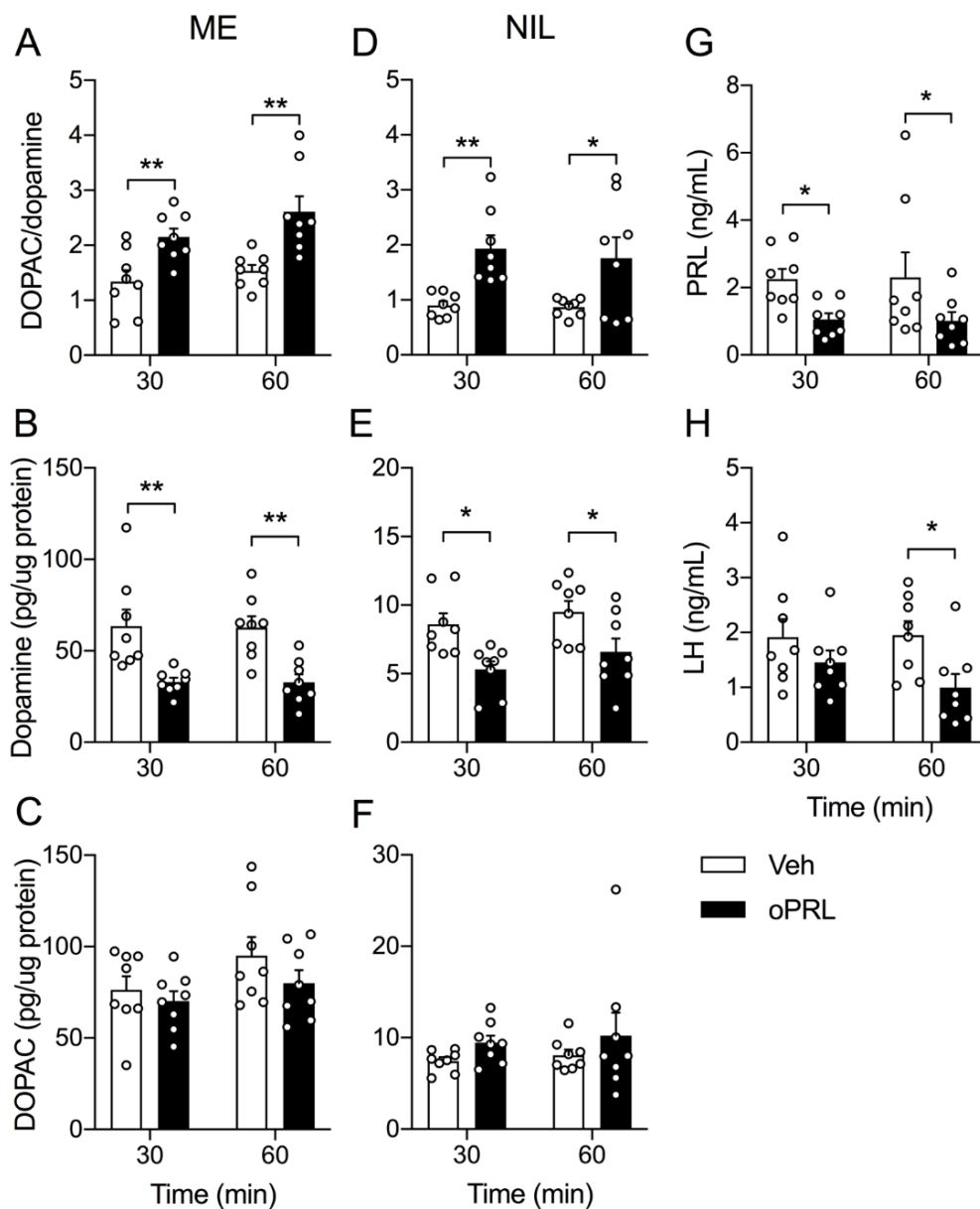
**Figura 13. Efeito da lesão dos neurônios TIDA sobre a morfologia ovariana e secreção de E2 e FSH.** Após 45 dias da lesão de neurônios TIDA com 6-OHDA ou injeção de veículo (Veh), ratas foram decapitadas na fase diestro do ciclo estral (9:00h -12:00h) e os ovários processados para análise histológica. (A e B) Imagens representativas de histologia ovariana dos grupos Veh e 6-OHDA, respectivamente. CL indica presença de um corpo lúteo. (C, D e E) Quantificação da contagem de folículos e corpos lúteo nos grupos Veh (n = 6) e 6-OHDA (n = 4). (C) Número de folículos primordiais, pequenos, médios e grandes. (D) Número de folículos atresicos. (E) Número de corpos lúteos. \* $p < 0.05$  (F e G) Mensuração da concentração de (F) E2 e (G) FSH nos grupos Veh (n = 6) e 6-OHDA (n = 6). \*\* $p < 0.01$ . Diferenças estatísticas determinadas pelo teste *t* de Student. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Escala, 500  $\mu$ m.

### **Experimento 3: Efeito agudo da PRL sobre a atividade de neurônios dopaminérgicos e secreção de LH e PRL em ratas**

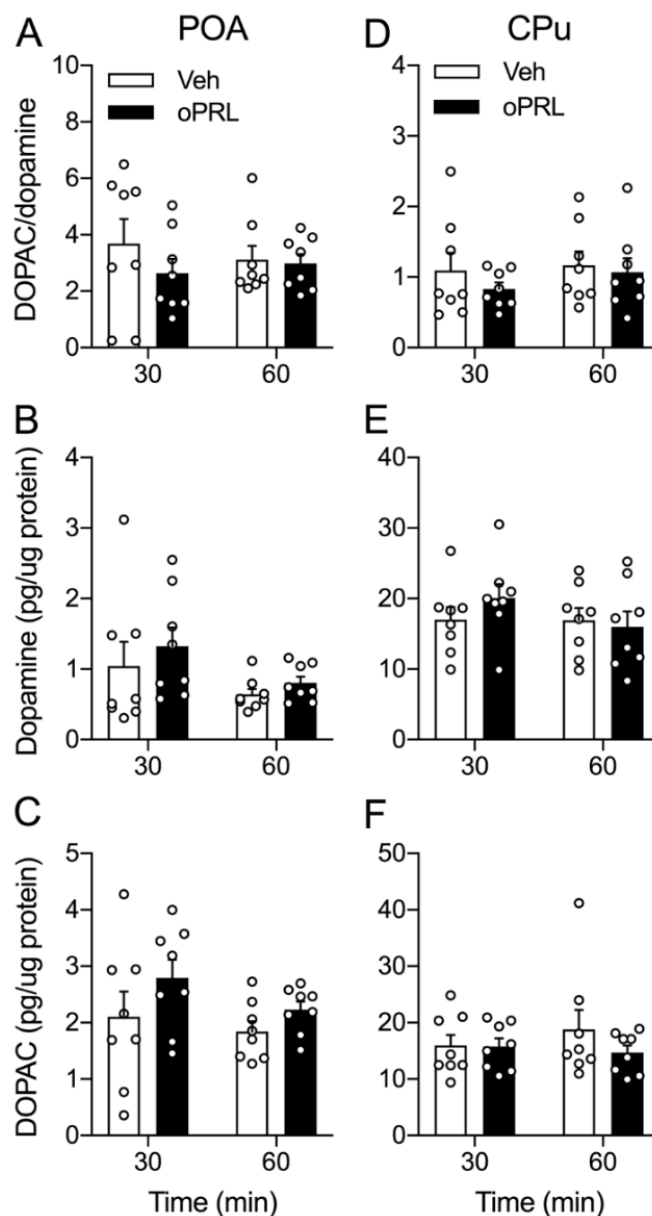
Estudos prévios da literatura indicam que a PRL é capaz de ativar os neurônios TIDA tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, os estudos *in vivo* até o momento reportam apenas um efeito lento da PRL sobre a atividade dopaminérgica na ME, que requer algumas horas para ser observada (175, 176). Entretanto, demonstramos recentemente que a administração aguda de PRL é capaz de inibir rapidamente a secreção pulsátil de LH em camundongos e ratas (35, 116). Desta forma, de acordo com a nossa hipótese de os neurônios TIDA estarem envolvidos neste efeito inibitório da PRL, é necessário que eles sejam também ativados rapidamente pela PRL *in vivo*. Neste experimento, investigamos, em detalhes, a ação aguda da PRL sobre atividade neuroquímica dos terminais de neurônios TIDA na ME, bem como em outros terminais neuroendócrinos no NIL e terminais sinápticos clássicos na POA e CPu. Injetamos oPRL icv a fim de observar as respostas após 30 e 60 min. A figura 14 retrata a resposta aguda da atividade de neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos e da secreção endógena de PRL e LH em ratas após a administração central de oPRL. O grupo oPRL apresentou aumento da razão DOPAC/DA após 30 e 60 min tanto na ME (30 min:  $1.34 \pm 0.20$  vs  $2.15 \pm 0.15$ ,  $**p < 0.01$ ; e 60 min:  $1.54 \pm 0.11$  vs  $2.61 \pm 0.28$ ,  $**p < 0.01$ ; fig. 14A) quanto no NIL (30 min:  $0.90 \pm 0.08$  vs  $1.93 \pm 0.24$ ,  $**p < 0.01$ ; 60 min:  $0.87 \pm 0.06$  vs  $1.76 \pm 0.38$ ,  $*p < 0.05$ ; fig. 14D). O aumento da razão DOPAC/DA representa o incremento do turnover dopaminérgico em resposta à oPRL, o qual foi de 60% aos 30 min e 69% aos 60 min na ME, e de aproximadamente 100% no NIL em ambos os tempos. A concentração de dopamina foi reduzida no grupo injetado com oPRL aos 30 e 60 min na ME (30 min:  $63.48 \pm 9.15$  vs  $32.99 \pm 2.26$ , pg/ $\mu$ g proteína,  $**p < 0.01$ ; e 60 min:  $62.78 \pm 6.08$  vs  $32.85 \pm 4.26$  pg/ $\mu$ g proteína,  $**p < 0.01$ ; fig. 14B) e no NIL (30 min:  $8.60 \pm 0.80$  vs  $5.30 \pm 0.60$ ,  $p < 0.05$ ; e 60 min:  $9.51 \pm 0.80$  vs  $6.59 \pm 0.97$  pg/ $\mu$ g proteína,  $*p < 0.05$ , fig. 14E), o que reflete a redução do estoque vesicular de dopamina. Isoladamente, as concentrações de DOPAC na ME e NIL não foram diferentes entre os grupos experimentais. Coerente

com o aumento da razão DOPAC/dopamina e, presumivelmente, a maior liberação da dopamina dos estoques dos terminais de neurônios TIDA, houve redução das concentrações plasmáticas basais de PRL nos tempos 30 e 60 min (30 min:  $2.24 \pm 0.31$  vs  $1.05 \pm 0.18$  ng/mL,  $*p < 0.05$  e 60 min:  $2.30 \pm 0.75$  vs  $1.02 \pm 0.25$  ng/mL,  $*p < 0.05$ , fig. 14G). Adicionalmente, observou-se redução da concentração plasmática média de LH aos 60 min após a injeção de oPRL ( $1.95 \pm 0.25$  vs  $0.99 \pm 0.25$  ng/mL,  $*p < 0.05$ , fig. 14H). Não houve variação de resposta entre os tempos 30 e 60 min em nenhuma das análises realizadas no experimento.

A figura 15 apresenta a atividade dos terminais dopaminérgicos na POA e CPu de ratas após administração central de oPRL. Nossos dados demonstram que a oPRL exógena não foi capaz de alterar agudamente a atividade dopaminérgica na POA e no CPu, visto que não houve diferença entre os grupos experimentais na razão DOPAC/DA (fig. 15A e D), nas concentrações de dopamina (figura 15B e E) ou nas concentrações de DOPAC (fig. 15C e F) dessas áreas cerebrais. Somados, os dados indicam que a PRL exerce rápido efeito estimulatório sobre os neurônios TIDA e demais neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos. Esse efeito compreende o mecanismo de retroalimentação negativa para autocontrole da secreção de PRL, mas também parece representar uma via para supressão da secreção de LH através do aumento da liberação de dopamina na ME.



**Figura 14: Atividade dos neurônios TIDA e secreção de PRL e LH em resposta à injeção aguda de PRL.** Ratas ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (OVX+E2) por 3 dias receberam injeções intracerebroventricular (icv) de prolactina ovina (oPRL). Após 30 ou 60 min foram decapitadas ( $n = 8$  por grupo). Microdissecções da eminência mediana (ME) e lobo neuro-intermediário da hipófise (NIL) foram rapidamente congeladas para dosagens de dopamina e metabólito por HPLC-ED. Plasma proveniente de sangue do tronco foi utilizado para dosagens de PRL e LH por ELISA. (A, B, C) Razão DOPAC/dopamina, concentração de dopamina e concentração de DOPAC na ME, (D, E, F) Razão DOPAC/dopamina, concentração de dopamina e concentração de DOPAC no NIL. (G) Concentração plasmática de PRL. (H) Concentração plasmática de LH. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , determinado por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste Holm-Sidak. Dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM.

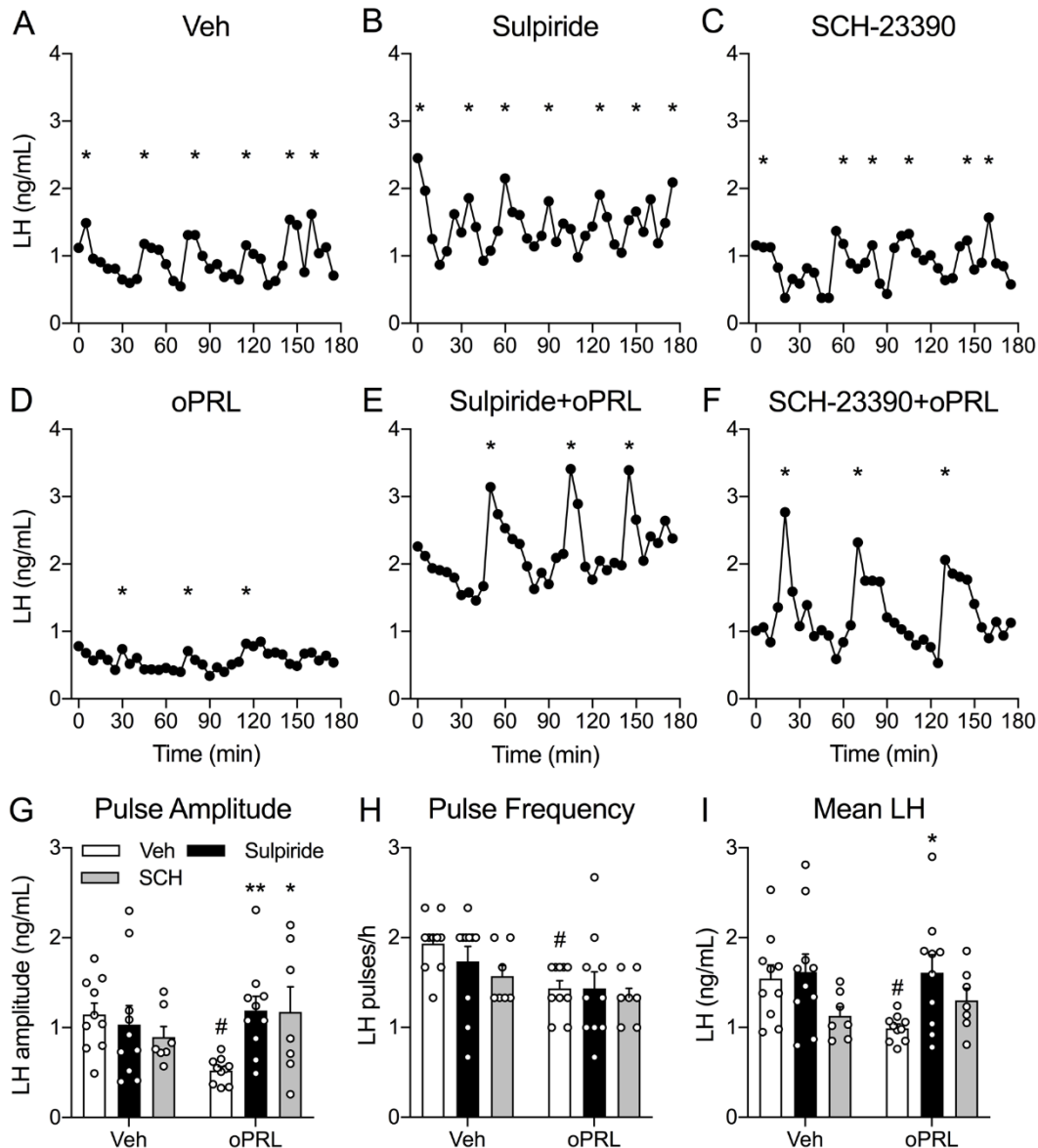


**Figura 15: Atividade dopaminérgica na área pré-óptica (POA) e no núcleo caudado e putâmen (CPu) em resposta à injeção aguda de PRL.** Ratas ovariectomizadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol (OVX+E2) por 3 dias receberam injeções intracerebroventricular (icv) de prolactina ovina (oPRL). Após 30 ou 60 min foram decapitadas ( $n = 8$  por grupo). Microdissecções da POA e CPu foram rapidamente congeladas para dosagens de dopamina e metabólito por HPLC-ED. (A, B, C) Razão DOPAC/dopamina, concentração de dopamina e concentração de DOPAC na POA. (D, E, F) Razão DOPAC/ dopamina, concentração de dopamina e concentração de DOPAC no CPu. Dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e comparados *por análise de variância ANOVA de duas vias* seguida do pós-teste Holm-Sidak.

**Experimento 4:** *Envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito inibitório da PRL sobre a secreção pulsátil de LH em ratas*

A figura 16 apresenta os efeitos do bloqueio da sinalização dopaminérgica com os antagonistas sulpirida e SCH-23390 sobre a inibição da secreção de LH induzida pela administração aguda de PRL em ratas OVX+E2 (35). Conforme esperado, quando comparamos os grupos Veh e oPRL, a ANOVA de duas vias detectou que a oPRL reduziu todos os parâmetros de pulsatilidade de LH: amplitude dos pulsos de LH ( $1.15 \pm 0.13$  vs  $0.52 \pm 0.04$  ng/mL,  $*p < 0.05$ , fig. 16G); frequência dos pulsos de LH ( $1.93 \pm 0.10$  vs  $1.43 \pm 0.08$  número de pulsos/hora,  $*p < 0.05$ ; fig. 16H); e concentração média de LH ( $1.54 \pm 0.15$  vs  $0.99 \pm 0.04$  ng/mL,  $*p < 0.05$ , fig. 16I). Ao comparar os grupos oPRL e Sulpirida+oPRL, observou-se que o bloqueio dos receptores D2 com sulpirida foi capaz de prevenir tanto o efeito inibitório da PRL sobre amplitude do pulso de LH ( $0.52 \pm 0.04$  vs  $1.19 \pm 0.16$  ng/mL,  $**p < 0.01$ ; fig. 16G) quanto a inibição do LH médio ( $0.99 \pm 0.04$  vs  $1.61 \pm 0.20$  ng/mL,  $**p < 0.01$ , fig. 14I), enquanto não apresentou efeito sobre a inibição da frequência dos pulsos de LH. Por sua vez, o bloqueio do receptor D1 com SCH23390 preveniu o efeito inibitório da PRL sobre a amplitude do pulso de LH ( $0.52 \pm 0.04$  vs  $1.17 \pm 0.28$  ng/mL,  $*p < 0.05$ , fig. 16G), mas não foi capaz de alterar a inibição da PRL sobre a frequência dos pulsos de LH e o LH médio. Assim, os dados aqui apresentados, além de corroborarem a eficácia do modelo de inibição aguda da pulsatilidade de LH com oPRL, demonstram que a ativação das vias de sinalização dos receptores dopaminérgicos, em especial do tipo D2, estão envolvidas no mecanismo neuroendócrino pelo qual a PRL suprime a amplitude dos pulsos de LH e o LH médio, mas não a frequência do gerador de pulso do GnRH.





**Figura 16. Bloqueio dos receptores dopaminérgicos dos tipos 1 (D1R) e 2 (D2R) previne inibição da secreção pulsátil de LH pela PRL.** Ratas ovariectomizadas tratadas com 17- $\beta$  estradiol (OVX+E2) receberam injeção intracerebroventricular (icv) dos antagonistas sulpirida ( $n = 10$ ) ou SCH-23390 ( $n = 7$ ) ou veículo (Veh;  $n = 10$ ). Após 15 min, foi realizada injeção subcutânea (sc) de prolactina ovina (oPRL) ou de solução salina (Veh). Trinta min após injeção de oPRL, amostras de sangue da cauda foram colhidas, a cada 5 min das 9:00 h as 12:00 h. Foi realizado pareamento do tratamento entre os animais, de modo que as ratas dos grupos Veh, Sulpirida e SCH-23390 receberam, de forma aleatória e em dias diferentes, tratamento com Veh e oPRL. A concentração de LH foi mensurada pelo método ELISA. (A, B e C) Exemplos representativos da secreção pulsátil de LH em ratas sem injeção de oPRL: (A) Veh, (B) Sulpirida e (C) SCH 23390. (D, E e F) Exemplos representativos da secreção pulsátil de LH em ratas com injeção de oPRL: (D) oPRL, (E) Sulpirida+oPRL e (F) SCH-23390+oPRL. Pulsos detectados pelo algoritmo Dynpeak estão indicados com asterisco. (G) Amplitude dos pulsos de LH, #  $p < 0.05$  vs Veh+Veh; \*\* $p < 0.01$  e \* $p < 0.05$  vs Veh+oPRL. (H) Número de pulsos de LH por hora, #  $p < 0.05$  vs Veh+Veh. (I) Concentração média de LH, #  $p < 0.05$  vs Veh+Veh; \* $p < 0.05$  vs Veh+oPRL. Análise estatística determinada por ANOVA de duas vias seguida de Holm-Sidak. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  EPM.

## **DISCUSSÃO**

A secreção pulsátil de GnRH dentro dos vasos porta-hipofisários na ME e a consequente liberação pulsátil de LH são reguladores chave da função reprodutiva. Desse modo, elucidar qualquer mecanismo ainda não compreendido, dentro desse contexto, além de contribuir para solução de problemas da área pode abrir portas para terapias inovadoras na área da reprodução e fertilidade. Assim, por meio de métodos experimentais complementares de estimulação e lesão dos neurônios TIDA, bem como do estímulo do mecanismo de retroalimentação negativa entre PRL e dopamina e do uso de ferramentas farmacológicas, nós demonstramos um mecanismo de supressão da liberação pulsátil de LH pela dopamina tuberoinfundibular, até então não revelado. Somados, os desenhos experimentais contemplaram estados de ausência e presença de hiperprolactinemia, os quais, portanto, se aplicam a momentos de manutenção de homeostasia, bem como a estados de perda de homeostase. Ademais, a redução da amplitude dos pulsos de LH após ativação seletiva dos neurônios TIDA e o aumento robusto da amplitude dos pulsos e da concentração média de LH associados ao aumento do número de corpos lúteo, após lesão seletiva desses neurônios, caracterizam o envolvimento da dopamina tuberoinfundibular como parte do mecanismo de controle da secreção pulsátil de GnRH/LH.

Primeiramente, utilizamos a ativação seletiva dos neurônios TIDA para investigar seu efeito sobre a secreção pulsátil de LH. Assim, com um protocolo agudo e pareado de estimulação dos neurônios TIDA, através da utilização de DREADDs, nosso resultado mostrou redução da amplitude dos pulsos de LH após ativação desses neurônios. Embora exista a preocupação dos DREADDs apresentarem efeitos na ausência do ligante (267), é muito bem aceita a segurança da seletividade de modelos animais que utilizam CNO para ativação dos DREADDs. Vale notar que Coutinho e cols. (268) demonstraram que a CNO não apresenta, por si só, efeitos sobre a pulsatilidade LH em animais controle, sem expressão de DREADDs. Também sendo reportada ausência de efeito da CNO sobre o pico de LH induzido por E2 (76). Além dessa comprovação de ausência de efeito inespecífico da CNO sobre a secreção pulsátil de

LH, validamos o nosso modelo com a confirmação da transfecção de DREADDs no ARC de ratos TH-Cre, através de imunofluorescência para TH e mCherry no ARC. Em seguida, certificamos a ativação dos DREADDs com a injeção de CNO por meio da co-expressão c-Fos e mCherry. Ainda, do ponto de vista funcional, a ativação dos neurônios TIDA resultou em esperada inibição da liberação de PRL. Portanto, as validações morfológicas e funcionais em nosso modelo, associadas ao uso de CNO validado em estudos anteriores como uma droga sem interferência sobre a secreção de LH, nos permitiu determinar, objetivamente, o efeito da ativação seletiva dos neurônios TIDA sobre a secreção pulsátil de LH. Assim, a redução da amplitude dos pulsos de LH revela o envolvimento dos neurônios TIDA e da dopamina tuberoinfundibular na inibição da secreção de LH.

No experimento 2, o aumento da amplitude dos pulsos e da concentração média de LH não foi acompanhado de aumento na concentração plasmática de PRL após a lesão parcial dos neurônios TIDA. A ausência de uma hiperprolactinemia pode ser justificada, em parte, pelo percentual intermediário de lesão alcançado, o qual esteve em torno de 50%. É conhecido que a 6-OHDA apresenta neurotoxicidade dependente da captação dopaminérgica pelo transportador DAT do espaço extracelular para o interior celular (232). Contudo, os neurônios TIDA apresentam um sistema de recaptação dopaminérgica de baixa afinidade, determinado em estudo funcionais de cinética de receptação *in vitro* (269, 270). Estes achados são consistentes com o relato de camundongos geneticamente modificados machos ou fêmeas apresentarem pouco mais de 30% de expressão de DAT em neurônios TIDA (271). Adicionalmente, embora os neurônios TIDA sejam virtualmente similares aos neurônios dopaminérgicos clássicos, e.g., nigroestriatais, em termos de aparato molecular para síntese, liberação e vias metabólicas, é sabido que essa população não sofre degeneração no cérebro com presença de doença parkinsoniana, de modo a sugerir a existência de fatores protetores adicionais presentes na população TIDA (272, 273). Essa característica neuroquímica peculiar dos neurônios TIDA condiz com a função neurosecretora dos

terminais hipofisiotróficos (269, 270, 274), e mostra-se coerente com apenas sutil redução da secreção de PRL após uso de inibidores de recaptção de dopamina, em um estudo com ratos (275). Desse modo, a menor capacidade de recaptção dopaminérgica pelos neurônios TIDA justifica o alcance parcial de lesão sobre os neurônios TIDA, devido a uma provável menor capacidade neurotóxica da 6-OHDA nesta população dopaminérgica. Entretanto, apesar da heterogeneidade de expressão de DAT em neurônios imunorreativos à TH no hipotálamo, consideramos o uso de 6-OHDA viável em nosso estudo, uma vez que o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), uma droga também utilizada para lesão de neurônios dopaminérgicos, não apresenta eficácia para os neurônios TIDA, seja periférica ou centralmente administrada (276-280). Interessantemente, embora não tenha sido prevista, a ausência de hiperprolactinemia em nosso modelo nos possibilitou separar os eventuais efeitos decorrentes da hiperprolactinemia dos efeitos resultantes da redução direta da dopamina tuberoinfundibular pela lesão dos neurônios TIDA. Assim, a manutenção das concentrações plasmáticas de PRL denota que o pronunciado aumento da amplitude do pulsos de LH e o conseqüente aumento no número de corpos lúteo são resultados da menor liberação de dopamina tuberoinfundibular, e não de uma eventual alteração na secreção de PRL. Ademais, os dados indicam que as projeções dopaminérgicas para a ME que modulam os terminais de neurônios GnRH, seja por contato sináptico ou transmissão de volume, são mais sensíveis à lesão neuroquímica do que os terminais dopaminérgicos neuroendócrinos nesta região, destinados ao controle da secreção hipofisária de PRL.

Após a lesão de neurônios TIDA observamos elevação das secreções de LH e E2 e aumento no número de corpos lúteos, sem aumento concomitante na secreção de FSH. Devido a síntese de E2 pelas células da granulosa do folículo ovariano ser estimulada pela ação conjunta de LH e FSH, o aumento da concentração de E2 é coerente com o aumento da concentração de LH. Nessa interação, o LH estimula a síntese de andrógenos nas células da teca dos folículos ovarianos, que por sua vez são convertidos

em estrógenos pela aromatase expressa nas células da granulosa, sob a influência do FSH (281-284). Diferentemente dos humanos, roedores apresentam corpos lúteos com vida útil ultracurta e apresentam uma fase lútea efêmera, uma vez que, não havendo cópula, após a ovulação o corpo lúteo se torna não funcional, com produção de progesterona insuficiente para estimular respostas uterinas. Entretanto, embora não funcional, 3 ou mais gerações de corpos lúteos podem ser evidentes no ovário durante o ciclo estral da rata (285). Desse modo, sem desconsiderar a possibilidade de aumento de algum dos diversos fatores luteotróficos ou redução de fatores luteolíticos (286), não investigados no presente estudo, o aumento da secreção de LH, que é um hormônio luteotrófico, poderia aumentar o tempo de permanência de corpos lúteos de gerações anteriores e justificaria o aumento do número de corpos lúteos encontrado em nosso estudo. Adicionalmente, o aumento no número de corpos lúteos não relacionado a alteração na concentração de FSH é corroborado com dados da literatura, uma vez que camundongos fêmeas com deficiência isolada de LH e sem alteração no FSH apresentam degeneração de folículos antrais e ausência de corpos lúteos (16). Por outro lado, muito embora o controle neuroendócrino do ciclo ovariano esteja relacionado à secreção pulsátil do GnRH/LH (38), o incremento substancial na amplitude dos pulsos de LH não foi acompanhado de alteração no ciclo estral das ratas, o que suscita investigações futuras. Portanto, nossos resultados indicam que o aumento da amplitude dos pulsos de LH, após a lesão dos neurônios TIDA de ratas ciclando, resulta em maior secreção de E2 e aumento da taxa ovulatória. Isso é consistente com o efeito dos pulsos aumentados de LH de promover o desenvolvimento de um maior número de folículos antrais pré-ovulatórios. Embora não avaliado no presente estudo, essas alterações encontradas também poderiam estar associadas a um aumento da magnitude do pico pré-ovulatório de LH, uma hipótese interessante que requer novos estudos para ser testada.

Um desdobramento decorrente dos resultados complementares de redução e aumento da amplitude dos pulsos de LH após estimulação e lesão de neurônios TIDA,

respectivamente, ambos sem variação da frequência, é o questionamento acerca de qual seria o impacto dos diferentes parâmetros de pulsatilidade sobre a reprodução. Portanto, nossos modelos abrem novas perspectivas de investigação sobre diferentes parâmetros de pulsatilidade de LH e função reprodutiva. Nosso dado de aumento de corpos lúteos, conseguinte ao aumento de pulsatilidade de LH, sugere que a amplitude do pulso de LH seja importante para a função ovariana, sobretudo quanto à taxa ovulatória. Entretanto, novos estudos são necessários para uma avaliação detalhada dos efeitos ovarianos dos diferentes parâmetros da secreção pulsátil de LH.

A manifesta evidência do envolvimento dos neurônios TIDA na pulsatilidade do LH, observada em nossos dados, criou a necessidade de excluirmos a ocorrência de eventual ativação de vias excitatórias da secreção de GnRH/LH, após a lesão dos neurônios TIDA. Há evidências na literatura de que os neurônios KNDy regulam a secreção de LH em ratos (46) e humanos (43, 44), e de que suas projeções fazem posições com corpos e terminações dos neurônios TIDA (117, 287). Ainda, a kisspeptina aumenta a secreção de PRL através da inibição de neurônios TIDA (117, 118), por meio de efeito indireto via receptor Kiss1r (120). Estudo recente em ovelhas demonstrou também que a dopamina hipotalâmica é capaz de suprimir a secreção de LH por meio da inibição dos neurônios KNDy, em mecanismo relacionado ao controle sazonal da reprodução nesta espécie (288). Entretanto, apesar da relação anatômica e funcional entre dopamina e kisspeptina no ARC, em nosso modelo de lesão dos neurônios TIDA, o aumento na pulsatilidade de LH não foi acompanhado de alteração na expressão de kisspeptina no ARC. Assim, é pouco provável que a kisspeptina hipotalâmica tenha mediado o efeito estimulatório da perda dos neurônios TIDA, o que reforça a sugestão de uma ação inibitória direta da dopamina sobre os neurônios GnRH.

Por exibirem sincronização com a secreção de pulsátil de GnRH, recentemente os neurônios KNDy foram reconhecidos como parte componente do gerador de pulso de GnRH em camundongos (69). Adicionalmente, há dados na literatura que mostram a eficácia do tratamento com kisspeptina em restaurar ciclo estral em camundongos

com hiperprolactinemia (112), bem como, uma perda de supressão da secreção pulsátil de LH em camundongos sem expressão de PRL-R especificamente nos neurônios KNDY, o que reforça o envolvimento desta população kisspeptinérgica na pulsatilidade de LH (116). Por outro lado, embora ainda carente de elucidação, a dopamina também parece estar envolvida na modulação eixo HPG. Essa catecolamina foi identificada como potente inibidor direto da excitabilidade neuronal de neurônios GnRH (74), bem como já fora demonstrado que terminais TH-ir apresentam justaposição com terminais de GnRH na ME de ovelhas (193). Recentemente, estes terminais GnRH foram reconhecidos morfológicamente como possível sítio para recebimento de inputs sinápticos (75). Portanto, em adição ao importante papel da kisspeptina na gênese da secreção pulsátil de GNRH, caracterizamos funcionalmente neste trabalho uma possível via inibitória dopaminérgica na ME envolvida na modulação do output de GNRH, com reflexo na magnitude dos pulsos de LH.

Como forma de determinar se o input de PRL seria capaz de ativar um mecanismo dopaminérgico durante a hiperprolactinemia, investigamos as respostas da atividade dopaminérgica na ME, NIL, POA e CPu frente ao tratamento icv com oPRL, correlacionadas com alterações nas secreções de PRL e LH. É sabido que as concentrações de dopamina e DOPAC em microdissecções cerebrais refletem o estoque e a liberação de neurotransmissores, respectivamente (117, 119, 175). Em estudo anterior, observamos que razão DOPAC/dopamina fornece um índice mais sensível de alterações rápidas da atividade dopaminérgica na ME (120). Assim, a razão DOPAC/dopamina indicou uma maior atividade dopaminérgica nos terminais neuroendócrinos na ME e NIL, o que foi coerente com a redução da concentração plasmática de PRL. Esses dados são corroborados pela literatura, uma vez que uma alteração da atividade neuronal dopaminérgica na ME é, normalmente, inversamente proporcional à secreção de PRL (138). Juntos, o aumento da razão dopaminérgica e a conseguinte redução de PRL plasmática após o estímulo com oPRL validam o nosso



resultado de ativação aguda dos neurônios TIDA em uma condição de aumento de PRL em uma janela temporal consistente com a inibição da secreção de LH.

Nossos dados mostraram que 30 min foi um tempo de resposta suficiente para oPRL ativar a resposta dopaminérgica e suprimir a concentração de PRL. Sob esse aspecto, estudos anteriores *in vivo* que avaliaram a ativação dopaminérgica pela PRL exógena foram realizados com metodologias distintas e demonstraram um padrão consideravelmente mais lento dessa resposta, quando comparados aos nossos dados aqui apresentados. Em um experimento com ratos machos castrados, foi relatado um aumento no turnover dopaminérgico dos neurônios TIDA do segundo ao sexto dia de exposição à oPRL (289). Em estudos prévios em ratos, o menor curso de tempo de ação da PRL sobre a atividade dopaminérgica, caracterizado por aumento da síntese de dopamina ou do turnover dopaminérgico, foi determinado como sendo de 4 horas após tratamento central em ratas (187) e, no caso de administração sistêmica de oPRL, foi entre 2 e 4 horas em ratas (290) e entre 3 e 4 horas em ratos (176). Adicionalmente, Demarest & cols. (187) relataram um segundo aumento da síntese de dopamina, 12 horas após a administração icv de PRL, o que representa uma resposta de caráter ainda mais tardio. Em ambos os casos, as respostas observadas ainda eram muito lentas para justificar envolvimento na inibição da secreção de PRL e LH, que em estudo anterior (35) e no presente trabalho observamos iniciar entre 30 min e 1 hora após administração sistêmica de oPRL. Assim, de acordo com o nosso conhecimento, nossos dados demonstram pela primeira vez um componente rápido de resposta de ativação dos neurônios TIDA ao aumento agudo dos níveis de PRL central. Isso denota a velocidade *in vivo* da ativação da alça curta de retroalimentação negativa entre PRL e dopamina, coerente com supressão aguda das secreções de PRL e LH.

O aumento da atividade dopaminérgica observado no NIL nos faz refletir sobre quanto poderíamos assegurar ser a redução da liberação de LH, observada em nosso modelo, oriunda dos neurônios TIDA e não das demais populações dopaminérgicas neuroendócrinas envolvidas na alça de retroalimentação da PRL. A esse respeito já foi

visto que 100% dos neurônios TIDA demonstram rápido aumento da taxa de disparo após tratamento com PRL, enquanto apenas 5% dos neurônios PHDA alteram sua atividade elétrica após administração aguda de PRL (113). Portanto, é predominante a ativação dos neurônios TIDA após o uso de PRL exógena. Além disso, os terminais dopaminérgicos no NIL secretam dopamina que pode atingir a adenohipófise via vasos porta curtos e, portanto, podem modular a secreção de PRL. Por outro lado, não possuem acesso anatômico aos terminais GnRH na ME, o que torna improvável sua ação sobre a liberação deste peptídeo. Assim, os neurônios TIDA parecem estar envolvidos no papel inibitório sobre a secreção de LH demonstrado em nossos dados, uma vez que os terminais no NIL, também relacionados ao controle da secreção de PRL, podem ser excluídos por sua localização anatômica.

Um outro ponto a ser discutido é acerca da localização do mecanismo proposto. Embora o provável envolvimento inibitório dos neurônios TIDA sobre a secreção de LH tenha sido corroborado pelo somatório dos experimentos de estimulação e lesão neste estudo, é conhecido que contatos entre os terminais imunorreativos à TH ocorrem tanto nos corpos, quanto nos terminais de GnRH (193, 194). Assim, o envolvimento apenas de populações dopaminérgicas neuroendócrinas na resposta ao aumento da PRL, demonstrado pelo aumento da atividade dopaminérgica apenas na ME e NIL, sugere que a redução da secreção de LH pela dopamina em situação de hiperprolactinemia não deve ocorrer por ação sobre os corpos celulares de GnRH na POA, uma vez que não identificamos alterações da atividade de dopamina nesta área, assim como no CPu, região utilizada como controle negativo. Portanto, embora existam contatos imunorreativos de células positivas para TH com os corpos de GnRH localizados na POA, este não parece ser o sítio no qual a dopamina inibe a liberação pulsátil de LH em resposta ao aumento da PRL. De modo a corroborar nosso achado, além de ser conhecido que em torno de 70% dos neurônios GnRH são hipofisiotróficos (192, 291), um estudo recente mostrou que os neurônios GnRH utilizam compartimentos neuronais distintos para gerar os padrões de pico e de pulso de LH, sendo o terminal neuronal na

ME o sítio crucial para geração da secreção pulsátil (76). Neste sentido, nossos resultados sugerem que a dopamina tuberoinfundibular é a responsável pela redução da amplitude dos pulsos de LH em uma situação de aumento de PRL central, através de inibição dos terminais dos neurônios GnRH na ME.

Utilizamos ferramentas farmacológicas para investigar o efeito dos receptores dopaminérgicos na supressão da pulsatilidade do LH em um modelo agudo de hiperprolactinemia induzido por injeção de oPRL em ratas OVX+E2 (35). Os dados demonstram o envolvimento dos receptores D2R e D1R na inibição da amplitude dos pulsos de LH pela PRL. Nosso modelo apresentou redução da frequência e amplitude dos pulsos de LH e do LH médio decorrente de uma alta concentração de PRL. Sobre esse aspecto, existem dados consistentes na literatura sobre a redução da secreção de LH pela PRL em modelos de hiperprolactinemia aguda e crônica (35, 98, 99, 116). Vimos que o bloqueio da sinalização de D2R preveniu os efeitos inibitórios da PRL tanto sobre a amplitude dos pulsos de LH como na concentração média de LH. Contudo, apesar do bloqueio do efeito ter sido mediado pelo D2R em maior proporção, o bloqueio de D1R também se mostrou efetivo em menor grau, uma vez que seu efeito restaurou a amplitude dos pulsos de LH. Vale ressaltar que o efeito clássico de ação inibitória dopaminérgica sobre a secreção da PRL ocorre através de D2R (130, 132, 147-150, 292), um receptor com função inibitória. Por outro lado, o D1R apresenta ação oposta ao D2R (137). Assim, D1R e D2R apresentam mecanismos de ações celulares opostos, de forma que os mecanismos que determinam o envolvimento de ambos os receptores na inibição dos pulsos de LH ainda precisam ser melhor elucidados. Em consonância com nossos dados, um estudo investigando a excitabilidade de neurônios GnRH de camundongos demonstrou ação inibitória da dopamina via tanto D1R quanto D2R (74). De toda forma, os efeitos dos antagonistas representam ações centrais, não sendo secundários a alterações da secreção de PRL.

Acerca do aumento da secreção de LH após uso de sulpirida, recentemente foi relatado que este antagonista de D2R aumentou a concentração plasmática de LH e

GnRH, bem como a expressão do receptor para GnRH no hipotálamo e na adenohipófise de ovelhas (293). Ademais, é conhecido que aproximadamente 50% dos corpos celulares dos neurônios GnRH de ovelhas apresentam D2R, os quais podem ser transportados e encontrados nos terminais de GnRH para ME (294). Referente aos D1R, são também transportados para os terminais neuronais (295), e tanto D1R quanto D2R são encontrados no ARC e na parte lateral da camada externa da ME de ratos (296). Adicionalmente, estudos farmacológicos demonstram que sob condições basais, os neurônios TIDA de ratos machos são tonicamente inibidos pelos D1R, de uma maneira indireta (297, 298). Desse modo, se o somatório dos nossos dados mostram que a ativação dos neurônios TIDA reduz a secreção pulsátil de LH, esse papel inibitório de D1R sobre atividade dopaminérgica dos neurônios TIDA poderia explicar o menor efeito de D1R em reverter a redução da secreção pulsátil de LH induzida pela PRL. Assim, podemos inferir que além de inibir a amplitude dos pulsos de LH através do D2R, a dopamina tuberoinfundibular também pode fazê-lo por meio de D1R. Adicionalmente, é importante reiterar que a ME foi também o local de aumento da atividade dopaminérgica em resposta à PRL. Portanto, a ME mostra-se um local factível para a ação inibitória da dopamina sobre as terminações dos neurônios GnRH, por meio da ativação de receptores dopaminérgicos D2R e D1R.

Em relação aos mecanismos de conectividade, sabe-se que em geral a sinalização entre neurônios requer potenciais de ação nas células pré-sinápticas a fim de liberar neurotransmissor na fenda sináptica. Como ocorre classicamente, nos neurônios GnRH a zona de iniciação do potencial de ação localiza-se em regiões próximas aos corpos celulares (75, 299, 300). Enquanto a liberação de GnRH induzida pelo aumento farmacológico de cálcio intracelular depende da geração de potencial de ação, o mesmo não ocorre para a liberação de GnRH na ME induzida por kisspeptina, que não requer potencial de ação mas apenas influxo local de cálcio (301). Neste sentido, estudos prévios indicam que as projeções de neurônios GnRH localizadas nas bordas da ME recebem uma variedade de contatos sinápticos antes de se ramificarem

em terminais axonais (302). Funcionalmente, as projeções GnRH para a ME são capazes de controlar a secreção pulsátil GnRH de forma autônoma em relação ao corpo celular localizado no prosencéfalo rostral (76). Portanto, não parece provável que a propagação de potencial de ação até os terminais do neurônio GnRH seja requerida para o controle da pulsatilidade de LH, de modo a sugerir que a pulsatilidade do LH seja controlada majoritariamente por inputs às projeções distais desses neurônios.

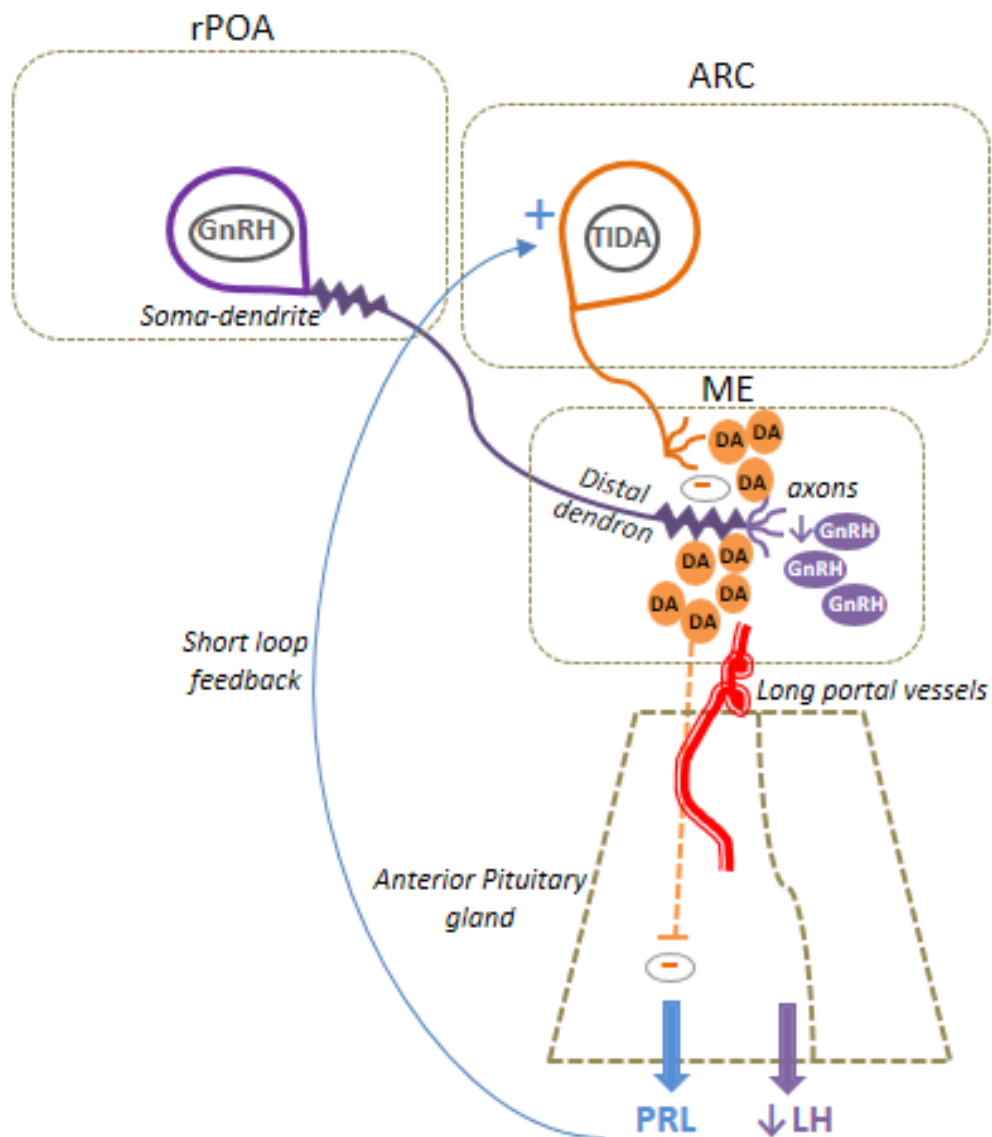
De uma maneira complementar, os resultados de estimulação e lesão de neurônios TIDA demonstram que a ativação desses neurônios e conseguinte liberação de dopamina reduz a secreção pulsátil de LH. Os dados mostram, ainda, redução da secreção de LH após estimulação dos neurônios TIDA em um estado de aumento de PRL central. Adicionalmente, diante da inibição da secreção pulsátil de LH após indução de um estado de hiperprolactinemia, os receptores D1R e D2R parecem envolvidos neste mecanismo. Assim, de acordo com os resultados aqui apresentados, a figura 17 descreve o mecanismo proposto no qual a secreção de dopamina pelos neurônios TIDA na ME, estimulada pela PRL, inibe a amplitude dos pulsos de LH, sem alterar a frequência da pulsatilidade, muito provavelmente governada pelos neurônios KNDy no mecanismo gerador de pulsos de GnRH. Assim, esta ação inibitória da dopamina parece ocorrer sobre os terminais dos neurônios GnRH na ME durante estados de homeostasia, bem como em estados de hiperprolactinemia, de modo a se contrapor aos sinais estimulatórios para o GnRH. Neste modelo, na hiperprolactinemia, a maior ativação dos neurônios TIDA seria responsável por uma maior inibição dopaminérgica sobre os terminais GnRH.

**CONCLUSÃO**

Os resultados aqui apresentados fornecem evidências para um novo papel da dopamina tuberoinfundibular como regulador inibitório da amplitude dos pulsos de LH através de uma atuação nos terminais dos neurônios GnRH na ME. O mecanismo mostrou-se presente em condições experimentais fisiológicas e de hiperprolactinemia. Na hiperprolactinemia, o aumento da ativação dos neurônios TIDA e a conseguinte liberação de dopamina na ME revela-se como um novo mecanismo a contribuir para a supressão da secreção de LH e, conseqüentemente, o quadro de infertilidade induzido por hiperprolactinemia.

**MECANISMO PROPOSTO**





**Figura 17: Mecanismo proposto para a ação inibitória da dopamina tuberoinfundibular sobre a secreção do LH.** Neurônios GnRH e TIDA secretam GnRH e dopamina na ME, respectivamente. Os neurônios TIDA têm efeito inibitório sobre a amplitude dos pulsos de LH. A PRL ativa a secreção de dopamina pelos neurônios TIDA na ME, o que suprime a secreção pulsátil de LH. Esta ação inibitória da dopamina parece ocorrer sobre os terminais dos neurônios GnRH na ME, e não sobre os neurônios kisspeptina que compõem o gerador de pulso de GnRH. Este mecanismo pode ocorrer em estados de homeostasia, bem como em estados de hiperprolactinemia. Neste último, o aumento da concentração de PRL culmina em maior ativação dos neurônios TIDA e por conseguinte maior inibição dopaminérgica sobre os terminais GnRH. Área pré-óptica rostral (rPOA), núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), eminência mediana (ME), neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA), prolactina (PRL), dopamina (DA).

## REFERÊNCIAS

1. Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 1982;111(5):1737-9.
2. Moenter SM, Brand RM, Midgley AR, Karsch FJ. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology*. 1992;130(1):503-10.
3. Silverman A, Livne I, Witkin J. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. In: Knobil E, Neill J, editors. *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988. p. 1683-710.
4. Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci*. 1987;7(8):2312-9.
5. Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology*. 1982;35(6):429-38.
6. Clayton RN. Gonadotrophin releasing hormone: from physiology to pharmacology. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987;26(3):361-84.
7. Clayton RN. Mechanism of GnRH action in gonadotrophs. *Hum Reprod*. 1988;3(4):479-83.
8. Plant TM, Marshall GR. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev*. 2001;22(6):764-86.
9. Dalkin AC, Haisenleder DJ, Gilrain JT, Aylor K, Yasin M, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin subunit gene expression in female rats: actions on follicle-stimulating hormone beta messenger ribonucleic acid (mRNA) involve differential expression of pituitary activin (beta-B) and follistatin mRNAs. *Endocrinology*. 1999;140(2):903-8.
10. Kirk SE, Dalkin AC, Yasin M, Haisenleder DJ, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology*. 1994;135(3):876-80.
11. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Regulation of gonadotropin gene expression. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press; 1994.
12. Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1981;109(2):376-85.
13. Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*. 2010;31(4):544-77.
14. Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4(1):2-7.
15. Ilahi S, Ilahi TB. *Anatomy, Adenohypophysis (Pars Anterior, Anterior Pituitary)*. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.
16. Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17294-9.
17. Huhtaniemi I. Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;254-255:84-90.
18. Huhtaniemi I, Ahtiainen P, Pakarainen T, Rulli SB, Zhang FP, Poutanen M. Genetically modified mouse models in studies of luteinising hormone action. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252(1-2):126-35.

19. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1978;202(4368):631-3.
20. Fourman LT, Fazeli PK. Neuroendocrine causes of amenorrhea--an update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):812-24.
21. Martin K, Santoro N, Hall J, Filicori M, Wierman M, Crowley WF, Jr. Clinical review 15: Management of ovulatory disorders with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(5):1081A-G.
22. Clarke IJ. Variable patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion during the estrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 1993;133(4):1624-32.
23. Evans NP, Dahl GE, Mauger DT, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ. Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. *Endocrinology*. 1995;136(12):5511-9.
24. Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod*. 1997;56(2):303-9.
25. Plant TM. A comparison of the neuroendocrine mechanisms underlying the initiation of the preovulatory LH surge in the human, Old World monkey and rodent. *Front Neuroendocrinol*. 2012;33(2):160-8.
26. Czielesky K, Prescott M, Porteous R, Campos P, Clarkson J, Steyn FJ, Campbell RE, Herbison AE. Pulse and Surge Profiles of Luteinizing Hormone Secretion in the Mouse. *Endocrinology*. 2016;157(12):4794-802.
27. Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson LE, Knobil E. Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*. 1970;87(5):850-3.
28. Caraty A, Orgeur P, Thiery JC. [Demonstration of the pulsatile secretion of LH-RH into hypophysial portal blood of ewes using an original technic for multiple samples]. *C R Seances Acad Sci III*. 1982;295(2):103-6.
29. Herbison AE. The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology*. 2018;159(11):3723-36.
30. Kinsey-Jones JS, Li XF, Luckman SM, O'Byrne KT. Effects of kisspeptin-10 on the electrophysiological manifestation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female rat. *Endocrinology*. 2008;149(3):1004-8.
31. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci*. 2010;30(8):3124-32.
32. Santen RJ, Bardin CW. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest*. 1973;52(10):2617-28.
33. Bennet A, Lacaze JC, Caron P, Berrada R, Barbe P, Louvet JP. Correlations between mean LH levels and LH pulse characteristics: differences between normal and anovulatory women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991;35(5):431-7.
34. Clarke H, Dhillon WS, Jayasena CN. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015;30(2):124-41.
35. Silva JF, Henriques PC, Campideli-Santana AC, Araujo-Lopes R, Aquino NSS, Hipolito LTM, Lopes-Aguiar C, Reis AM, Grattan DR, Szawka RE. Estradiol Potentiates But Is Not Essential for Prolactin-Induced Suppression of Luteinizing Hormone Pulses in Female Rats. *Endocrinology*. 2020;161(4).
36. Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology*. 1990;51(3):276-83.

37. Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 2000;141(9):3506-9.
38. 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(19):8173-7.
39. 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(2):271-80.
40. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(17):1614-27.
41. De Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(19):10972-6.
42. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):485-500.
43. Jayasena CN, Dhillo WS, Bloom SR. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. *Peptides*. 2009;30(1):76-82.
44. Chan YM, Butler JP, Sidhoum VF, Pinnell NE, Seminara SB. Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):E1458-67.
45. Millar RP, Sonigo C, Anderson RA, George J, Maione L, Brailly-Tabard S, Chanson P, Binart N, Young J. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Reactivation by Kisspeptin-10 in Hyperprolactinemic Women With Chronic Amenorrhea. *J Endocr Soc*. 2017;1(11):1362-71.
46. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*. 2005;146(1):156-63.
47. Smith JT, Li Q, Yap KS, Shahab M, Roseweir AK, Millar RP, Clarke IJ. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology*. 2011;152(3):1001-12.
48. 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(49):11349-56.
49. 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(9):4605-14.
50. Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(8):452-66.
51. de Tassigny XdA, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(25):10714-9.
52. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1235-316.
53. 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*. 2005;146(7):2976-84.

54. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005;146(9):3686-92.
55. Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*. 2008;57(2):277-87.
56. Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(4):305-11.
57. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009;30(6):713-43.
58. Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP, O'Byrne KT. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One*. 2009;4(12):e8334.
59. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, Clifton DK, Tena-Sempere M, Steiner RA. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(1):E202-10.
60. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci*. 2009;29(12):3920-9.
61. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010;151(8):3479-89.
62. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol*. 2006;498(5):712-26.
63. 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(38):11859-66.
64. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. 2007;148(12):5752-60.
65. Halasz B, Gorski RA. Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology*. 1967;80(4):608-22.
66. Soper BD, Weick RF. Hypothalamic and extrahypothalamic mediation of pulsatile discharges of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Endocrinology*. 1980;106(1):348-55.
67. Blake CA, Sawyer CH. Effects of hypothalamic deafferentation on the pulsatile rhythm in plasma concentrations of luteinizing hormone in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1974;94(3):730-6.
68. Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL, Millar RP, Cernea M, Coolen LM, Lehman MN. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology*. 2013;154(11):4259-69.
69. Clarkson J, Han SY, Piet R, McLennan T, Kane GM, Ng J, Porteous RW, Kim JS, Colledge WH, Iremonger KJ, Herbison AE. Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(47):E10216-E23.

70. Bertrand F, Thiery J, Picard S, Malpoux B. Implication of D2-like dopaminergic receptors in the median eminence during the establishment of long-day inhibition of LH secretion in the ewe. *J Endocrinol.* 1999;163(2):243-54.
71. Goodman RL, Maltby MJ, Millar RP, Hileman SM, Nestor CC, Whited B, Tseng AS, Coolen LM, Lehman MN. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrus ewes. *Endocrinology.* 2012;153(12):5918-27.
72. Lacau-Mengido IM, Becu-Villalobos D, Thyssen SM, Rey EB, Lux-Lantos VA, Libertun C. Antidopaminergic-induced hypothalamic LHRH release and pituitary gonadotrophin secretion in 12 day-old female and male rats. *J Neuroendocrinol.* 1993;5(6):705-9.
73. Berga SL, Loucks AB, Rossmanith WG, Kettel LM, Laughlin GA, Yen SS. Acceleration of luteinizing hormone pulse frequency in functional hypothalamic amenorrhea by dopaminergic blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72(1):151-6.
74. Liu X, Herbison AE. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology.* 2013;154(1):340-50.
75. Herde MK, Iremonger KJ, Constantin S, Herbison AE. GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. *J Neurosci.* 2013;33(31):12689-97.
76. Wang L, Guo W, Shen X, Yeo S, Long H, Wang Z, Lyu Q, Herbison AE, Kuang Y. Different dendritic domains of the GnRH neuron underlie the pulse and surge modes of GnRH secretion in female mice. *Elife.* 2020;9.
77. Ben-Jonathan N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev.* 1985;6(4):564-89.
78. Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. The preparation, identification and assay of prolactin - a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology.* 1933( Legacy Content):191-216.
79. Grattan DR. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol.* 2015;226(2):T101-22.
80. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1523-631.
81. 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(3):225-68.
82. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology.* 1974;94(6):1704-8.
83. Morishige WK, Rothchild I. Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology.* 1974;95(1):260-74.
84. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):752-63.
85. Brown RSE, Aoki M, Ladyman SR, Phillipps HR, Wyatt A, Boehm U, Grattan DR. Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(40):10779-84.
86. Delvoe P, Delogne-Desnoeck J, Robyn C. Hyperprolactinaemia during prolonged lactation: evidence for anovulatory cycles and inadequate corpus luteum. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1980;13(3):243-7.
87. Perez A. Lactational amenorrhea and natural family planning in human ovulation, mechanisms, prediction, and induction. New York, North Holland: Hum Reprod Med; 1979.
88. Patel SS, Bamigboye V. Hyperprolactinaemia. *J Obstet Gynaecol.* 2007;27(5):455-9.
89. De Rosa M, Zarrilli S, Di Sarno A, Milano N, Gaccione M, Boggia B, Lombardi G, Colao A. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. *Endocrine.* 2003;20(1-2):75-82.

90. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62:2-10.
91. Mah PM, Webster J. Hyperprolactinemia: etiology, diagnosis, and management. *Semin Reprod Med.* 2002;20(4):365-74.
92. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(5):265-75.
93. Grattan DR, Jasoni CL, Liu X, Anderson GM, Herbison AE. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology.* 2007;148(9):4344-51.
94. Matsuzaki T, Azuma K, Irahara M, Yasui T, Aono T. Mechanism of anovulation in hyperprolactinemic amenorrhea determined by pulsatile gonadotropin-releasing hormone injection combined with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril.* 1994;62(6):1143-9.
95. Bohnet HG, Dahlen HG, Wuttke W, Schneider HP. Hyperprolactinemic anovulatory syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;42(1):132-43.
96. Cohen-Becker IR, Selmanoff M, Wise PM. Hyperprolactinemia alters the frequency and amplitude of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology.* 1986;42(4):328-33.
97. Fox SR, Hoefer MT, Bartke A, Smith MS. Suppression of pulsatile LH secretion, pituitary GnRH receptor content and pituitary responsiveness to GnRH by hyperprolactinemia in the male rat. *Neuroendocrinology.* 1987;46(4):350-9.
98. Park SK, Keenan MW, Selmanoff M. Graded hyperprolactinemia first suppresses LH pulse frequency and then pulse amplitude in castrated male rats. *Neuroendocrinology.* 1993;58(4):448-53.
99. Park SK, Selmanoff M. Dose-dependent suppression of postcastration luteinizing hormone secretion exerted by exogenous prolactin administration in male rats: a model for studying hyperprolactinemic hypogonadism. *Neuroendocrinology.* 1991;53(4):404-10.
100. Maneckjee R, Srinath BR, Moudgal NR. Prolactin suppresses release of luteinising hormone during lactation in the monkey. *Nature.* 1976;262(5568):507-8.
101. Moulton PJ, Rees LH, Besser GM. Pulsatile gonadotrophin secretion in hyperprolactinaemic amenorrhoea and the response to bromocriptine therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1982;16(2):153-62.
102. Bouchard P, Lagoguey M, Brailly S, Schaison G. Gonadotropin-releasing hormone pulsatile administration restores luteinizing hormone pulsatility and normal testosterone levels in males with hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(2):258-62.
103. Sarkar DK, Yen SS. Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: a possible role for beta-endorphin as a mediator. *Endocrinology.* 1985;116(5):2080-4.
104. Cutie E, Andino NA. Prolactin inhibits the steroidogenesis in midfollicular phase human granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Fertil Steril.* 1988;49(4):632-7.
105. Lecomte P, Lecomte C, Lansac J, Gallier J, Sonier CB, Simonetta C. Pregnancy after intravenous pulsatile gonadotropin-releasing hormone in a hyperprolactinaemic woman resistant to treatment with dopamine agonists. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997;74(2):219-21.
106. Polson DW, Sagle M, Mason HD, Adams J, Jacobs HS, Franks S. Ovulation and normal luteal function during LHRH treatment of women with hyperprolactinaemic amenorrhoea. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1986;24(5):531-7.
107. Gindoff PR, Loucopoulos A, Jewelewicz R. Treatment of hyperprolactinemic amenorrhea with pulsatile gonadotropin-releasing hormone therapy. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1156-8.
108. Koike K, Aono T, Miyake A, Tasaka K, Chatani F, Kurachi K. Effect of pituitary transplants on the LH-RH concentrations in the medial basal hypothalamus and hypophyseal portal blood. *Brain Res.* 1984;301(2):253-8.

109. Weber RF, de Greef WJ, de Koning J, Vreeburg JT. LH-RH and dopamine levels in hypophysial stalk plasma and their relationship to plasma gonadotrophins and prolactin levels in male rats bearing a prolactin- and adrenocorticotrophin-secreting pituitary tumor. *Neuroendocrinology*. 1983;36(3):205-10.
110. Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology*. 2011;152(2):526-35.
111. Li Q, Rao A, Pereira A, Clarke IJ, Smith JT. Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J Neuroendocrinol*. 2011;23(10):871-82.
112. Sonigo C, Bouilly J, Carre N, Tolle V, Caraty A, Tello J, Simony-Conesa FJ, Millar R, Young J, Binart N. Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3791-5.
113. 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(5):2375-84.
114. Brown RS, Herbison AE, Grattan DR. Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. *J Neuroendocrinol*. 2014;26(12):898-908.
115. 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(3):1010-20.
116. Brown RSE, Khant Aung Z, Phillipps HR, Barad Z, Lein HJ, Boehm U, Szawka RE, Grattan DR. Acute Suppression of LH Secretion by Prolactin in Female Mice Is Mediated by Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus. *Endocrinology*. 2019;160(5):1323-32.
117. 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(7):3247-57.
118. 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(2):88-99.
119. 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(6):1812-26.
120. Aquino NSS, Kokay IC, Perez CT, Ladyman SR, Henriques PC, Silva JF, Broberger C, Grattan DR, Szawka RE. Kisspeptin Stimulation of Prolactin Secretion Requires Kiss1 Receptor but Not in Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons. *Endocrinology*. 2019;160(3):522-33.
121. Daniel PM, Prichard MM. Studies of the hypothalamus and the pituitary gland with special reference to the effects of transection of the pituitary stalk. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1975;201:1-216.
122. Vaughan L, Carmel PW, Dyrenfurth I, Frantz AG, Antunes JL, Ferin M. Section of the pituitary stalk in the rhesus monkey. I. Endocrine studies. *Neuroendocrinology*. 1980;30(2):70-5.
123. Polishuk WZ, Kulcsar S. Effects of chlorpromazine on pituitary function. *J Clin Endocrinol Metab*. 1956;16(2):292-3.
124. Knegtering H, Boks M, Blijd C, Castelein S, van den Bosch RJ, Wiersma D. A randomized open-label comparison of the impact of olanzapine versus risperidone on sexual functioning. *J Sex Marital Ther*. 2006;32(4):315-26.
125. Meltzer HY, Sachar EJ, Frantz AG. Serum prolactin levels in newly admitted psychiatric patients. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1974;12(0):299-315.



126. MacLeod RM, Fontham EH, Lehmeyer JE. Prolactin and growth hormone production as influenced by catecholamines and agents that affect brain catecholamines. *Neuroendocrinology*. 1970;6(5):283-94.
127. 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(2):452-8.
128. De Greef WJ, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology*. 1979;105(5):1093-9.
129. Gibbs DM, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology*. 1978;102(6):1895-900.
130. Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ. Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci*. 1990;10(8):2587-600.
131. Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*. 1997;19(1):103-13.
132. Saiardi A, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron*. 1997;19(1):115-26.
133. SHAAR CJ, CLEMENS JA. The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. *Endocrinology*. 1974;95(5):1202-12.
134. Bishop W, Fawcett C, Krulich L, McCann S. Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. *Endocrinology*. 1972;91(3):643-56.
135. Everett JW. Luteotrophic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology*. 1954;54(6):685-90.
136. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998;78(1):189-225.
137. Burris TP, Nguyen DN, Smith SG, Freeman ME. The stimulatory and inhibitory effects of dopamine on prolactin secretion involve different G-proteins. *Endocrinology*. 1992;130(2):926-32.
138. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*. 2001;22(6):724-63.
139. Holzbauer M, Racke K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Medical biology*. 1985;63(3):97-116.
140. Holzbauer M, Sharman D, Godden U. Observations on the function of the dopaminergic nerves innervating the pituitary gland. *Neuroscience*. 1978;3(12):1251-62.
141. Kawano H, Daikoku S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 1987;265(2):242-53.
142. Goudreau JL, Lindley SE, Lookingland KJ, Moore KE. Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology*. 1992;56(1):100-5.
143. Fuxe K. Cellular Localization of Monoamines in the Median Eminence and the Infundibular Stem of Some Mammals. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1964;61:710-24.
144. Agnati LF, Fuxe K, Hokfelt T, Goldstein M, Jeffcoate SL. A method to measure the distribution pattern of specific nerve terminals in sampled regions. Studies on tyrosine hydroxylase LHRH, TRH and GIH immunofluorescence. *J Histochem Cytochem*. 1977;25(11):1222-36.

145. Lyons DJ, Broberger C. TIDAL WAVES: Network mechanisms in the neuroendocrine control of prolactin release. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(4):420-38.
146. Ben-Jonathan N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine reviews.* 1985;6(4):564-89.
147. Gudelsky GA, Porter JC. Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. *Endocrinology.* 1980;106(2):526-9.
148. Lerant A, Freeman ME. Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res.* 1998;802(1-2):141-54.
149. Milenkovic L, Parlow AF, McCann SM. Physiological significance of the negative short-loop feedback of prolactin. *Neuroendocrinology.* 1990;52(4):389-92.
150. Peters LL, Hoefler MT, Ben-Jonathan N. The posterior pituitary: regulation of anterior pituitary prolactin secretion. *Science.* 1981;213(4508):659-61.
151. Kaiser UB. Hyperprolactinemia and infertility: new insights. *J Clin Invest.* 2012;122(10):3467-8.
152. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA, Endocrine S. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):273-88.
153. Schlechte JA. Long-term management of prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):2861-5.
154. Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC. Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem.* 1991;266(34):22919-25.
155. Maurer RA. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem.* 1982;257(5):2133-6.
156. Ishida M, Mitsui T, Yamakawa K, Sugiyama N, Takahashi W, Shimura H, Endo T, Kobayashi T, Arita J. Involvement of cAMP response element-binding protein in the regulation of cell proliferation and the prolactin promoter of lactotrophs in primary culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(6):E1529-37.
157. Phillipps HR, Yip SH, Grattan DR. Patterns of prolactin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;502:110679.
158. Piercy M, Shin S. Comparative studies of prolactin secretion in estradiol-primed and normal male rats induced by ether stress, pimozide and TRH. *Neuroendocrinology.* 1980;31(4):270-5.
159. Rondeel JM, de Greef WJ, Visser TJ, Voogt JL. Effect of suckling on the in vivo release of thyrotropin-releasing hormone, dopamine and adrenaline in the lactating rat. *Neuroendocrinology.* 1988;48(1):93-6.
160. Samson W, Schell D. Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Advances in experimental medicine and biology.* 1995;395:355-64.
161. Johnston CA, Negro-Vilar A. Role of oxytocin on prolactin secretion during proestrus and in different physiological or pharmacological paradigms. *Endocrinology.* 1988;122(1):341-50.
162. Pan J-T, Mai L-M. Dopamine antagonism does not potentiate the effects of oxytocin and vasopressin on prolactin secretion. *Life sciences.* 1990;47(26):2443-50.
163. Nagy GM, Gorcs TJ, Halasz B. Attenuation of the suckling-induced prolactin release and the high afternoon oscillations of plasma prolactin secretion of lactating rats by antiserum to vasopressin. *Neuroendocrinology.* 1991;54(6):566-70.
164. Neill J. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology.* 1970;87(6):1192-7.
165. Terkel J, Blake CA, Sawyer CH. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology.* 1972;91(1):49-53.

166. Neill JD. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology*. 1972;90(5):1154-9.
167. Steyn FJ, Anderson GM, Grattan DR. Expression of ovarian steroid hormone receptors in tuberoinfundibular dopaminergic neurones during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol*. 2007;19(10):788-93.
168. Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Wiklund J, Wertz N, Gorski J. Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Adv Exp Med Biol*. 1981;138:151-63.
169. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N. Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;239(1-2):27-36.
170. Nolan LA, Levy A. The trophic effects of oestrogen on male rat anterior pituitary lactotrophs. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(5):457-64.
171. Takahashi S, Okazaki K, Kawashima S. Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell Tissue Res*. 1984;235(3):497-502.
172. Arbogast LA, Voogt JL. Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*. 1993;58(5):501-10.
173. Hokfelt T, Johansson O, Fuxe K, Goldstein M, Park D. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. *Med Biol*. 1976;54(6):427-53.
174. Grattan DR, Szawka RE. Kisspeptin and Prolactin. *Semin Reprod Med*. 2019;37(2):93-104.
175. Lookingland KJ, Jarry HD, Moore KE. The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. *Brain Res*. 1987;419(1-2):303-10.
176. Selmanoff M. Rapid effects of hyperprolactinemia on basal prolactin secretion and dopamine turnover in the medial and lateral median eminence. *Endocrinology*. 1985;116(5):1943-52.
177. Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR. Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol*. 2010;518(1):92-102.
178. Sapsford TJ, Kokay IC, Ostberg L, Bridges RS, Grattan DR. Differential sensitivity of specific neuronal populations of the rat hypothalamus to prolactin action. *J Comp Neurol*. 2012;520(5):1062-77.
179. Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology*. 1987;120(5):1846-50.
180. Brown RS, Wyatt AK, Herbison RE, Knowles PJ, Ladyman SR, Binart N, Banks WA, Grattan DR. Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J*. 2016;30(2):1002-10.
181. Hokfelt T, Fuxe K. Effects of prolactin and ergot alkaloids on the tubero-infundibular dopamine (DA) neurons. *Neuroendocrinology*. 1972;9(2):100-22.
182. Annunziato L, Moore KE. Prolactin in CSF selectively increases dopamine turnover in the median eminence. *Life Sci*. 1978;22(22):2037-41.
183. Eikenburg DC, Ravitz AJ, Gudelsky GA, Moore KE. Effects of estrogen on prolactin and tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *J Neural Transm*. 1977;40(4):235-44.
184. Gudelsky GA, Porter JC. Release of newly synthesized dopamine into the hypophysial portal vasculature of the rat. *Endocrinology*. 1979;104(3):583-7.
185. Grattan DR. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res*. 2001;133:153-71.
186. Kokay IC, Grattan DR. Expression of mRNA for prolactin receptor (long form) in dopamine and pro-opiomelanocortin neurones in the arcuate nucleus of non-pregnant and lactating rats. *J Neuroendocrinol*. 2005;17(12):827-35.
187. Demarest KT, Riegler GD, Moore KE. Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid 'tonic' and a delayed 'induction' component. *Neuroendocrinology*. 1984;38(6):467-75.

188. Lyons DJ, Hellysaz A, Broberger C. Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *J Neurosci*. 2012;32(23):8074-83.
189. Romano N, Yip SH, Hodson DJ, Guillou A, Parnaudeau S, Kirk S, Tronche F, Bonnefont X, Le Tissier P, Bunn SJ, Grattan DR, Mollard P, Martin AO. Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci*. 2013;33(10):4424-33.
190. BLAKE CA. Effects of intravenous infusion of catecholamines on rat plasma luteinizing hormone and prolactin concentrations. *Endocrinology*. 1976;98(1):99-104.
191. McNeill TH, Sladek JR, Jr. Fluorescence-immunocytochemistry: simultaneous localization of catecholamines and gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1978;200(4337):72-4.
192. Merchenthaler I, Setalo G, Csontos C, Petrusz P, Flerko B, Negro-Vilar A. Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*. 1989;125(6):2812-21.
193. Kuljis RO, Advis JP. Immunocytochemical and physiological evidence of a synapse between dopamine- and luteinizing hormone releasing hormone-containing neurons in the ewe median eminence. *Endocrinology*. 1989;124(3):1579-81.
194. Leranath C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. An electron-microscopic double immunostaining and degeneration study. *Neuroendocrinology*. 1988;48(6):591-602.
195. Horvath TL, Naftolin F, Leranath C. Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas. *Journal of neuroendocrinology*. 1993;5(1):71-9.
196. Clarkson J, Herbison A. Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *Journal of neuroendocrinology*. 2011;23(4):293-301.
197. Trudeau VL, Schueler FW, Navarro-Martin L, Hamilton CK, Bulaeva E, Bennett A, Fletcher W, Taylor L. Efficient induction of spawning of northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*) during and outside the natural breeding season. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:14.
198. Sotowska-Brochocka J, Martynska L, Licht P. Dopaminergic inhibition of gonadotropic release in hibernating frogs, *Rana temporaria*. *Gen Comp Endocrinol*. 1994;93(2):192-6.
199. Creighton A, Satterfield D, Chu J. Effects of dopamine agonists on calling behavior in the green tree frog, *Hyla cinerea*. *Physiol Behav*. 2013;116-117:54-9.
200. Chabbi A, Ganesh C. Evidence for the involvement of dopamine in stress-induced suppression of reproduction in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of neuroendocrinology*. 2015;27(5):343-56.
201. Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloché S, Gonnet F, Vernier P, Dufour S, Pasqualini C. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Endocrinology*. 2013;154(2):807-18.
202. Popesku JT, Navarro-Martin L, Trudeau VL. Evidence for alternative splicing of a dopamine D2 receptor in a teleost. *Physiol Biochem Zool*. 2011;84(2):135-46.
203. Dufour S, Weltzien FA, Sebert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1040:9-21.
204. de Cotte DM, De Menezes C, Bennett G, Edwardson J. Dopamine stimulates the degradation of gonadotropin releasing hormone by rat synaptosomes. *Nature*. 1980;283(5746):487.

205. Gnodde H, Schuiling G. Involvement of catecholaminergic and cholinergic mechanisms in the pulsatile release of LH in the long-term ovariectomized rat. *Neuroendocrinology*. 1976;20(3):212-23.
206. Owens R, Fleege J, Harms P. Evidence for central nervous system (CNS) involvement in inhibition of luteinizing hormone (LH) release by dopamine receptor stimulation. *Endocrine research communications*. 1980;7(2):99-105.
207. Ahren K, Fuxe H, Hamberger L, Hokfelt T. Turnover changes in the tubero-infundibular dopamine neurons during the ovarian cycle of the rat. *Endocrinology*. 1971;88(6):1415-24.
208. Gallo RV. Further studies on dopamine-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1981;32(3):187-92.
209. Lachelin G, Leblanc H, Yen S. The inhibitory effect of dopamine agonists on LH release in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1977;44(4):728-32.
210. Martin WH, Rogol AD, Kaiser DL, Thorner MO. Dopaminergic mechanisms and luteinizing hormone (LH) secretion. II. Differential effects of dopamine and bromocriptine on LH release in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981;52(4):650-6.
211. Judd SJ, Rakoff JS, Yen SS. Inhibition of gonadotropin and prolactin release by dopamine: effect of endogenous estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978;47(3):494-8.
212. Jarjour LT, Handelsman DJ, Raum WJ, Swerdloff RS. Mechanism of action of dopamine on the *in vitro* release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1986;119(4):1726-32.
213. Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM. Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals *in vitro*. *Endocrinology*. 1979;104(6):1749-57.
214. Rotsztejn WH, Charli JL, Pattou E, Epelbaum J, Kordon C. *In vitro* release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) from rat mediobasal hypothalamus: effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology*. 1976;99(6):1663-6.
215. Kamberi IA, Mical RS, Porter JC. Luteinizing hormone-releasing activity in hypophysial stalk blood and elevation by dopamine. *Science*. 1969;166(3903):388-90.
216. Hodson DJ, Townsend J, Tortorese DJ. Characterization of the effects of prolactin in gonadotroph target cells. *Biol Reprod*. 2010;83(6):1046-55.
217. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*. 2016;89(4):683-94.
218. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5163-8.
219. Rogan SC, Roth BL. Remote control of neuronal signaling. *Pharmacol Rev*. 2011;63(2):291-315.
220. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*. 2017;357(6350):503-7.
221. Campbell EJ, Marchant NJ. The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats. *Br J Pharmacol*. 2018;175(7):994-1003.
222. English JG, Roth BL. Chemogenetics-A Transformational and Translational Platform. *JAMA Neurol*. 2015;72(11):1361-6.
223. Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler SV. DREADDs: Use and application in behavioral neuroscience. *Behav Neurosci*. 2016;130(2):137-55.
224. Vazey EM, Aston-Jones G. Designer receptor manipulations reveal a role of the locus coeruleus noradrenergic system in isoflurane general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3859-64.

225. Gremel CM, Costa RM. Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions. *Nat Commun.* 2013;4:2264.
226. Yip SH, Araujo-Lopes R, Szawka RE, York J, Hyland B, Grattan DR, Bunn SJ. Morphological plasticity of the tuberoinfundibular dopaminergic neurones in the rat during the oestrous cycle and lactation. *J Neuroendocrinol.* 2020;32(11):e12884.
227. Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol.* 1975;24(1):1-8.
228. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;65(2):135-72.
229. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968;5(1):107-10.
230. Porter CC, Totaro JA, Stone CA. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1963;140:308-16.
231. Luthman J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res.* 1989;33(3):267-77.
232. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004;318(1):215-24.
233. Thoenen H, Tranzer JP. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1968;261(3):271-88.
234. Tranzer JP, Thoenen H. An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia.* 1968;24(2):155-6.
235. Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y. Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 1976;102(2):201-15.
236. Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 1995;4(2):131-7.
237. Horvath TL, Naftolin F, Leranath C. Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas. *J Neuroendocrinol.* 1993;5(1):71-9.
238. Faull RL, Laverty R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp Neurol.* 1969;23(3):332-40.
239. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays.* 2002;24(4):308-18.
240. Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intra-striatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience.* 1995;67(3):631-47.
241. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(5):325-34.
242. Witten IB, Steinberg EE, Lee SY, Davidson TJ, Zalocusky KA, Brodsky M, Yizhar O, Cho SL, Gong S, Ramakrishnan C, Stuber GD, Tye KM, Janak PH, Deisseroth K. Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron.* 2011;72(5):721-33.
243. Henderson KM. Gonadotrophic regulation of ovarian activity. *Br Med Bull.* 1979;35(2):161-6.
244. Liu K, Olofsson JI, Wahlberg P, Ny T. Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-

- 14), and tissue inhibitor of MMPs type 1 mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology*. 1999;140(11):5330-8.
245. Gustafson P, Kokay I, Sapsford T, Bunn S, Grattan D. Prolactin regulation of the HPA axis is not mediated by a direct action upon CRH neurons: evidence from the rat and mouse. *Brain Struct Funct*. 2017;222(7):3191-204.
246. Del-Bel E, Padovan-Neto FE, Szawka RE, da-Silva CA, Raisman-Vozari R, Anselmo-Franci J, Romano-Dutra AC, Guimaraes FS. Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. *Neurotox Res*. 2014;25(1):33-44.
247. Datla KP, Zbarsky V, Dexter DT. Effects of anaesthetics on the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by 6-hydroxydopamine in rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2006;113(5):583-91.
248. Ferro MM, Angelucci ME, Anselmo-Franci JA, Canteras NS, Da Cunha C. Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(1):89-96.
249. Protais P, Hermier C, Costentin J. The discriminant dopamine antagonist property of benzamides is observed at various times after their systemic or intracerebroventricular administration. *Neuropharmacology*. 1985;24(9):861-7.
250. Paxinos G WC. *The rat brain in stereotaxic coordinates* Academic Press. 1998;6th ed.
251. Mittelman-Smith MA, Williams H, Krajewski-Hall SJ, Lai J, Ciofi P, McMullen NT, Rance NE. Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology*. 2012;153(6):2800-12.
252. Steyn FJ, Wan Y, Clarkson J, Veldhuis JD, Herbison AE, Chen C. Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology*. 2013;154(12):4939-45.
253. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med*. 1998;129(3):229-40.
254. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383-95.
255. Lennartsson AK, Jonsdottir IH. Prolactin in response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(10):1530-9.
256. Labad J, Stojanovic-Perez A, Montalvo I, Sole M, Cabezas A, Ortega L, Moreno I, Vilella E, Martorell L, Reynolds RM, Gutierrez-Zotes A. Stress biomarkers as predictors of transition to psychosis in at-risk mental states: roles for cortisol, prolactin and albumin. *J Psychiatr Res*. 2015;60:163-9.
257. Sobrinho LG. Prolactin, psychological stress and environment in humans: adaptation and maladaptation. *Pituitary*. 2003;6(1):35-9.
258. Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of toxicological sciences*. 2009;34(Special):SP189-SP97.
259. Rudmann DG, Foley GL. *Female Reproductive System*. Hascheck and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology. 3rd edition ed: Academic Press; 2013. p. 2599-659.
260. Long JA, Evans HM. *The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena*. Berkeley, California: University of California Press; 1922. p. *Memoirs of the University of California*.
261. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Reproduction*. 1968;17(3):555-7.
262. Watson RE, Jr., Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides*. 1986;7(1):155-9.

263. Yip SH, Romano N, Gustafson P, Hodson DJ, Williams EJ, Kokay IC, Martin AO, Mollard P, Grattan DR, Bunn SJ. Elevated Prolactin during Pregnancy Drives a Phenotypic Switch in Mouse Hypothalamic Dopaminergic Neurons. *Cell Rep.* 2019;26(7):1787-99 e5.
264. Yip SH, Boehm U, Herbison AE, Campbell RE. Conditional Viral Tract Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. *Endocrinology.* 2015;156(7):2582-94.
265. Silva KSC, Aquino NSS, Gusmao DO, Henriques PC, Reis AM, Szawka RE. Reduced dopaminergic tone during lactation is permissive to the hypothalamic stimulus for suckling-induced prolactin release. *J Neuroendocrinol.* 2020;32(11):e12880.
266. Vidal A, Zhang Q, Medigue C, Fabre S, Clement F. DynPeak: an algorithm for pulse detection and frequency analysis in hormonal time series. *PLoS One.* 2012;7(7):e39001.
267. Conklin BR, Hsiao EC, Claeysen S, Dumuis A, Srinivasan S, Forsayeth JR, Guettier JM, Chang WC, Pei Y, McCarthy KD, Nissenson RA, Wess J, Bockaert J, Roth BL. Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nat Methods.* 2008;5(8):673-8.
268. Coutinho EA, Prescott M, Hessler S, Marshall CJ, Herbison AE, Campbell RE. Activation of a Classic Hunger Circuit Slows Luteinizing Hormone Pulsatility. *Neuroendocrinology.* 2020;110(7-8):671-87.
269. Demarest KT, Moore KE. Lack of a high affinity transport system for dopamine in the median eminence and posterior pituitary. *Brain Res.* 1979;171(3):545-51.
270. Annunziato L, Leblanc P, Kordon C, Weiner RI. Differences in the kinetics of dopamine uptake in synaptosome preparations of the median eminence relative to other dopaminergically innervated brain regions. *Neuroendocrinology.* 1980;31(5):316-20.
271. Yip SH, York J, Hyland B, Bunn SJ, Grattan DR. Incomplete concordance of dopamine transporter Cre (DAT(IREScre))-mediated recombination and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the mouse forebrain. *J Chem Neuroanat.* 2018;90:40-8.
272. Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2000;247 Suppl 2:II3-10.
273. Langston JW, Forno LS. The hypothalamus in Parkinson disease. *Ann Neurol.* 1978;3(2):129-33.
274. Demarest KT, Moore KE. Comparison of dopamine synthesis regulation in the terminals of nigrostriatal, mesolimbic, tuberoinfundibular and tuberohypophyseal neurons. *J Neural Transm.* 1979;46(4):263-77.
275. Ravitz AJ, Moore KE. Effects of amphetamine, methylphenidate and cocaine on serum prolactin concentrations in the male rat. *Life Sci.* 1977;21(2):267-72.
276. Behrouz B, Drolet RE, Sayed ZA, Lookingland KJ, Goudreau JL. Unique responses to mitochondrial complex I inhibition in tuberoinfundibular dopamine neurons may impart resistance to toxic insult. *Neuroscience.* 2007;147(3):592-8.
277. Melamed E, Rosenthal J, Globus M, Cohen O, Frucht Y, Uzzan A. Mesolimbic dopaminergic neurons are not spared by MPTP neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol.* 1985;114(1):97-100.
278. Mogi M, Harada M, Kojima K, Kiuchi K, Nagatsu T. Effects of systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to mice on tyrosine hydroxylase, L-3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, and monoamine oxidase activities in the striatum and hypothalamus. *J Neurochem.* 1988;50(4):1053-6.
279. Sundstrom E, Stromberg I, Tsutsumi T, Olson L, Jonsson G. Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. *Brain Res.* 1987;405(1):26-38.
280. Willis GL, Donnan GA. Histochemical, biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. *Brain Res.* 1987;402(2):269-74.
281. Armstrong DT, Papkoff H. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 1976;99(4):1144-51.



282. Dorrington JH, Bendell JJ, Khan SA. Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;44(4-6):441-7.
283. Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 1975;97(5):1328-31.
284. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH, Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 1984;5(1):76-127.
285. Stouffer RL, Hennebold JD. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum Physiology of Reproduction. Fourth Edition ed: Elsevier; 2015
286. Hamberger L, Hahlin M, Hillensjo T, Johanson C, Sjogren A. Luteotropic and luteolytic factors regulating human corpus luteum function. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;541:485-97.
287. 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(1):10-6.
288. Weems P, Smith J, Clarke IJ, Coolen LM, Goodman RL, Lehman MN. Effects of Season and Estradiol on KNDy Neuron Peptides, Colocalization With D2 Dopamine Receptors, and Dopaminergic Inputs in the Ewe. *Endocrinology.* 2017;158(4):831-41.
289. Park SK, Strouse DA, Selmanoff M. Prolactin- and testosterone-induced inhibition of LH secretion after orchidectomy: role of catecholaminergic neurones terminating in the diagonal band of Broca, medial preoptic nucleus and median eminence. *J Endocrinol.* 1996;148(2):291-301.
290. Demarest KT, Riegler GD, Moore KE. The rapid 'tonic' and the delayed 'induction' components of the prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons following the systemic administration of prolactin. *Neuroendocrinology.* 1986;43(3):291-9.
291. Merchenthaler I, Setalo G, Petrusz P, Negro-Vilar A, Flerko B. Identification of hypophysiotropic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons by combined retrograde labeling and immunocytochemistry. *Exp Clin Endocrinol.* 1989;94(1-2):133-40.
292. Burris TP, Stringer LC, Freeman ME. Pharmacologic evidence that a D2 receptor subtype mediates dopaminergic stimulation of prolactin secretion from the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology.* 1991;54(2):175-83.
293. Ciechanowska M, Apot M, Paruszevska E, Radawiec W, Przekop F. The influence of dopaminergic system inhibition on biosynthesis of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in anoestrous sheep; hierarchical role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 (RFRP-3). *Reprod Fertil Dev.* 2018;30(4):672-80.
294. Goodman RL, Maltby MJ, Millar RP, Hileman SM, Nestor CC, Whited B, Tseng AS, Coolen LM, Lehman MN. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrus ewes. *Endocrinology.* 2012;153(12):5918-27.
295. Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(19):8861-5.
296. Romero-Fernandez W, Borroto-Escuela DO, Vargas-Barroso V, Narvaez M, Di Palma M, Agnati LF, Larriva Sahd J, Fuxe K. Dopamine D1 and D2 receptor immunoreactivities in the arcuate-median eminence complex and their link to the tubero-infundibular dopamine neurons. *Eur J Histochem.* 2014;58(3):2400.
297. Durham RA, Johnson JD, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ. Opposing roles for dopamine D1 and D2 receptors in the regulation of hypothalamic tuberoinfundibular dopamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1998;355(2-3):141-7.
298. Berry SA, Gudelsky GA. D1 receptors function to inhibit the activation of tuberoinfundibular dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;254(2):677-82.

299. Herde MK, Herbison AE. Morphological Characterization of the Action Potential Initiation Segment in GnRH Neuron Dendrites and Axons of Male Mice. *Endocrinology*. 2015;156(11):4174-86.
300. Iremonger KJ, Herbison AE. Initiation and propagation of action potentials in gonadotropin-releasing hormone neuron dendrites. *J Neurosci*. 2012;32(1):151-8.
301. Glanowska KM, Moenter SM. Differential regulation of GnRH secretion in the preoptic area (POA) and the median eminence (ME) in male mice. *Endocrinology*. 2015;156(1):231-41.
302. Moore AM, Prescott M, Czielesky K, Desroziers E, Yip SH, Campbell RE, Herbison AE. Synaptic Innervation of the GnRH Neuron Distal Dendron in Female Mice. *Endocrinology*. 2018;159(9):3200-8.