

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**RECEPTORES RF-AMIDA ENVOLVIDOS NA AÇÃO
ESTIMULATÓRIA DA KISSPEPTINA SOBRE A SECREÇÃO DE
PROLACTINA EM FÊMEAS**

NAYARA SOARES SENA AQUINO

Belo Horizonte – MG

Maio -2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**RECEPTORES RF-AMIDA ENVOLVIDOS NA AÇÃO
ESTIMULATÓRIA DA KISSPEPTINA SOBRE A SECREÇÃO DE
PROLACTINA EM FÊMEAS**

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: Nayara Soares Sena Aquino

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Belo Horizonte – MG

Maio - 2017

À minha mãe Ivani e ao meu marido Samuel
por todo amor e incentivo ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar nos momentos mais árduos dessa trajetória e por ouvir minhas preces quando clamei por saídas. Dele, por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. (Romanos 11:36).

À minha mãe Ivani que em todo tempo me foi exemplo de mulher forte e perseverante. Por acreditar em mim e investir imensuráveis esforços na minha formação.

Ao meu marido Samuel, inspiração de carreira e dedicação ao trabalho. Por lutar ao meu lado, compreender os momentos de ausência, relevar as situações de estresse e se alegrar com cada nova vitória.

Ao meu pai Wilson e aos membros da família Nasolsi: Beth, Francisco, Thiago, Tábata, Esther, Márcia, Lídio, Isaac, Cris, Davidson e Maria Clara por todo o amor e compreensão ao longo da trajetória.

Ao professor Raphael que com grande empenho colaborou para a construção da tese e da minha formação. Por ter viabilizado com seus ensinamentos, paciência e solicitude que esse título se tornasse real. Por ter se tornado um amigo ao longo dos 6 anos de pós-graduação.

À Roberta, Dani, Patrícia, Kaoma, Juneo, Laísa, Ana e Felipe, companheiros do *Kiss Group*, por toda a ajuda nos experimentos, dosagens e discussão de resultados. E principalmente, por tornarem a jornada mais divertida e prazerosa.

Aos colegas atuais ou de épocas passadas do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo por fazerem desse laboratório uma grande família e um ambiente de trabalho extremamente agradável.

Aos demais professores do laboratório, Cândido Celso Coimbra, Adelina Martha dos Reis e Maristela de Oliveira Poletini por todo o ensinamento compartilhado.

Ao professor Dave Grattan, Sharon Ladyman, Pene Knowles e Joe Yip pela receptividade durante o doutorado sanduíche na Nova Zelândia e pelo auxílio na execução e análise dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiarem esse trabalho.

RESUMO

A kisspeptina (Kp), peptídeo pertencente à família RF-amida, é reconhecida como regulador chave da secreção de hormônio luteinizante (LH). A Kp também estimula a secreção de prolactina (PRL) via inibição dos neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA), que liberam dopamina (DA) na eminência mediana (EM). O receptor para Kp (Kiss1r), é expresso no hipotálamo de ratas mas não em neurônios TIDA. Por outro lado, a Kp é capaz de se ligar com alta afinidade ao receptor para neuropeptídeo FF (NPFFR). Neste trabalho investigamos a participação de Kiss1r e NPFFR no efeito da Kp sobre a secreção de PRL e atividade dos neurônios TIDA em fêmeas. Inicialmente, avaliamos o efeito do antagonista de Kiss1r, Kp-234, administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.), sobre a gênese dos picos de PRL e LH em ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com estradiol (OVX+E). A Kp-234 atenuou a fase inicial do pico de PRL e bloqueou totalmente o pico de LH induzido por estradiol, indicando o envolvimento da sinalização kisspeptina-Kiss1r nestes eventos fisiológicos. Em experimentos subsequentes, avaliamos o efeito da Kp-234 i.c.v. sobre a secreção de PRL e LH induzida por Kp-10 (fragmento biologicamente ativo de Kp) i.c.v. em ratas OVX+E. O tratamento com Kp-234 bloqueou os aumentos tanto de PRL quanto de LH induzidos pela Kp-10. Entretanto, a Kp-234 não impediu o efeito da Kp-10 de reduzir a atividade dos neurônios TIDA, determinada pela razão 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)/DA na EM. Com intuito de comprovar o efeito do bloqueio de Kiss1r, a secreção de PRL e a expressão de tirosina hidroxilase (TH) e tirosina hidroxilase fosforilada na serina 40 (S⁴⁰pTH) na EM foram avaliadas em camundongos com deleção do receptor Kiss1r, cujo receptor foi reinserido apenas nos neurônios GnRH (Kiss1r^{-/-}R). Como resultado, o aumento da secreção de PRL estimulado pela Kp-10 i.c.v. em fêmeas *wild type* (WT) não ocorreu em camundongos

Kiss1r^{-/-}R, enquanto a razão S⁴⁰pTH/TH não foi alterada pela Kp-10 em nenhum dos grupos experimentais. A participação do NPFFR no efeito da Kp-10 sobre a secreção de PRL foi avaliada utilizando-se o antagonista RF-9 i.c.v., o qual bloqueou a resposta da PRL enquanto potencializou a do LH. Diferentemente da Kp-234, entretanto, o RF-9 impediu a ação da Kp-10 sobre a DA e a razão DOPAC/DA na EM. Adicionalmente, o tratamento com o peptídeo relacionado à RF-amida 3 (RFRP-3) i.c.v., agonista de NPFFR, reproduziu a ação da Kp-10, elevando a secreção de PRL, aumentando os níveis de DA e reduzindo a razão DOPAC/DA na EM. Estes resultados revelam que a Kp e seu receptor Kiss1r participam da gênese do pico fisiológico de PRL induzido por estradiol em fêmeas. Além disso, a Kp parece regular a secreção de PRL de duas formas distintas: inibindo a atividade dos neurônios TIDA através da ligação ao NPFFR e de uma forma independente da DA via ativação de Kiss1r.

Palavras-chave: kisspeptina, prolactina, dopamina, estradiol, Kiss1r, NPFFR, RFRP-3

ABSTRACT

Kisspeptin (Kp), a member of RF-amide family, is recognized as a key component controlling the luteinizing hormone (LH) secretion. Kp also induces prolactin (PRL) secretion through inhibition of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons (TIDA), which release dopamine (DA) in the median eminence (ME). The Kp receptor (Kiss1r) is expressed in the rat hypothalamus but not in TIDA neurons. On the other hand, Kp is able to bind with high affinity to the receptor for neuropeptide FF (NPFFR). We investigated the roles of Kiss1r and NPFFR in the effect of Kp on PRL secretion and on the activity of TIDA neurons in females. Initially, we evaluated the effect of the Kiss1r antagonist Kp-234, administrated intracerebroventricularly (i.c.v.), on the genesis of PRL and LH surges in ovariectomized (OVX) rats treated with estradiol (OVX+E). The Kp-234 attenuated the peak phase of the PRL surge and totally prevented the LH surge induced by estradiol, demonstrating the involvement of the kisspeptin-Kiss1r signaling in these physiological events. In subsequent experiments, we evaluated the effect of i.c.v. Kp-234 on secretion of PRL and LH induced by i.c.v. Kp-10 (biological active fragment of Kp) in OVX+E rats. Kp-234 abolished the increase in PRL and LH release induced by Kp-10. However, Kp-234 did not prevent the Kp-10 effect in reducing the activity of TIDA neurons, as determined by the 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)/DA ratio in the ME. To further confirm the role of Kiss1r, PRL secretion and the expression of tyrosine hydroxylase (TH) and Ser⁴⁰-phosphorylated TH (S⁴⁰pTH) were evaluated in Kiss1r knockout mice, in which Kiss1r was reinserted only in GnRH neurons (Kiss1r^{-/-}R). As result, the PRL increase stimulated by i.c.v. Kp-10 in wild type (WT) females was absent in Kiss1r^{-/-}R mice, while the S⁴⁰pTH/TH ratio in the ME was not changed by Kp-10 in any of the experimental groups. The participation of NPFFR in the effect of i.c.v. Kp-10 on PRL secretion was evaluated using the i.c.v. injection of the

RF-9 antagonist, which inhibited the PRL response while potentiated the LH response to Kp-10. Nevertheless, unlike Kp-234, RF-9 prevented the effects of Kp-10 on DA and DOPAC/DA ratio in the ME. Furthermore, the treatment with the RF-amide related peptide 3 (RFRP-3), agonist of NPFFR, mimicked the Kp-10 actions, increasing the PRL secretion, enhancing DA and decreasing the DOPAC/DA ratio in the ME. These results show that Kp and its receptor Kiss1r play a role in the genesis of the physiological PRL surge induced by estradiol. Moreover, Kp seems to regulate the PRL secretion in two different ways: suppressing the activity of TIDA neurons through activation of NPFFR and in a DA-independent manner through Kiss1r.

Keywords: kisspeptin, prolactin, dopamine, estradiol, Kiss1r, NPFFR, RFRP-3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Origem e projeções anatômicas dos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos envolvidos no controle da secreção de PRL.....	19
Figura 2- Representação esquemática do <i>cross-talk</i> entre receptores e peptídeos da família RF-amida.....	31
Figura 3- Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 1.....	36
Figura 4- Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 2.....	37
Figura 5- Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 3.....	38
Figura 6- Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 4.....	39
Figura 7- Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 5.....	40
Figura 8- Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 6.....	40
Figura 9- Representação esquemática da região onde foram realizados os <i>punchs</i> para a análise da expressão de TH e S ⁴⁰ pTH por Western Blotting.....	46

Figura 10- Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 sobre a secreção de PRL e LH induzidas por estradiol.....	56
Figura 11- Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH.....	58
Figura 12- Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH.....	59
Figura 13- Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM.....	61
Figura 14- Níveis de PRL e razão tirosina hidroxilase (TH) / tirosina hidroxilase fosforilada na serina 40 (S ⁴⁰ pTH) na EM de animais <i>wild type</i> (WT) e Kiss1r ^{-/-} R.....	63
Figura 15- Efeito do bloqueio de NPFFR com RF-9 na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH.....	64
Figura 16- Efeito do bloqueio de NPFFR com RF-9 na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM.....	66
Figura 17- Efeito da ativação de NPFFR com RFRP-3 sobre a secreção de PRL e LH.....	68
Figura 18- Efeito da estimulação de NPFF1R com RFRP-3 sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM.....	69

Figura 19- Diagrama esquemático mostrando o mecanismo proposto para a ação estimulatória da kisspeptina sobre a secreção de PRL.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARC	- Núcleo arqueado
ASCI	- Área sob a curva integrada
AVPV	- Núcleo anteroventral periventricular da área preóptica
DA	- Dopamina
DOPAC	- Ácido dihidroxifenilacético
EM	- Eminência Mediana
ERα	- Receptor para estrógeno do tipo α
FSH	- Hormônio folículo estimulante
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPCR	- Receptor acoplado à proteína G
HPG	- Eixo hipotálamo-pituitária-gonadal
HPLC-ED	- Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica
i.c.v.	- intracerebroventricular
Kp	- Kisspeptina
Kp-10	- Kisspeptina-10
LH	- Hormônio luteinizante
NPFFR	- Receptor para neuropeptídeo FF
NPFF1R	- Receptor para neuropeptídeos FF do tipo 1
NPFF2R	- Receptor para neuropeptídeos FF do tipo 2
OVX	- Ovariectomizada
PHDA	- Periventricular hipofiseal dopaminérgico
PRL	- Prolactina
PrRP	- Peptídeo liberador da PRL
QRFP	- Peptídeos RF-amida piroglutamilados

RFRP	- Peptídeo relacionado à RFamida
RP3V	- Área periventricular rostral do terceiro ventrículo
S⁴⁰pTH	- Tirosina hidroxilase fosforilada na Serina 40
TIDA	- Tuberoinfundibular dopaminérgico
TH	- Tirosina hidroxilase
THDA	- Tuberohipofiseal dopaminérgico
Vei	- Veículo
WT	- Wild type

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
<i>1. Prolactina: funções e mecanismos de controle</i>	17
<i>2. Kisspeptina e seu receptor: histórico e mecanismo de ação</i>	22
<i>3. Kisspeptina: localização e controle do eixo HPG</i>	24
<i>4. Kisspeptina e o controle da secreção de PRL</i>	27
<i>5. Família de peptídeos RF-amida e seus receptores</i>	28
<i>6. Objetivos</i>	32
MATERIAIS E MÉTODOS	33
<i>1. Animais</i>	34
<i>2. Planejamento experimental</i>	35
<i>3. Procedimentos cirúrgicos</i>	41
<i>4. Microinjeção i.c.v.</i>	43
<i>5. Anestésico e drogas</i>	43
<i>6. Coleta de sangue</i>	44
<i>7. Microdissecções</i>	44
<i>8. HPLC-ED</i>	45
<i>9. Western Blottings</i>	46
<i>10. ELISA</i>	50
<i>11. Radioimunoensaio</i>	51
<i>12. Análise Estatística</i>	53

RESULTADOS	54
<i>Experimento 1: Envolvimento do receptor Kiss1r no pico fisiológico de PRL induzido por estradiol em ratas</i>	55
<i>Experimento 2: Efeito do bloqueio de Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH em ratas</i>	57
<i>Experimento 3: Efeito do bloqueio de Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA em ratas</i>	58
<i>Experimento 4: Avaliação do efeito da kisspeptina sobre a secreção de PRL e expressão de TH e S⁴⁰pTH na EM de camundongos transgênicos Kiss1r^{-/-}R</i>	62
<i>Experimento 5: Efeito do antagonismo dos receptores NPFFR sobre as ações da kisspeptina nos neurônios TIDA e secreção de PRL em ratas</i>	63
<i>Experimento 6: Efeito da ativação do NPFFR sobre a secreção de PRL e sobre a atividade dos neurônios TIDA em ratas</i>	67
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	77
ARTIGO CIENTÍFICO	93

INTRODUÇÃO

1. Prolactina: funções e mecanismos de controle

A hipófise ou pituitária é uma glândula endócrina situada na base do cérebro subdividida em duas porções: uma parte posterior, também chamada de neurohipófise e uma parte anterior, conhecida como adenohipófise. Toda a secreção adenohipofisária está sob controle do hipotálamo, estrutura do sistema nervoso central envolvida em vários eixos endócrinos, controle autonômico e comportamental. Os neurônios hipotalâmicos neuroendócrinos que modulam a função adenohipofisária projetam-se para a região da eminência mediana (EM) e secretam substâncias que atingem a adenohipófise por meio dos vasos porta-hipofisários-hipotalâmicos. As veias do sistema porta-hipofisário atravessam o infundíbulo (também chamado de haste hipofisária), e conectam vascularmente a adenohipófise ao hipotálamo (Valença et al., 2005).

Dentre os hormônios secretados pela adenohipófise encontra-se a prolactina (PRL), produzida majoritariamente pelos lactotrofos e em menor quantidade pelos mamosomatotrofos hipofisários (Freeman et al., 2000). A principal função da PRL, conforme o nome sugere é promover a lactação. Entretanto, sabe-se hoje que a PRL possui diversas outras funções que objetivam, sobretudo, promover a adaptação do organismo materno à gestação e lactação (Bole-Feysot et al., 1998; Grattan & Le Tissier, 2015). O receptor para PRL (PRLR) é amplamente expresso no organismo, em concordância com as múltiplas funções da PRL (Bole-Feysot et al., 1998). Ele é formado por uma proteína única transmembrana cuja ativação leva à formação de dímeros e desencadeia uma cascata de sinalização dependente da proteína *Janus Kinase 2* e da *STAT5* (do inglês: *Signal transducer and activators of transcription 5*) (Brooks, 2012).

Diferentemente dos demais hormônios adenohipofisários que têm sua secreção estimulada por hormônios hipotalâmicos, o eixo de controle hipotálamo-hipofisário da

PRL é caracterizado por uma ação inibitória do hipotálamo. Fragmentos de hipófise implantados em regiões isoladas do hipotálamo, assim como a secção da haste hipofisária não reduzem os níveis de PRL, evidenciando uma secreção hipofisária espontânea e independente do estímulo do hipotálamo (Everett, 1954). Por outro lado, a hiperprolactinemia desencadeada por enxertos hipofisários ectópicos é revertida pelo contato com a secreção hipotalâmica, comprovando que o hipotálamo secreta um fator predominantemente inibitório para regular a PRL (Nikitovitch-Winer & Everett, 1958). Ainda, a singularidade desse controle é reforçada pelo fato que, ao invés de um peptídeo, como acontece para os demais hormônios, o controle da secreção de PRL é exercido por uma catecolamina: a dopamina (DA) (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

Três populações de neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos fornecem DA à adenohipófise, conforme representado na figura 1 (Bjorklund et al., 1973; Kawano & Daikoku, 1987). Os neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) se localizam no núcleo arqueado (ARC) e se projetam para a zona externa da EM onde secretam a DA que atinge a adenohipófise através dos vasos porta-hipofisários hipotalâmicos (Bjorklund et al., 1973; Kawano & Daikoku, 1987). Os neurônios tuberohipofiseais dopaminérgicos (THDA) se localizam na porção rostral do ARC e enviam projeções para os lobos neurais e intermediários da hipófise (Holzbauer & Racke, 1985). Por fim, os neurônios periventricular hipofiseais dopaminérgicos (PHDA) se originam do núcleo periventricular e secretam DA no lobo intermediário da hipófise (Goudreau et al., 1995) que se comunica com a adenohipófise através dos vasos porta-hipofisários curtos (Peters et al., 1981). A DA proveniente dessas três populações neuronais se liga a receptores dopaminérgicos do tipo D2, que são amplamente expressos nos lactotrofos hipofisários e cuja deleção específica acarreta grande elevação

dos níveis plasmáticos de PRL (Mansour et al., 1990; Kelly et al., 1997; Saiardi et al., 1997).

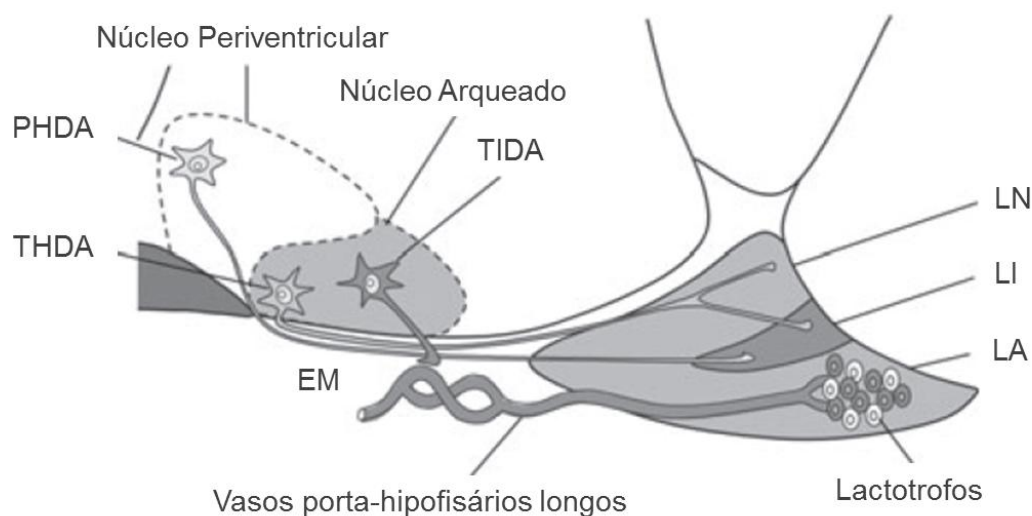


Figura 1: Origem e projeções anatômicas dos neurônios dopaminérgicos hipotálamicos envolvidos no controle da secreção de PRL. TIDA: neurônios tuberohipofisários dopaminérgicos; PHDA: neurônios periventriculares hipofisários dopaminérgicos; THDA: neurônios tuberohipofisários dopaminérgicos; EM: eminência mediana; LN: lobo neural da hipófise; LI: lobo intermediário da hipófise; LA: lobo hipofisário anterior. Adaptado de (Grattan & Kokay, 2008).

Para a síntese dopaminérgica, após adentrar nos neurônios, a tirosina deve ser convertida em L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esse processo é catalisado pela enzima tirosina hidroxilase (TH), passo limitante na via de síntese de DA (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). A TH é formada por 4 subunidades de aproximadamente 60 kDa cada que possuem um domínio regulatório em sua porção N-terminal e um domínio catalítico na porção C-terminal. O domínio regulatório contém 4 sítios de fosforilação, localizados entre os primeiros 40 aminoácidos nas serinas 8, 19, 31 e 40 (Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ e Ser⁴⁰) (Kumer & Vrana, 1996). Especificamente, a avaliação da fosforilação de TH na Ser⁴⁰ (S⁴⁰pTH) é uma das formas utilizadas para mensurar a ativação enzimática da via de síntese dopaminérgica (Aquino et al., 2016). Após a formação de L-DOPA, a DOPA descaboxilase catalisa sua conversão em DA, que é mantida em vesículas até o momento da liberação. A DA, então liberada, pode se ligar aos seus receptores nas

células alvo ou ser reabsorvida pelos terminais pré-sinápticos através do transportador de dopamina (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). A ação dopaminérgica é interrompida pela enzima monoamina oxidase (MAO), presente no citosol neuronal, que metaboliza a DA, resultando na formação do ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), principal metabólito neuronal da DA (Kvetnansky et al., 2009). Dessa forma, a avaliação dos níveis de DA e DOPAC revela a atividade de liberação sináptica dos neurônios dopaminérgicos, sendo que os níveis de DA representam o estoque nas vesículas pré-sinápticas e os níveis de DOPAC refletem a liberação e metabolização da DA (Lookingland et al., 1987). Ainda, a razão DOPAC/DA indica a taxa de *turnover* dopaminérgico e constitui um bom método para avaliar mudanças rápidas na atividade dopaminérgica sem a necessidade de um tratamento prévio (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001; Szawka et al., 2010).

Alterações rítmicas na atividade dos neurônios dopaminérgicos resultam em diferentes padrões de secreção da PRL que podem ser alterados por fortes estímulos, cujos principais incluem a sucção dos mamilos, o estresse e o nível de estradiol, sendo que este último pode variar ao longo do ciclo estral. O ciclo estral é o ciclo reprodutivo de roedores, dividido em 4 fases, i.e. diestro 1 e diestro 2, proestro e estro. Ao longo dessas fases se observam alterações rítmicas nas concentrações de hormônios essenciais para a reprodução, como estradiol, progesterona, hormônio luteinizante (LH), PRL e o hormônio folículo estimulante (FSH). Durante a maior parte do ciclo estral, sob a ação do *feedback* negativo do estradiol, as concentrações de LH e FSH são mantidas baixas. No entanto, na tarde do proestro um aumento da secreção de estradiol e progesterona culmina no pico das gonadotrofinas hipofisárias e da PRL, mecanismo clássico de *feedback* positivo do estradiol e fundamental para ovulação (Smith et al., 1975).

A sucção dos mamilos é um clássico reflexo neuroendócrino e constitui o mais forte estímulo conhecido para a liberação de PRL (Freeman et al., 2000). Nessa situação, o aumento da PRL é relacionado a uma redução na quantidade de DA secretada nos vasos porta-hipofisários e disponível para a adenohipófise (de Greef et al., 1981; Nagy et al., 1998). Diferentemente, em ratas não lactantes a secreção de PRL é mantida baixa até a tarde do proestro, na qual um pico pré-ovulatório de PRL é observado. Também está descrito um pico secundário de PRL na tarde do estro, embora sua função não seja bem estabelecida (Szawka & Anselmo-Franci, 2004). Essas elevações são relacionadas a uma redução da atividade dopaminérgica na EM e claramente desencadeadas pelo aumento do estradiol (Carr & Voogt, 1980; Demarest et al., 1981; DeMaria et al., 1998). O bloqueio de estradiol na manhã de diestro-II inibe o pico de PRL do proestro, enquanto o tratamento de ratas ovariectomizadas (OVX) com estradiol induz picos diários de PRL, semelhantes aos apresentados no proestro (Neill et al., 1971; Aquino et al., 2016). Esse pico de PRL induzido por estradiol apresenta característica assimétrica, formada por rápido aumento no início da tarde, seguido de fase intermediária de platô e agudo declínio no início da noite (Arbogast & Ben-Jonathan, 1988). Ainda, em conjunto com o estradiol, tal pico pode ser potencializado pela progesterona, que é capaz de adiantar e aumentar a magnitude do pico de PRL (Caligaris et al., 1974; Yen & Pan, 1998). Por fim, diversos tipos de estresse são responsáveis por alterar a secreção de PRL tanto em machos quanto em fêmeas (Poletini et al., 2006), em muitos dos casos também devido a mudanças na atividade dos neurônios dopaminérgicos (Freeman et al., 2000).

2. Kisspeptina e seu receptor: histórico e mecanismo de ação

Ao pesquisar por receptores ligados à proteína G em ratos (*G-protein-coupled-receptor*; GPCR), Lee e colaboradores descobriram em 1999 um GPCR com estrutura parcialmente homóloga (cerca de 45%) à dos receptores de galanina. O receptor recém descoberto foi então nomeado GPR54. Apesar da alta homologia com os receptores para galanina, estruturas essenciais para a ligação da galanina não estavam presentes no GPR54 (Lee et al., 1999) e, sem um ligante identificado, ele foi classificado como receptor órfão (Muir et al., 2001).

Dois anos mais tarde, fragmentos altamente ativos para o receptor GPR54 foram isolados em tecido placentário humano. A purificação dos fragmentos revelou o produto do gene *Kiss1* como o ligante cognato do GPR54 (Kotani et al., 2001b). O gene *Kiss1* foi inicialmente identificado como sendo expresso em células de melanomas, nas quais o potencial de metástase havia sido perdido. Por esse motivo, o gene *Kiss1* é relacionado à propriedades antimetastáticas como a inibição da proliferação celular, migração e indução de adesão focal (Lee et al., 1996; Ohtaki et al., 2001; Stafford et al., 2002). Esse gene codifica uma proteína precursora de 145 aminoácidos (Ohtaki et al., 2001), a qual é clivada em peptídeos menores de 54, 14, 13 e 10 aminoácidos, posteriormente denominados kisspeptina-54 (Kp-54), Kp-14, Kp-13 e Kp-10, todos equipotentes em estimular o receptor GPR54 (Kotani et al., 2001b).

A grande família de GPCR's é composta por 3 subtipos principais – os receptores estimulatórios G_s e G_q e o receptor inibitório $G_{i/o}$ - que se diferenciam entre si pelos efetores que recrutam e efeitos celulares que evocam. As G_s e G_i regulam a concentração intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) ao ativar (G_s) ou inibir (G_i) a adenilato ciclase. As G_q , por sua vez, ativam a fosfolipase-C (PLC), promovendo a quebra do fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP3) e

diacilglicerol (DAG), o que resulta em um aumento intracelular de Ca^{2+} (Simon et al., 1991). Kotani e colaboradores (Kotani et al., 2001b) demonstraram que a ligação da kisspeptina ao GPR54 aumenta a mobilização de Ca^{2+} e o turnover de PIP_2 , sem alterar os níveis de AMPc, fato que foi corroborado por outros três laboratórios independentes (Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Stafford et al., 2002). Esses achados revelam que o GPR54 está ligado à proteína G estimulatória do tipo Gq e que a kisspeptina exerce seus efeitos ao aumentar o transiente de Ca^{2+} intracelular (Kotani et al., 2001b). A ligação da kisspeptina a um receptor estimulatório, no entanto, se opõe a diversos efeitos kisspeptinérgicos inibitórios e sugere a sinalização por um receptor adicional ainda não identificado.

Dada a comprovação da kisspeptina como seu ligante cognato, o receptor GPR54 foi renomeado de receptor para kisspeptina (Kiss1r) (Gottsch et al., 2009). Em 2003, três laboratórios independentes identificaram que a sinalização Kisspeptina-Kiss1r é fundamental para o eixo reprodutivo. Este eixo reprodutivo, também chamado de eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) constitui o sistema pelo qual o hipotálamo controla a secreção dos hormônios reprodutivos hipofisários (também chamados de gonadotrofinas hipofisárias) e dos esteroides ovarianos. Neurônios hipotalâmicos produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) se projetam para EM e o GnRH secretado nessa região atinge a hipófise através dos vasos porta-hipofisários. O GnRH estimula os gonadotrofos hipofisários a liberar LH e FSH, que atuam no ovário aumentando a secreção de estradiol e progesterona (Herbison, 2015). O estradiol, por sua vez, controla a secreção de LH e FSH tanto a nível hipofisário quanto hipotalâmico. Durante a maior parte do ciclo reprodutivo, o estradiol mantém baixas as concentrações de GnRH e conseqüentemente de LH, mecanismo conhecido como *feedback* ou retroalimentação negativa. Entretanto, no período que precede a ovulação, um aumento

nos níveis de estradiol é responsável por induzir o pico de liberação de GnRH/LH que culmina na ovulação (Smith et al., 1975).

A importância da sinalização kisspeptina-Kiss1r para o eixo HPG e a reprodução foi evidenciada por estudos mostrando que tanto humanos quanto camundongos com mutações no gene que codifica o Kiss1r são inférteis devido à ausência de maturação sexual espontânea e baixos níveis de gonadotrofinas hipofisárias (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). Apesar disso, camundongos fêmeas com deleção de Kiss1r ovulam após estimulação exógena e têm a atividade hipofisária aumentada após estímulo com GnRH, revelando ovários e gonadotrofos funcionalmente responsivos (Seminara et al., 2003). Esses dados levam à conclusão de que a infertilidade decorrente da mutação no Kiss1r ocorre por falhas no eixo HPG em porções hierarquicamente superiores à hipófise e gônadas.

3. Kisspeptina: localização e controle do eixo HPG

A descoberta dos efeitos negativos decorrentes da disfunção no Kiss1r sobre a capacidade reprodutiva levou a uma busca pela caracterização da função da kisspeptina no eixo HPG. Atualmente sabe-se que a kisspeptina é um fator determinante no *feedback* do estradiol sobre a secreção de GnRH e regulador chave do eixo HPG em mamíferos.

O tratamento com Kp-10 despolariza e intensifica a taxa de ativação dos neurônios GnRH (Han et al., 2005). Adicionalmente a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de pequenas doses de Kp-10 promove um potente aumento da secreção de LH e FSH que pode ser bloqueado pelo antagonista de GnRH (Gottsch et al., 2004). De fato, os neurônios GnRH expressam o receptor Kiss1r e a kisspeptina pode agir diretamente nesses neurônios (Irwig et al., 2004; Han et al., 2005; d'Anglemon de Tassigny et al.,

2008; Herbison et al., 2010; Smith et al., 2011). Ainda, enquanto a deleção de Kiss1r resulta em baixa secreção de gonadotrofinas e inabilidade de atingir a puberdade, sua re inserção exclusivamente nos neurônios GnRH é capaz de restaurar a fertilidade (Kirilov et al., 2013).

A secreção dos neurônios produtores de GnRH é determinada pelos níveis plasmáticos de estradiol. Estudos comprovaram que o *feedback* positivo do estradiol sobre esses neurônios é exercido através de receptores para estrógeno do tipo α (ER α) (Wintermantel et al., 2006). Interessantemente, a expressão de ER α nos neurônios GnRH é controversa, sendo apontada como baixa ou ausente, sugerindo que esses neurônios não são o alvo direto da retroalimentação estrogênica (Herbison, 1998; Skynner et al., 1999). Esses achados desencadearam intensa pesquisa por fatores que intermediariam a modulação do estradiol nos neurônios GnRH e os resultados sugerem que a kisspeptina preenche a lacuna que faltava no controle do eixo HPG. Cerca de 60% a 70% dos neurônios kisspeptinérgicos expressam ER α (Smith et al., 2006). Adicionalmente, esses neurônios se comunicam com os neurônios GnRH e são diferencialmente regulados pelo estradiol (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b; Clarkson & Herbison, 2006).

No cérebro de roedores os neurônios kisspeptinérgicos se localizam em duas regiões principais: o ARC (análogo ao núcleo infundibular em primatas) e na área periventricular rostral do terceiro ventrículo (RP3V), constituída por três núcleos: o núcleo preóptico mediano, o núcleo periventricular e o núcleo anteroventral periventricular (AVPV) (Gottsch et al., 2004; Herbison, 2008; Clarkson et al., 2009). Estudos envolvendo lesões do AVPV revelaram que ele é fundamental para o *feedback* positivo do estradiol sobre os neurônios GnRH [revisado em (Herbison, 2016)] e os neurônios kisspeptinérgicos presentes nesse núcleo parecem ser os responsáveis por

esse processo. A injeção específica de anticorpos contra kisspeptina na região do AVPV assim como a ausência de ER α nos neurônios kisspeptinérgicos impedem o aumento de LH induzido por estradiol (Adachi et al., 2007; Dubois et al., 2015). Ainda, os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV não somente expressam ER α como têm sua atividade elétrica modulada em resposta ao estradiol (Frazao et al., 2013; Piet et al., 2013). Eles se projetam para os neurônios GnRH, estimulam sua atividade e são ativados simultaneamente aos neurônios GnRH no período preovulatório (Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2008; Liu et al., 2011).

Por outro lado, além de seu envolvimento na retroalimentação positiva, os neurônios kisspeptinérgicos também parecem participar do mecanismo de retroalimentação negativa do estradiol sobre o GnRH/LH. Essa afirmação é baseada em estudos mostrando que o aumento de LH após a remoção do *feedback* negativo do estradiol em ratas OVX não acontece em animais knockouts para Kiss1r (Dungan et al., 2007). Ademais, enquanto o estradiol aumenta a expressão de kisspeptina no AVPV, ele a reduz no ARC (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Os neurônios kisspeptinérgicos do ARC formam a outra grande população de neurônios produtores de kisspeptina no cérebro. Eles se projetam para os axônios dos neurônios GnRH na EM (Ramaswamy et al., 2008; Yip et al., 2015) e quando lesionados atenuam o *feedback* negativo do estradiol sobre o LH (Mittelman-Smith et al., 2012). Dessa forma, a ação diferencial do estradiol sobre neurônios kisspeptinérgicos do AVPV e ARC tem embasado a hipótese de que esses neurônios estejam envolvidos respectivamente na retroalimentação positiva e negativa exercida pelo estradiol sobre a secreção de GnRH/LH.

O estudo das ações kisspeptinérgicas sobre a secreção de GnRH/LH foi impulsionado pela descoberta recente de um antagonista para o receptor Kiss1r, a Kp-

234. O tratamento com Kp-234 inibe a pulsatilidade do GnRH em macacas, atrasa o início da puberdade e impede a ação da Kp-10 sobre as gonadotrofinas em roedores, além de bloquear o aumento do LH após ovariectomia em ovelhas (Roseweir et al., 2009). Esses dados comprovam definitivamente a importância da sinalização kisspeptina-Kiss1r para o eixo HPG e reprodução.

4. Kisspeptina e o controle da secreção de PRL

Além de controlar o eixo HPG, a kisspeptina exerce importante modulação dos neurônios dopaminérgicos e da secreção de PRL (Ribeiro et al., 2015). As fibras kisspeptinérgicas se projetam para duas das três populações de neurônios dopaminérgicos envolvidas no controle da PRL: os TIDA e os PHDA e a sinapse entre os neurônios kisspeptinérgicos e os TIDA já foi comprovada (Szawka et al., 2010; Sawai et al., 2012; Sawai et al., 2014). Adicionalmente, estudos de nosso grupo demonstraram que a injeção i.c.v. de Kp-10 aumenta potentemente a secreção de PRL ao reduzir a atividade dos neurônios dopaminérgicos, fato comprovado pela diminuição na expressão de c-fos nos TIDA e PHDA e declínio na razão DOPAC/DA na EM (Szawka et al., 2010).

Interessantemente a ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL é dependente do estradiol. A injeção i.c.v. de Kp-10 aumenta a secreção de PRL em ratas em proestro ou ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E), porém é inefetiva em ratas OVX ou em diestro (Szawka et al., 2010). Apesar de o mecanismo pelo qual o estradiol interfere nessa ação estimulatória não ser bem esclarecido, sabe-se que ele modula a quantidade de fibras kisspeptinérgicas em contato com os neurônios TIDA, os quais sabidamente expressam ER α (Sawai et al., 2012; Ribeiro et al., 2015). Ainda, a dependência dos níveis de estradiol se dá exclusivamente para a ação da kisspeptina

sobre a PRL, tendo em vista que a Kp-10 estimula a secreção de LH indiferentemente dos níveis plasmáticos de estradiol (Ribeiro et al., 2015). Por fim, embora a ligação da kisspeptina ao corpo celular dos neurônios TIDA já tenha sido comprovada, dados de nosso grupo e de outros laboratórios evidenciaram que praticamente não há expressão de Kiss1r em neurônios TIDA, levando a um questionamento quanto ao receptor envolvido nesta interação (Iijima et al., 2015; Kokay et al., 2016).

5. Família de peptídeos RF-amida e seus receptores

As kisspeptinas são parte da família de peptídeos RF-amida. Essa classe é formada por cinco grupos de peptídeos: (1) o neuropeptídeo FF (NPFF); (2) o peptídeo relacionado a RFamida (RFRP); (3) o peptídeo liberador da PRL (PrRP); (4) o peptídeo RF-amida piroglutamilado (QRFP); (5) além da kisspeptina (Quillet et al., 2016). Todos esses peptídeos possuem em comum parte da extremidade C-terminal conservada, constituída por arginina (R), fenilalanina (F) e um grupamento funcional amina (NH₂) (Yun et al., 2014). Estudos demonstraram que a extremidade C-terminal da kisspeptina está envolvida na sua interação com o Kiss1r, dado que o peptídeo livre dessa porção possui baixa ação estimulatória sobre o receptor (Ohtaki et al., 2001). Entretanto, apesar da similaridade parcial entre os peptídeos RF-amida, o receptor Kiss1r não é ativado por nenhum outro membro dessa família, sendo altamente específico para kisspeptina (Kotani et al., 2001b; Muir et al., 2001). Contudo, outros receptores para peptídeos RF-amida não discriminam os vários membros dessa família e são alvos de ligação cruzada, inclusive da kisspeptina (Elhabazi et al., 2013). Assim, tendo em vista o efeito aparentemente paradoxal da kisspeptina de inibir os neurônios dopaminérgicos através de um receptor excitatório, existe a possibilidade de que a kisspeptina interaja com outro receptor da família RF-amida que não o Kiss1r para controlar a secreção de PRL.

Particularmente, os receptores para NPPF reconhecem diversos peptídeos da família RFamida. Dois receptores para NPPF foram descritos: o NPPF1R (também identificado e nomeado como OT7022 ou GPR147 por laboratórios independentes) e o NPPF2R (também identificado como HLWAR77 ou GPR74) (Bonini et al., 2000; Elshourbagy et al., 2000; Hinuma et al., 2000; Parker et al., 2000; Liu et al., 2001; Yoshida et al., 2003). Estudos funcionais demonstraram que o NPPF se liga com alta afinidade ao NPPF2R, enquanto o NPPF1R é o receptor preferencial dos peptídeos RFRP (Mollereau et al., 2002; Yoshida et al., 2003). Em roedores uma grande proteína precursora dá origem a dois RFRPs: o RFRP-1 e o RFRP-3 (Hinuma et al., 2000). No que se refere a funções neuroendócrinas, a ligação de ambos os RFRP ao NPPF1R tem se mostrado importante para a regulação de hormônios reprodutivos, entretanto enquanto o RFRP-1 é relacionado à estimulação hipotalâmica da secreção de PRL (Hinuma et al., 2000), um vasto número de estudos tem evidenciado potentes ações do RFRP-3 sobre a secreção de LH (Kriegsfeld et al., 2006; Johnson et al., 2007; Ducret et al., 2009).

Em mamíferos, o RFRP-3 é caracterizado como o ortólogo do hormônio inibidor das gonadotrofinas descrito em aves (GnIH) e, ao atuar nos neurônios GnRH, o RFRP-3 é capaz de reduzir a secreção de LH em roedores (Murakami et al., 2008; Anderson et al., 2009; Rizwan et al., 2009; Rizwan et al., 2012; Poling et al., 2014; George et al., 2017). Ainda, o RFRP-3 é relacionado à inibição da fertilidade durante o período pré-pubertal e apontado como intermediador das informações circadianas reprodutivas vindas do núcleo supraquiasmático para o eixo HPG (Russo et al., 2015; Xiang et al., 2015).

No entanto, evidências recentes sugerem que as ligações dos RFRP e dos NPPF não são as únicas realizadas pelos NPPF1R e NPPF2R. Como exemplo, o PrRP e o

QRFP, que possuem receptores cognatos próprios, também sinalizam através de NPFFR (Engstrom et al., 2003; Bruzzone et al., 2007; Gouarderes et al., 2007; Ma et al., 2009). De forma semelhante, a kisspeptina é capaz de se ligar com alta afinidade tanto ao NPFF1R quanto ao NPFF2R (Lyubimov et al., 2010; Oishi et al., 2011; Elhabazi et al., 2013). Estas e outras interconexões entre os peptídeos RF-amida e seus receptores são apresentadas na figura 2.

No cérebro de roedores, os NPFFR estão expressos ao longo do hipotálamo e em regiões de conhecida expressão de kisspeptina e DA, tais como o ARC e AVPV (Liu et al., 2001; Gouarderes et al., 2004; Poling et al., 2013). Em especial, os neurônios dopaminérgicos da região periventricular do hipotálamo expressam NPFF1R (Hinuma et al., 2000; Kokay et al., 2016). Esses receptores são acoplados a proteína G_i , possuindo como efeito principal a inibição da adenilato ciclase (Kotani et al., 2001a). Adicionalmente, aliada à afinidade da kisspeptina por NPFFR, um estudo recente demonstrou que a kisspeptina promove tanto ações excitatórias quanto inibitórias nos neurônios do ARC, mas interessantemente essas respostas são igualmente reproduzidas na ausência de Kiss1r (Liu & Herbison, 2015). Uma sugestão é que os efeitos da kisspeptina no ARC sejam exercidos através dos NPFF1R, uma vez que são mimetizadas pelo RFRP-3 (Liu & Herbison, 2015). Assim, os efeitos inibitórios da kisspeptina no ARC se opõem a sua ligação ao receptor excitatório Kiss1r e a comprovada relação entre a kisspeptina e os receptores NPFFR, conhecidamente inibitórios, suscita a hipótese de que os NPFFR possam estar envolvidos na regulação dos neurônios dopaminérgicos e da secreção de PRL pela kisspeptina.

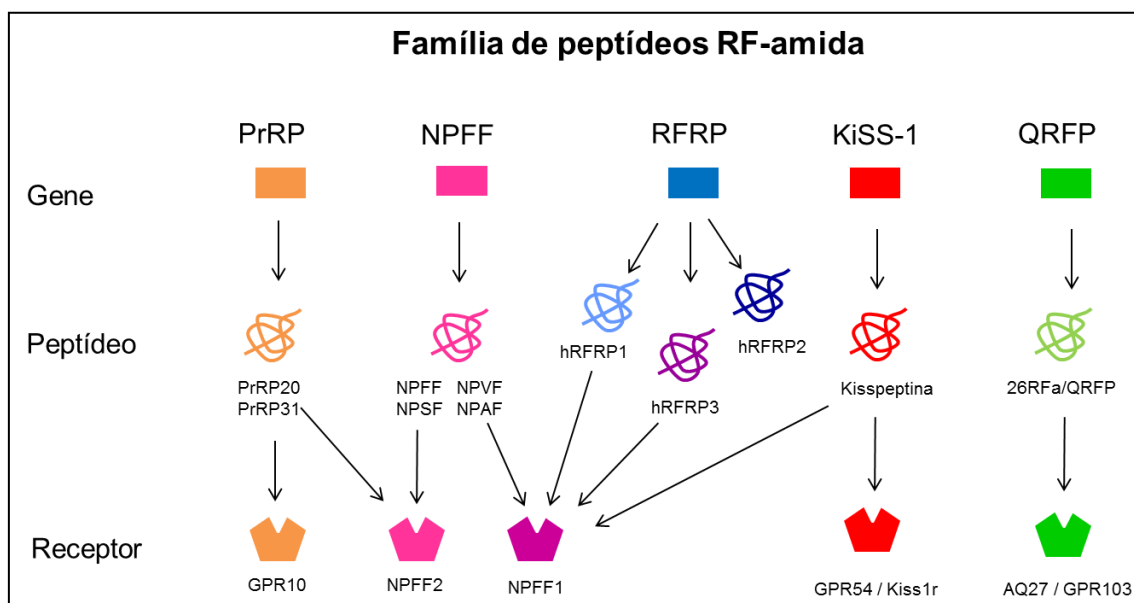


Figura 2: Representação esquemática do *cross-talk* entre receptores e peptídeos da família RF-amida. Adaptado de (Jhamandas & Goncharuk, 2013).

6. Objetivos

Investigar o envolvimento do receptor Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL induzida por estradiol e a participação de Kiss1r e NPFRR na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA e sobre a secreção de PRL.

6.1 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na secreção de PRL e LH induzidas por estradiol;
- II. Avaliar o efeito do bloqueio do receptor Kiss1r com Kp-234, na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM e sobre a secreção de PRL e LH;
- III. Avaliar o efeito da injeção i.c.v de Kp-10 sobre os níveis plasmáticos de PRL e sobre a expressão de TH e S⁴⁰pTH na EM de animais *knockouts* para o receptor Kiss1r, nos quais o receptor foi reinserido apenas em neurônios GnRH (Kiss1r^{-/-}R);
- IV. Avaliar o efeito bloqueio dos receptores NPFRR com RF-9, na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM e sobre a secreção de PRL e LH;
- V. Determinar o efeito da estimulação de NPFRR com RFRP-3 sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM e sobre a secreção de PRL e LH.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Para todos os experimentos exceto o quarto, ratas Wistar virgens com peso corporal entre 200–250 g foram obtidas do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). As ratas foram mantidas em caixas plásticas em grupos de quatro por caixa (39 X32 X 17 cm), em um ambiente de temperatura (22 ± 2 °C) e luz (12:00 claro / 12:00 escuro, luzes acesas às 07:00 h) controladas, com água e ração *ad libitum*. Após os procedimentos cirúrgicos, as ratas foram acondicionadas em caixas individuais até o dia do experimento. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo nº 100/2012). Para o experimento 4, camundongos fêmeas C57BL/6J e knockouts para o receptor Kiss1r, nas quais o receptor foi reinserido apenas nos neurônios GnRH (Kiss1r^{-/-}R) virgens pesando entre 19 e 25 g foram obtidas do biotério do *Department of Anatomy da University of Otago, Dunedin, New Zealand*. Os camundongos foram mantidos em grupos de 3 a 5 animais por caixa em ambiente de temperatura (22 ± 1 °C) e luz (12:00 h claro / 12:00 h escuro; luzes acesas às 06:00 h) controladas. Os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum*. Após os procedimentos cirúrgicos os animais foram acondicionados em gaiolas individuais até o dia do experimento. O protocolo utilizado foi aprovado pelo *University of Otago Animal Ethics Comitee*.

Tendo em vista que a secreção de PRL é comprovadamente elevada pelo estresse (Poletini et al., 2006) em todos os experimentos os animais foram previamente aclimatados à manipulação durante 2 a 4 semanas. Esse processo habitua os animais à metodologia adotada e evita o estresse durante o experimento. Para evitar o estresse da mudança de ambiente e do transporte, no experimento 4 os animais foram eutanasiados no próprio biotério. Para os demais, as ratas foram movidas para a sala experimental no

mínimo um dia antes do dia do experimento. Todas as decapitações foram feitas de forma rápida, por uma pessoa experiente, visando eliminar qualquer estresse de manipulação. Adicionalmente, considerando que a secreção de LH é comprovadamente estimulada pela kisspeptina (Gottsch et al., 2004), os níveis plasmáticos desse hormônio foram utilizados como controle da ação kisspeptinérgica.

2. Planejamento experimental

Experimento 1: Envolvimento do receptor Kiss1r no pico fisiológico de PRL induzido por estradiol

A fim de estudar a participação do receptor Kiss1r no controle da secreção de PRL e LH, nesse experimento avaliamos se os picos de PRL e LH induzidos por estradiol são dependentes de Kiss1r. Para isso, de sete a dez dias antes do experimento as ratas foram OVX e submetidas à cirurgia i.c.v. para a inserção de cânula guia no ventrículo lateral direito. Os animais foram tratados com injeções diárias de estradiol s.c. (OVX+E) durante três dias consecutivos. No quarto dia, as ratas receberam três injeções de Kp-234 (6 nmol/1,2 µL/rata; n = 6) ou veículo (Vei; n = 6) às 10:00, 12:00 e 14:00 h. Amostras de 10 µL de sangue foram colhidas da cauda das ratas a cada 30 minutos das 13:00 às 18:00 para a dosagem de PRL e LH por ELISA. O protocolo desse experimento é apresentado de forma representativa na figura 3.

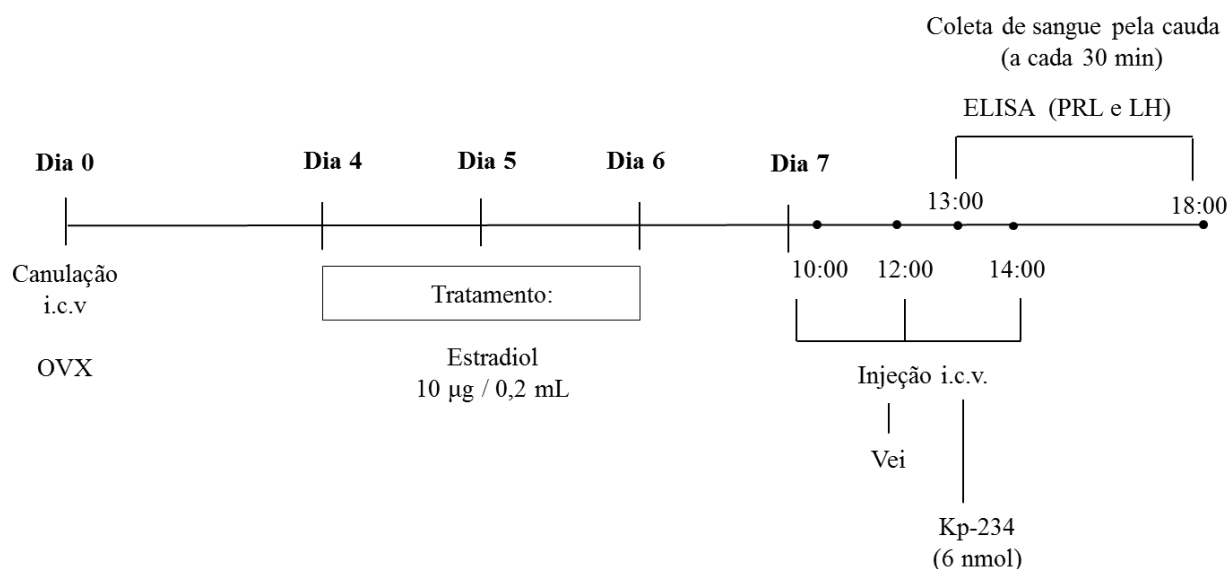


Figura 3: Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 1.

Experimento 2: Efeito do bloqueio de Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH

Nos próximos passos desse estudo, decidimos avaliar se as secreções de PRL e LH estimuladas pela kisspeptina são dependentes do receptor Kiss1r. Ratas OVX foram submetidas à cirurgia i.c.v. e após uma semana de recuperação, foram tratadas com estradiol s.c. por 3 dias consecutivos (OVX+E). Entre 8:00–12:00 h do quarto dia, as ratas receberam duas injeções i.c.v. de Kp-234 (6 nmol/1,2µL cada) ou Veí, 60 e 15 minutos antes da injeção de Kp-10 (3 nmol/3µL; n = 8 por grupo) ou Veí (n = 8 por grupo). Dez minutos após as injeções, as ratas foram decapitadas e sangue foi colhido para a dosagem de PRL e LH por ELISA. Esse protocolo está representado na linha cronológica da figura 4.

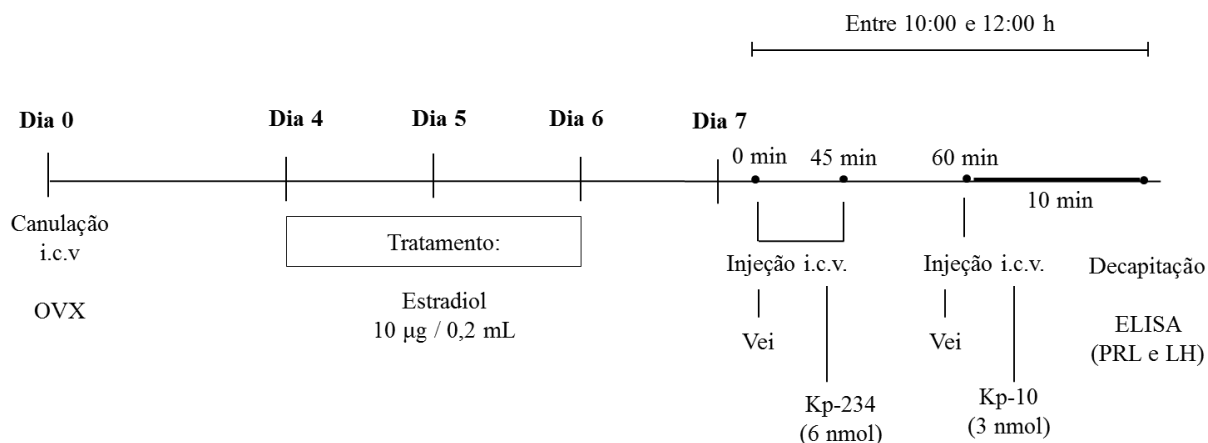


Figura 4: Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 2.

Experimento 3: : Efeito do bloqueio de Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA

Comprovadamente a injeção i.c.v. de Kp-10 reduz a atividade dos neurônios TIDA com conseqüente elevação dos níveis de PRL (Szawka et al., 2010). Nesse experimento avaliamos se a Kp-10 se liga ao receptor Kiss1r para regular os TIDA. Tendo em vista que os resultados do experimento 2 levantaram um questionamento quanto à proporção das doses de Kp-234 e Kp-10 pelo fato de a Kp-234 não ter bloqueado completamente o aumento do LH induzido por Kp-10, neste experimento mantivemos a dose do antagonista mas reduzimos a dose de Kp-10. Adicionalmente, reduzimos também o período entre a administração da Kp-10 e a decapitação de 10 min para 5 min, com o objetivo de melhor avaliar a resposta dos neurônios TIDA que teoricamente ocorre antes do aumento da secreção de PRL. De forma similar ao protocolo do experimento 2, entre 08:00 e 12:00 h, ratas OVX+E submetidas a canulação do ventrículo lateral direito foram tratadas com duas injeções i.c.v. de Kp-234 (6 nmol/1,2 µL cada) ou Veí, 60 e 15 minutos antes da injeção de Kp-10 (1 nmol/1 µL; n = 7-10 por grupo) ou Veí (n = 10). Cinco minutos após a última injeção as ratas foram decapitadas e o sangue colhido para dosagem de PRL e LH por ELISA. O cérebro foi

removido e a EM microdissecada para dosagem de DA e DOPAC por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED). Esse protocolo se encontra ilustrado na figura 5.

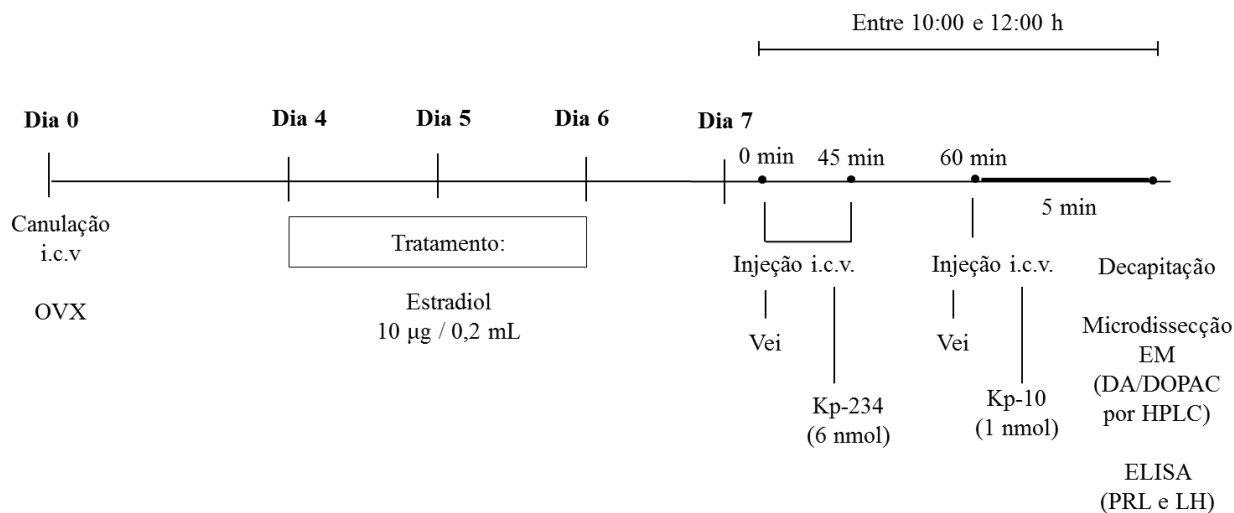


Figura 5: Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 3.

Experimento 4: Avaliação do efeito da kisspeptina sobre a secreção de PRL e expressão de TH e S40pTH na EM de camundongos transgênicos Kiss1r^{-/-}R

Camundongos *knockouts* para o receptor Kiss1r não atingem a puberdade e possuem redução no tamanho das gônadas e na secreção das gonadotrofinas. A fertilidade nesses animais, entretanto pode ser restaurada pela reinserção do receptor Kiss1r exclusivamente nos neurônios GnRH, gerando os animais chamados nesse trabalho de Kiss1r^{-/-}R (Kirilov et al., 2013). Esses animais permitem estudar as consequências da ausência de Kiss1r nos neurônios TIDA para as ações da kisspeptina sobre esses neurônios e sobre a secreção de PRL, o que configura o objetivo desse experimento. Camundongos fêmeas Kiss1r^{-/-}R e C57BL/6J (*wild type* – WT) tiveram seu ciclo estral acompanhado durante 4 semanas. De sete a dez dias antes do experimento os animais foram submetidos à cirurgia i.c.v. Entre 10:00 e 12:00 h do proestro receberam a injeção i.c.v. de 3 nmol Kp-10 (n = 6) ou Vei (n = 6). Os

camundongos foram decapitados dez minutos após a injeção e tiveram o sangue colhido para dosagem de PRL por radioimunoensaio (RIE). Os cérebros foram retirados, congelados em gelo seco e armazenados à -80°C . Sob uma lupa refrigerada, a EM foi microdissecada com o auxílio de agulhas de *punch* e a expressão de TH e S^{40}pTH foi avaliada por Western Blotting. Esse protocolo se encontra representado na figura 6.

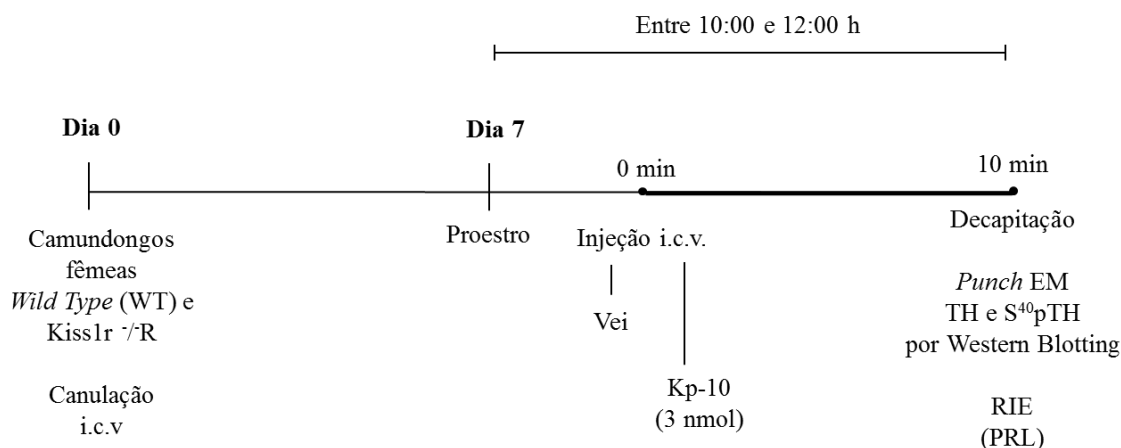


Figura 6: Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 4.

Experimento 5: Efeito do antagonismo dos receptores NPFFR sobre as ações da kisspeptina nos neurônios TIDA e secreção de PRL

Considerando a possível interação entre a kisspeptina e os NPFFR, decidimos avaliar se esse receptor está envolvido nas ações kisspeptinérgicas sobre os neurônios TIDA. Para tal, ratas OVX+E foram tratadas com duas injeções i.c.v. do antagonista para NPFFR (RF-9; 7,5 nmol/2,5 μL cada injeção), 60 e 15 minutos antes da injeção de Kp-10 (1 nmol/1 μL ; n = 10-14 por grupo) ou Vei (n = 7-10 por grupo). Para fins de comparação, foram utilizadas as ratas OVX+E injetadas com Kp-10 ou Vei do experimento 3. Cinco minutos após a última injeção as ratas foram decapitadas e o sangue colhido para a dosagem de PRL e LH por ELISA. O cérebro foi removido e a EM microdissecada para a dosagem de DA e DOPAC por HPLC-ED. Os procedimentos adotados nesse experimento estão representados na figura 7.

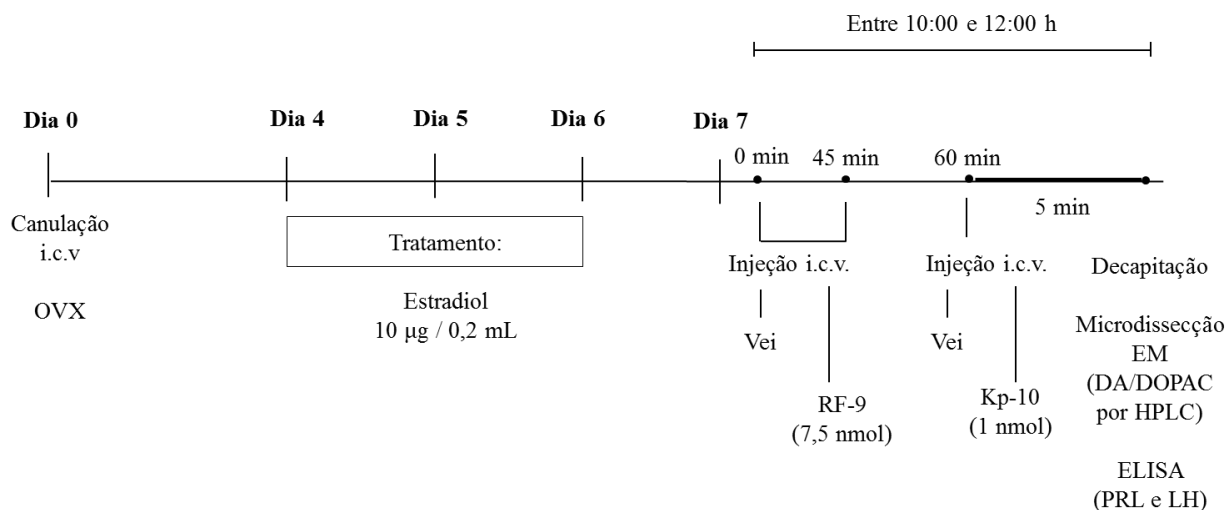


Figura 7: Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 5.

Experimento 6: Efeito da ativação do NPFFR sobre a secreção de PRL e sobre a atividade dos neurônios TIDA

Após estudar o efeito do antagonismo de NPFFR, nesse experimento avaliamos o efeito de sua ativação sobre a atividade dos TIDA e a secreção de PRL. Ratas OVX+E receberam a injeção i.c.v. de 1 nmol de RFRP-3, agonista de NPFFR (n = 8) ou Vei (n = 8). Cinco minutos após a injeção, as ratas foram decapitadas e o sangue colhido para a dosagem de PRL e LH por ELISA. O cérebro foi removido e a EM microdissecada para a dosagem de DA e DOPAC por HPLC-ED. Todos os procedimentos desse experimento estão representados na figura 8.

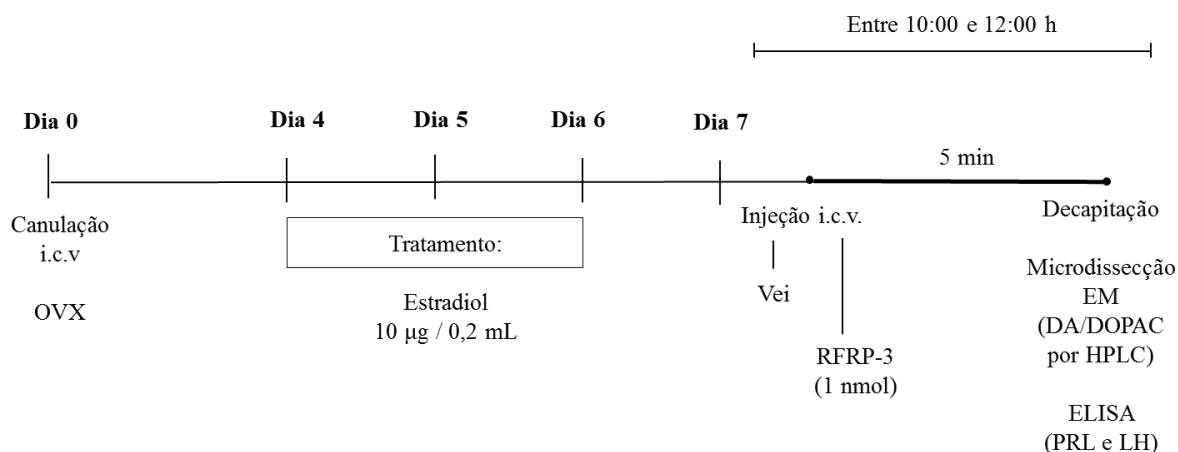


Figura 8: Linha cronológica representativa do protocolo experimental adotado no experimento 6.

3. Procedimentos cirúrgicos

Canulação do ventrículo cerebral lateral direito

Após anestesia intraperitoneal (i.p.) com solução de cetamina e xilasina as ratas foram submetidas à tricotomia e assepsia da calota craniana. Uma incisão longitudinal na porção superior do crânio foi realizada entre a linha dos olhos e das orelhas. Um anestésico local (cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina) foi aplicado abaixo do periósteo para analgesia suplementar e hemostasia. As ratas foram adaptadas ao esteriotáxico para animais de pequeno porte (David Kopf Instruments, M-900, Tujunga, CA, USA) e a barra de incisivos foi ajustada em -3,3 mm. Uma craniotomia foi realizada com o auxílio de broca odontológica e a cânula guia (22 G, 16 mm de comprimento) foi posicionada seguindo as coordenadas estabelecidas à partir do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1998) (AP = 1,0 mm posterior ao bregma, ML = 1,6 mm à direita da sutura longitudinal e DV = 3,2–3,6 mm abaixo da calota craniana). O correto posicionamento da cânula no ventrículo lateral foi verificado pelo deslocamento do menisco em um manômetro preenchido com solução salina. A cânula foi fixada à calota craniana com o auxílio de dois parafusos de aço inoxidável e acrílico odontológico autopolimerizável. Ao fim da cirurgia a cânula foi ocluída em toda a sua extensão com um mandril de aço inoxidável (diâmetro 0,40 mm).

Para a canulação dos camundongos, os animais foram submetidos à anestesia inalatória por isofluorano. Os camundongos foram acondicionados em câmara fechada na qual o fluxo de oxigênio foi mantida constante a 0,4 L/min e a concentração inicial de isofluorano ajustada para 4%. Após completa anestesia, os camundongos foram fixados à um esteriotáxico digital conectado ao fluxo de isofluorano. Os pelos da região craniana foram removidos, uma incisão longitudinal foi realizada entre a linha dos olhos e das orelhas e uma craniotomia foi feita com auxílio de broca odontológica. A cânula

guia foi posicionada no ventrículo lateral direito de acordo com coordenadas estabelecidas no atlas de Paxinos e Franklin (Paxinos & Franklin, 2004) (AP = 0,1 mm posterior ao bregma, ML = 0,7 mm à direita da sutura longitudinal e DV = 2,0 mm abaixo da calota craniana). Um sistema de resina composta fotopolimerizável foi utilizado para fixar a cânula guia à calota craniana. Inicialmente, aplicou-se durante 20 segundos um gel de condicionamento ácido sobre a superfície óssea (Scotchbond™ Universal Etchant, 3M). Após a remoção do gel, a calota craniana foi preparada com o uso de primer não sensível à umidade (Transbond™ MIP Moisture Insensitive Primer) e uma pequena quantidade de adesivo ortodôntico (Transbond XT™ Adhesive paste) foi aplicada à base da cânula em contato com a superfície óssea. Um fotopolimerizador foi direcionado ao adesivo ortodôntico e incidiu-se a luz sobre região durante 20 segundos. Ao final, o camundongo foi removido do estereotáxico e um mandril foi fixado à cânula i.c.v. Após as cirurgias os animais foram monitorados diariamente para verificar o ganho de peso e sinais de dor, desconforto ou infecção.

Ovariectomia

Sob anestesia com cetamina e xilasina i.p., as ratas foram submetidas à tricotomia e desinfecção da região abdominal com álcool iodado. Após laparotomia bilateral, o tecido adiposo subjacente foi divulsionado e o tecido adiposo abdominal foi exposto através de incisão no tecido muscular. A tuba uterina foi clampeada e os ovários removidos. Depois da contenção do sangramento, o tecido adiposo foi reposicionado na cavidade abdominal e as incisões no músculo e na pele foram suturadas com fio de nylon cirúrgico.

4. Microinjeção i.c.v.

No dia do experimento, uma agulha injetora acoplada a um tubo de polietileno (PE-10) foi inserida na cânula guia. A extensão de PE-10 foi conectada a uma seringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV, USA) e o volume total de solução foi injetado durante 1 minuto com o auxílio de uma bomba de infusão (Legato 100, Kd Scientific, Holliston, MA, EUA). Para evitar o refluxo da solução, a agulha injetora foi mantida conectada à cânula guia por 1 minuto após o fim da injeção.

5. Anestésico e drogas

Para a realização da ovariectomia e estereotaxia em ratas, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (cloridrato de cetamina; 80 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/Kg, i.p.). Para a estereotaxia dos camundongos, as fêmeas foram anestesiadas com solução inalável de isoflurano. Após as cirurgias, as ratas receberam tratamento profilático com antibiótico (Pentabiótico, Fort Dodge; 0,2 mL/rata, i.m.) e analgésico (Flunixin meglumina; Banamine, Shering-Plugh; 2,5 mg/Kg peso corporal, s.c.). O estradiol foi administrado na dose diária de 10 µg/0,2mL/rata, s.c., dissolvido em óleo de milho (Szawka et al., 2009; Aquino et al., 2016). No experimento 2, a Kp-10 (metastin 45-54-amide, human; Phoenix Pharmaceuticals) diluída em tampão fosfato-salina (PBS) foi administrada na dose de 3 nmol/3µL i.c.v (Szawka et al., 2010; Aquino et al., 2017). Nos demais experimentos em ratos a Kp-10 foi administrada na dose de 1 nmol/1µL (Szawka et al., 2010). Em camundongos foram injetados 3 nmol/2µL de Kp-10. A Kp-234 (kisspeptina-234; Tocris Bioscience; Bristol; Inglaterra) diluída em PBS e 20% DMSO foi utilizada na dose de 6 nmol/1,2µL por injeção. A dose foi baseada em estudos que mostraram a efetividade de doses entre 1 e 15 nmol por injeção i.c.v. em ratos e camundongos (Roseweir et al., 2009). O RFRP-3 (RFRP-3, human; Tocris

Bioscience; Bristol; Inglaterra) foi administrado na dose de 1 nmol/ μ L i.c.v. diluído em solução contendo 5% de DMSO e 95% de PBS. Essa dose foi escolhida a fim de se equiparar à dose utilizada de Kp-10. O RF-9 (Tocris Bioscience; Bristol; Inglaterra) diluído em PBS e DMSO 10% foi utilizado na dose de 7,5 nmol/2,5 μ L por injeção. A dose foi definida com base em estudos que mostraram a efetividade de injeções i.c.v. entre 5 e 20 nmol (Pineda et al., 2010b).

6. Coleta de sangue

A coleta de sangue através da cauda foi realizada como previamente descrito (Steyn et al., 2013). Os animais foram mantidos em suas caixas originais e um pequeno corte de cerca de 1 a 2 mm foi realizado na extremidade distal da cauda. Uma gota de sangue foi coletada em uma placa de vidro e 10 μ L foram pipetados em um tubo contendo 190 μ L de PBS + 0,05% Tween-20 (Diluição final = 1:20). Entre cada coleta a ponta da cauda foi lavada com solução heparinizada a fim de evitar a coagulação. As amostras foram mantidas a -20 °C até a dosagem de PRL e LH por ELISA. Para evitar o estresse, todos os animais foram habituados aos procedimentos adotados diariamente durante um mês.

Para a coleta de sangue por decapitação, um funil plástico foi conectado a um tubo de 5 mL, ambos heparinizados e o sangue foi colhido do tronco dos animais imediatamente após a decapitação. As amostras foram centrifugadas a 1200 g por 20 min a 4 °C e o plasma armazenado a -20 °C até as dosagens hormonais.

7. Microdissecções

Para as análises por HPLC-ED, imediatamente após a decapitação, os cérebros foram rapidamente removidos da calota craniana e posicionados com a porção ventral

exposta sob uma lupa. Utilizando-se pinças e tesoura oftálmicas, a haste hipofisária foi erguida e um corte abrangendo toda a região da EM foi realizado. Os microtubos contendo as amostras foram mergulhados em nitrogênio líquido até o completo congelamento e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

8. HPLC-ED

As microdissecções da EM foram homogeneizadas em 100 μL de ácido perclórico (PCA) 0,15 M contendo 0,1 mM de EDTA e 56,8 nM de 3,4-diidroxibenzilamina (DHBA; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), utilizado como padrão interno. Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas na mesma análise e a mesma solução de PCA / EDTA / DHBA foi utilizada para todas elas. As amostras em solução foram sonicadas até completa homogeneização e centrifugadas a 12.000 g por 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O pellet foi direcionado à dosagem proteica por Bradford e o sobrenadante foi removido para avaliação das concentrações de DA e DOPAC como previamente descrito (Szawka et al., 2010). A fase móvel do sistema foi constituída de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,38 mM, em água MiliQ e metanol 10%; pH 3,5 ajustado com H_3PO_4 . O fluxo da bomba do HPLC foi ajustado para 1,0 mL/min e o potencial do detector eletroquímico 0,4 V (Decade II, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden). Vinte microlitros de amostra foram injetadas no HPLC com o auxílio de um auto injetor (SIL-10A autosampler, Shimadzu Corporation). As catecolaminas foram separadas em coluna de fase reversa (Purospher Star, 5 μm , 250 x 4 mm; Merck) precedida de pré-coluna C18 (Lichrospher 5 μm , 4 x 4 mm; Merck). A temperatura do forno foi mantida constante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão). A DA e o DOPAC foram identificados de acordo com seu

tempo de eluição e quantificados utilizando-se curvas de calibração pelo método do padrão interno (DHBA). Os níveis de DA foram considerados estimativa do estoque desse neurotransmissor nas vesículas sinápticas. Os níveis de DOPAC foram usados como estimativa da liberação de DA (Lookingland et al., 1987). A razão DOPAC/DA foi utilizada como índice do *turnover* dopaminérgico.

9. Western Blottings

9.1 Micropunches

Imediatamente após a decapitação, os cérebros dos camundongos foram removidos, congeladas em gelo seco envoltos em papel alumínio e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento. Secções coronais de $300\text{ }\mu\text{m}$ foram coletadas ao longo do hipotálamo em um criostato a $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e montadas em uma lâmina de vidro. As lâminas foram levadas ao microscópio sobre uma base de alumínio refrigerada e o ARC e a EM foram microdissecados usando a técnica de *punch* (Palkovits, 1973). Utilizando-se uma agulha de *punch* estéril de $800\text{ }\mu\text{m}$, três coletas foram feitas ao longo do ARC, centradas no terceiro ventrículo, compreendendo a região demonstrada na figura 9 (coordenadas relativas ao bregma em mm: -1,7; -2,0; -2,3) (Paxinos & Franklin, 2004).

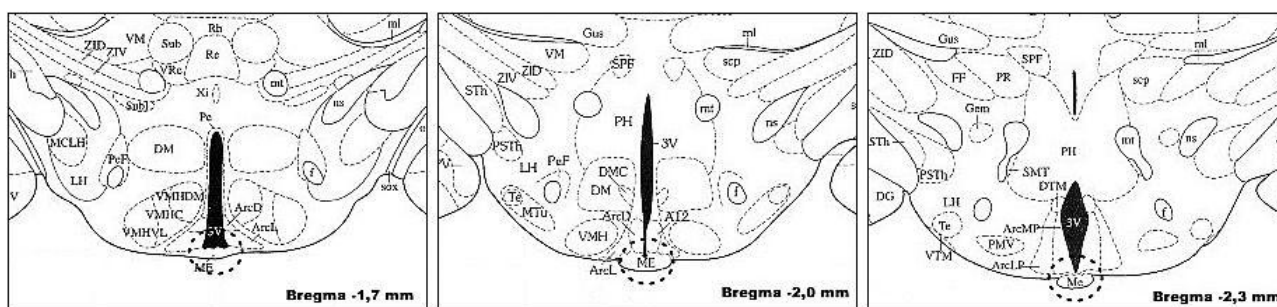


Figura 9: Representação esquemática da região onde foram realizados os *punches* (círculo pontilhado) para a análise da expressão de TH e S^{40}pTH por Western Blotting. Adaptado do Atlas de coordenadas esteriótáxicas de Paxinos e Franklin (Paxinos & Franklin, 2004).

Para a homogeneização dos tecidos, o tampão de amostra foi constituído por um conjunto de inibidores de proteases, serinoproteases e fosfatases. Para prepará-lo, um tablet de *Complete Protease Inhibitor* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) foi dissolvido em 7 mL de Tris HCl 62.5 mM pH 6,8 contendo SDS 0,1%. Um conjunto de inibidores de fosfatases (NaF 10 mM; NaP_2O_7 2 mM; Na_2 glicerofosfato 2 mM; Na_3VO_4 ativado 200 nM) e de inibidores de serinoproteases (Fluoreto de Fenilmetanosulfonila – PMSF 1 mM) foi adicionado à solução. Os tecidos foram sonicadas em 20 μL do tampão de amostra preparado no máximo 30 min antes da dissecação e armazenados à -80 °C até a eletroforese.

9.2 Eletroforese em gel SDS-PAGE

O gel de poli(acrilamida / dodecil sulfato de sódio (em inglês *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou SDS-PAGE) foi formado por duas fases distintas: o gel de separação e o gel de empilhamento. O gel de separação foi constituído por acrilamida 7,5% e SDS 0,1% em tampão Tris 375 mM; pH 8,8. O gel de empilhamento foi composto por acrilamida 4% e SDS 0,1% em tampão Tris 84 mM; pH 8,8. Para catalisar a polimerização da acrilamida, 0,05% de persulfato de amônio e 0,05% de N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED) foram adicionados ao géis imediatamente antes do uso. Dois cassetes para eletroforese (1 mm gel cassettes, NOVEX by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram semi-preenchidos com o gel de separação, cobertos com água Milli Q e refrigerados a 4 °C *overnight*. A água foi removida e o gel de empilhamento (preparado imediatamente antes do uso) foi adicionado ao topo do cassete. Um pente plástico de 10 canais foi introduzido no gel de empilhamento antes de sua polimerização para criar as canaletas de corrida. O gel foi

mantido a temperatura ambiente por cerca de 30 min até sua completa polimerização, após a qual o pente plástico foi removido.

As amostras foram descongeladas e 5 μL do tampão de corrida (azul de bromofenol 0,01 mM; glicerol 56%; β -mercaptoetanol 3,5% e SDS 0,1% em Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8) foram adicionados a cada tubo. Para a desnaturação proteica, os tecidos foram aquecidos a 96 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min e resfriados em gelo. Vinte μL de cada amostra foram pipetados no gel de SDS-PAGE em uma ordem pré-estabelecida, de forma que cada gel contivesse no mínimo uma amostra de cada grupo experimental. Na primeira canaleta pipetaram-se 20 μL do padrão de peso molecular (Amersham ECL Rainbow Marker; GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) diluído a 10% em Tris-HCL 62,5 mM; pH 6,8.

A cuba de eletroforese (Bio-RAD Mini Trans-Blot System, Hercules, CA, EUA) foi preenchida com tampão de corrida e os cassetes com os géis e amostras foram submetidos a uma corrente elétrica constante (125 V; 200 mA) por 2 horas.

9.3 Transferência para membrana de nitrocelulose

As proteínas foram transferidas do gel SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose (tamanho do poro 0,45 μm). O gel foi removido dos cassetes, colocado sobre a membrana e o complexo gel/membrana foi revestido em ambos os lados por folhas de papel filtro (Whatman, 3MM filter paper, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O complexo foi envolto por esponjas (Sponge Pad for XCell blotting, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) pré-embebidas em tampão de transferência (Glicina 96 mM; metanol 10% em tampão Tris 12mM). Antes do procedimento, as esponjas foram imersas no tampão de transferência por cerca de 30 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Para a remoção de bolhas um tubo falcon foi gentilmente rolado sobre as esponjas. O complexo foi

montado em um cassete preenchido com tampão de transferência resfriado e submetido a uma corrente elétrica constante (125 V; 200 mA) por 2 horas.

9.4 *Imunodeteção*

As membranas foram removidas do cassete, lavadas com tampão Tris-Salina (TBS; Tris 1Mm; NaCl 15 mM; pH 7.6) e incubadas em solução de bloqueio (Odyssey Blocking Buffer, Li-Cor, Lincoln, EUA) a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, o material foi lavado 3 vezes por 10 minutos com TBS acrescido de Tween 0,1% (protocolo repetido para todas as lavagens subsequentes). As membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpos para TH (Anti-Tyrosine Hydroxylase Antibody, clone LNC1; Milipore; Billerica, EUA, diluição 1:1000) e S⁴⁰pTH (Rabbit anti-rat S⁴⁰pTH; Zymed Laboratories; Invitrogen, Caramillo, CA, EUA, diluição 1:1000) diluídos em TBS-Tw 0,1% + 5% de albumina. As membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários (926-32210 IRDye 800CW Goat anti-mouse IgG e 926-3221 IRDye 680 Goat anti-rabbit antibody, Li-Cor Biosciences, Lincoln, USA, Diluição 1:10.000) por 2 horas, protegidas da luz. Ao fim do processo, o material foi lavado 3 vezes com TBS-Tw 0,1% e uma vez com TBS.

9.5 *Revelação e reincubação*

As membranas foram posicionadas no leitor de fluorescência (Odyssey Infrared Imaging System, Li-Cor, Lincoln, EUA) e excitadas com luz nos comprimentos de onda de 700 (para visualização da marcação para S⁴⁰pTH) e 800 nm (para visualização da marcação para TH). A luz emitida foi captada pelo aparelho e registrada em uma imagem digital.

As membranas foram novamente bloqueadas por 2 horas e submetidas ao protocolo de incubação e revelação, para a marcação de β -tubulina (β -tubulin Rabbit Antibody, Cell Signalling Technologies, Danvers, EUA).

As bandas foram identificadas pelo seu peso molecular em comparação ao padrão (TH e S^{40} pTH = 240 kDa; β -tubulina = 55kDa) e a intensidade do sinal foi mensurada utilizando o software Image Studio Lite (Li-Cor, Lincoln, EUA). Os dados foram expressos como razão S^{40} pTH/TH.

10. ELISA

As concentrações de PRL e LH foram analisadas no sangue total por ELISA conforme descrito (Aquino et al., 2017). Placas de 96 poços (Corning, 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Band Microplate; Life Science; St. Louis, EUA) foram pré-adsorvidas com 50 μ L/poço do anticorpo de captura *overnight* a 4 °C (Guinea Pig anti-rPRL-IC; AFP65191; NIDDK- NHPP; diluição 1:500 em PBS ou LH β 518B7 monoclonal antibody , University of California, diluição 1:2.500). Todas as incubações subsequentes foram feitas em câmara úmida, a temperatura ambiente e sob agitação, exceto quando mencionado. A placas foram vertidas e incubadas durante 2 h com 200 μ L de solução de bloqueio (leite em pó 5% em PBS 0,05% + Tween-20; PBS-T). Após esse período, as placas foram submetidas a uma série de lavagem de 3 vezes por 3 minutos com PBS-T. As placas foram incubadas durante 24 h com 50 μ L das amostras ou padrões. Para a dosagem de LH as amostras foram diluídas 20 X em PBS-T e a curva padrão foi montada a partir de diluições seriadas do padrão de LH (rLH; RP-3; AFP718B, NIDDK-NHPP) sendo o primeiro ponto da curva 10 ng/mL e o último ponto 0,019 ng/mL. Para a dosagem de PRL as amostras foram diluídas 100 X e de forma semelhante a curva foi preparada a partir da diluição do padrão de PRL (rPRL, NIDDK-

rPRL-RP-3; AFP-4459B Parlow RIA kit), sendo a concentração do primeiro ponto 15 ng/mL e a do último ponto 0,03 ng/mL. Em todos os ensaios, amostras com concentrações conhecidas de PRL e LH foram utilizadas como controle de qualidade. Após o período de incubação, 50 µL do anticorpo de detecção (rabbit anti-mouse PRL, F. Talamantes; University of Santa Cruz, CA, USA, diluição 1:25.000 em solução de bloqueio ou rabbit anti-rLH AFP240580Rb, NIDDK-NHPP, diluição 1:40.000) foram adicionados. Após 24 hs de incubação a 4 °C, as placas foram lavadas e incubadas durante 90 minutos com 50 µL do anticorpo secundário (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, P044801-2, Dako Pathology Solutions, Santa Clara, CA, diluição 1:2.000 em 50% PBS-T e 50% solução de bloqueio). As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de OPD (o-Phenylenediamine; P1526, Sigma-Aldrich, 2 mg/mL diluído em tampão citrato; pH 5,0 contendo 0,02% de peróxido de hidrogênio) por 45 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido clorídrico 3M. As placas foram lidas a 490 e a leitura a 650 nm foi utilizada para correção do background. As concentrações foram obtidas a partir da interpolação da densidade óptica das amostras na regressão não-linear das respectivas curvas padrão, utilizando o software Sigma-Plot. Todas as amostras do mesmo experimento foram dosadas no mesmo ensaio. Para a PRL o limite de detecção foi 0,20 ng/mL e os coeficientes de variação intraensaio e interensaio foram 2,1% e 11,3%, respectivamente. Para o LH o limite de detecção foi 0,07 ng/mL e os coeficientes de variação intraensaio e interensaio foram 3,3% e 10,4%, respectivamente.

11. Radioimunoensaio

As amostras coletadas do tronco de camundongos após decapitação foram dosadas por RIE conforme previamente descrito (Steyn et al., 2007). A PRL marcada

com ^{125}I (^{125}I -PRL) foi diluída no tampão de ensaio (PBS 0,1 M; 0,25% de albumina; 0,01% de azida de sódio e soro normal de coelho 1:400) a uma concentração de 20.000 CPM (counts per minute) / 50 μL . Dez microlitros de cada amostra e de controles de qualidade (plasma de camundongos com concentrações conhecidamente altas e baixas de PRL) foram adicionados a 50 μL de ^{125}I -PRL e 100 μL do anticorpo primário. A curva de calibração foi obtida a partir da diluição seriada do padrão de PRL (mouse PRL reference preparation AFP6476C - NHPP), tendo como concentração mais alta 200 ng/mL e como menor concentração 0,1 ng/mL. Cinquenta μL de cada um dos 12 pontos da curva padrão foram pipetados em tubos contendo 50 μL de ^{125}I -PRL e 100 μL do anticorpo primário. A radiação total adicionada às amostras (TC) foi confirmada pela leitura de 50 μL da solução de ^{125}I -PRL em tampão de ensaio. Para verificar a taxa de ligação do anticorpo ao peptídeo marcado (TB), 100 μL do anticorpo primário (anti-mousePRL antiserum AFP131078 - NHPP; diluição 1:400.000) foram incubados com 50 μL de ^{125}I -PRL. A ligação não-específica (NSB) do teste foi determinada pela leitura de um tubo contendo 50 μL de ^{125}I -PRL e 250 μL do tampão. A porcentagem de ligação total do ensaio foi de 15%. Exceto para o TC, o volume de todos os tubos foi completado com tampão de ensaio de forma a se obter um volume final de 300 μL . Os tubos foram vortexados e incubados a temperatura ambiente *overnight*.

A fração de ^{125}I -PRL livre foi separada da porção ligada ao anticorpo primário pela adição de 100 μL da suspensão contendo o anticorpo secundário revestido por moléculas de celulose (SAC-CEL Anti-rabbit IgG; Immunodiagnosics Systems LTDA, Boldon, Inglaterra). Os tubos foram vortexados e incubados a temperatura ambiente por 30 min. Adicionou-se 1 mL de água destilada a todos os tubos (exceto o TC), que foram centrifugados por 30 min a 3.000 rpm e 4 °C. Os tubos foram vertidos durante 5 min e a contagem da radiação remanescente no precipitado foi realizada utilizando o Gamma

Counter Wizard 1470 (Perkin Elmer, Waltham, EUA). As concentrações das amostras foram obtidas a partir da interpolação das contagens obtidas na regressão não-linear da curva padrão.

12. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Para a análise das concentrações de PRL e LH no experimento 1, as diferenças entre os tempos de um mesmo grupo experimental foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, enquanto as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo ANOVA de duas vias. No experimento 3, as diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA de uma via. No experimento 6, as diferenças entre os níveis hormonais e dopaminérgicos foram determinadas pelo teste t de Student. Em todos os demais experimentos, as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo ANOVA de duas vias. Todas as análises de variância foram seguidas pelo pós-teste de Bonferroni.

RESULTADOS

Experimento 1: Envolvimento do receptor Kiss1r no pico fisiológico de PRL induzido por estradiol em ratas

É conhecido que o tratamento com estradiol durante três dias consecutivos em doses fisiológicas altas promove picos de LH e PRL na tarde do quarto dia (Aquino et al., 2016). Nesse experimento, avaliamos a importância da sinalização kisspeptina-Kiss1r para a gênese dos picos de PRL e LH induzidos por estradiol. A figura 10 demonstra o perfil de secreção da PRL e LH ao longo da tarde nas ratas OVX+E que receberam a injeção i.c.v. de Kp-234 ou Vei. Como esperado, o tratamento com estradiol promoveu um pico de PRL nas ratas Vei que se iniciou às 14:30 h ($124,1 \pm 57,3$ ng/mL) e permaneceu até as 18:00 h ($128,5 \pm 35,6$ ng/mL). Já nas ratas Kp-234, os níveis de PRL se mostraram maiores que os valores basais ($5,9 \pm 2,7$ ng/mL) apenas a partir das 16:30 h ($119,7 \pm 51,0$ ng/mL; $P < 0,01$), evidenciando uma atenuação da fase inicial do pico de PRL induzido por estradiol em decorrência do bloqueio de Kiss1r. Adicionalmente, no intervalo compreendido entre 14:30 e 16:00 h, a liberação de PRL foi significativamente menor nas ratas Kp-234 comparado àquelas injetadas com Vei ($P < 0,05$; Fig. 10A). Esse padrão se refletiu na análise integrada do aumento da secreção de PRL, determinada pela área sob a curva em relação aos níveis basais (ASCi), na qual as ratas Kp-234 apresentaram valores significativamente menores ($322,6 \pm 62,8$ ng/mL) que as ratas Vei ($702,5 \pm 119,1$ ng/mL; $P < 0,05$; Fig. 10B).

A figura 10C apresenta os níveis de LH em ratas OVX+E tratadas com Kp-234 ou Vei. No grupo injetado com Vei, comparado ao valor basal às 13:00 h ($2,2 \pm 0,8$ ng/mL), a ANOVA de uma via revelou um aumento significativo da secreção de LH às 17:30 ($7,9 \pm 1,4$ ng/mL) e 18:00 h ($6,6 \pm 0,4$ ng/mL; $P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente). Por sua vez, nas ratas Kp-234 nenhuma diferença foi observada entre o valor basal de LH e os demais períodos estudados, demonstrando um bloqueio do pico

de LH induzido por estradiol após a inibição de Kiss1r. Ainda, comparado às ratas Vei, o grupo Kp-234 apresentou níveis de LH significativamente menores no período compreendido entre 17:30 e 18:00 h. Esse efeito se refletiu na ASCi dos níveis de LH, que foi significativamente reduzida nas ratas Kp-234 ($2,3 \pm 0,8$ ng/mL) comparado às ratas Vei ($9,9 \pm 2,2$ ng/mL; $P < 0,05$; Fig. 10D).

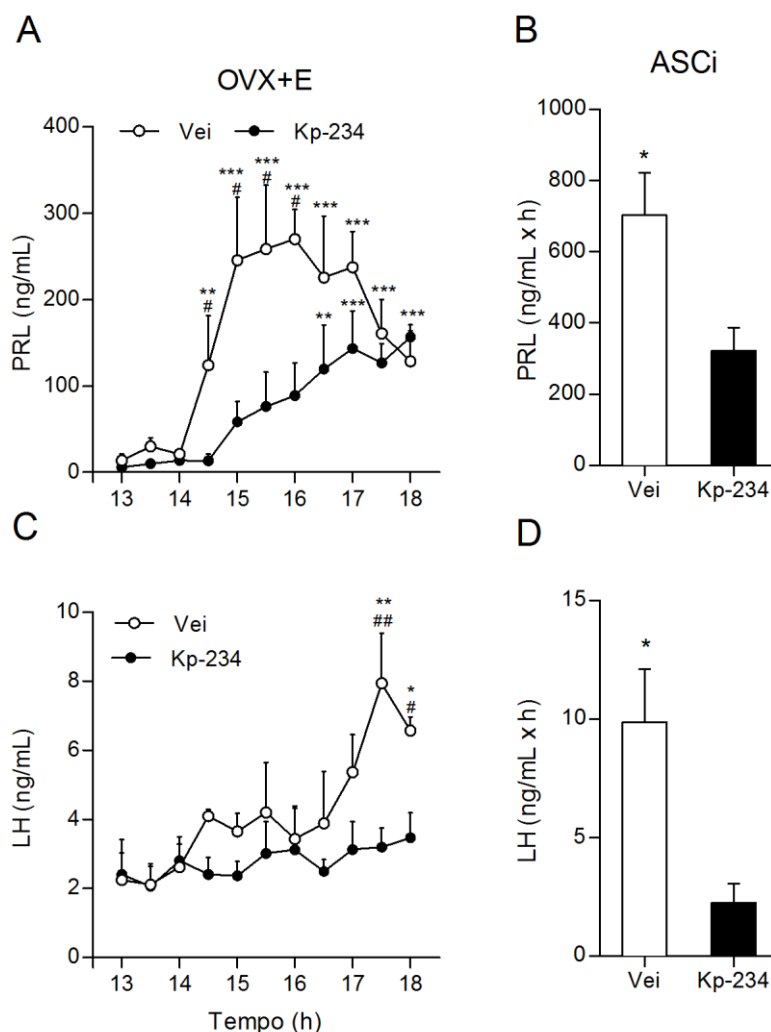


Figura 10: Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 sobre a secreção de PRL e LH induzidas por estradiol. Ratas ovariectomizadas (OVX) foram tratadas por três dias consecutivos com injeções s.c. de estradiol (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam três injeções i.c.v. do antagonista de Kiss1r (Kp-234) ou Vei ($n = 6$ por grupo) às 10:00, 12:00 e 14:00 h. Entre 13:00 e 18:00 h, amostras de sangue foram colhidas a cada meia hora para dosagem de PRL e LH. Níveis plasmáticos de PRL (A) e LH (C) em ratas OVX+E injetadas com Kp-234 ou Vei. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$ comparado às 13:00 h do mesmo grupo. $\#P < 0,05$ e $\#\#P < 0,01$ comparado ao grupo Vei. (B,D) Área sob a curva em relação aos valores basais (ASCi) das concentrações de PRL (B) e LH (D) $*P < 0,05$ Vei versus Kp-234. Dados apresentados como média+EPM.

Experimento 2: Efeito do bloqueio de Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH em ratas

A figura 11 demonstra o efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 sobre a ação estimulatória da Kp-10 na secreção de PRL e LH. Conforme esperado, a injeção de 3nmol de Kp-10 promoveu um aumento significativo dos níveis plasmáticos de PRL ($2,8 \pm 0,5$ ng/mL) quando comparado à injeção de Vei ($1,1 \pm 0,3$ ng/mL; $P < 0,05$). A resposta da PRL, entretanto, foi inibida quando o Kiss1r foi bloqueado com Kp-234, uma vez que não houve diferença significativa entre os níveis de PRL das ratas Kp-234+Kp-10 ($1,7 \pm 0,3$ ng/mL) e Kp-234+Vei ($1,6 \pm 0,4$ ng/mL; Fig. 11A).

Similarmente, a injeção i.c.v. de Kp-10 elevou potentemente a secreção de LH nas ratas OVX+E ($53,1 \pm 8,5$ ng/mL) comparado aos animais injetados com Vei ($8,9 \pm 0,9$ ng/mL; $P < 0,001$; Fig. 11B). A análise dos grupos tratados com Kp-234 revelou que os níveis de LH foram significativamente maiores nas ratas Kp-234+Kp-10 ($30,2 \pm 5,7$ ng/mL) comparado às ratas Kp-234+Vei ($10,4 \pm 1,0$ ng/mL; $P < 0,05$) evidenciando que o bloqueio de Kiss1r não foi suficiente para inibir a ação kisspeptinérgica sobre a secreção de LH. Por outro lado, ratas Kp-234+Kp-10 apresentaram valores de LH significativamente menores ($30,2 \pm 5,7$ ng/mL) que o de ratas Vei+Kp-10 ($53,1 \pm 8,5$ ng/mL; $P < 0,05$) demonstrando que, nessa situação experimental, o antagonismo de Kiss1r, apesar de não inibir completamente, reduziu a ação estimulatória da kisspeptina sobre a secreção de LH.

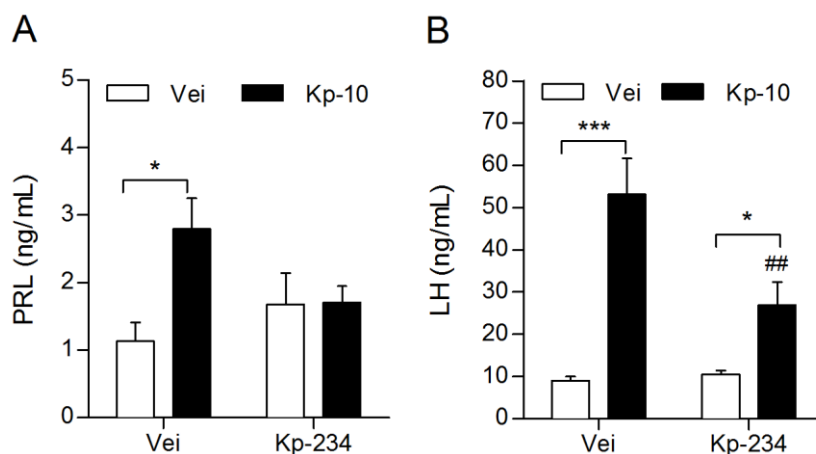


Figura 11: Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam duas injeções i.c.v. de Kp-234 ou Veil, 60 e 45 min antes da injeção i.c.v. de 3 nmol de Kp-10 ou Veil (n = 8 por grupo). As ratas foram decapitadas 10 min após a última injeção i.c.v. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ Veil vs Kp-10. ## $P < 0,01$ em relação ao grupo Veil+ Kp-10. Dados expressos em média \pm E.P.M.

Experimento 3: Efeito do bloqueio de Kiss1r na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA em ratas

Estudos prévios demonstraram que o bloqueio de Kiss1r com a Kp-234 inibe a ação estimulatória da kisspeptina sobre o LH (Roseweir et al., 2009). Entretanto, os resultados do experimento anterior demonstraram que, mesmo após o tratamento com Kp-234, a Kp-10 estimulou a secreção de LH, ainda que de forma reduzida. Esses dados nos levaram a contestar a relação das doses antagonista/droga. Por esse motivo, no experimento 3, aumentamos a relação entre as doses de Kp-234 e Kp-10 ao reduzirmos a dose de Kp-10. Também diminuimos o intervalo de tempo entre a injeção de Kp-10 e a eutanásia das ratas para 5 minutos, com o objetivo de melhor avaliar a resposta dos neurônios TIDA.

A figura 12 apresenta os valores plasmáticos de PRL e LH em ratas tratadas com Kp-234 e injetadas com Kp-10. Conforme demonstrou a ANOVA de uma via, a injeção i.c.v. de 1 nmol de Kp-10 elevou significativamente os níveis plasmáticos de PRL ($2,7 \pm 1,1$ ng/mL) em comparação aos animais tratados com Veil ($1,0 \pm 0,1$ ng/mL; $P < 0,05$;

Fig 12A). Por sua vez, o pré-tratamento com Kp-234 bloqueou o efeito da Kp-10, promovendo níveis de PRL nas ratas Kp-234+Kp-10 ($0,4 \pm 0,1$ ng/mL) significativamente menores que os de animais injetados com Vei ou Kp-10. ($P < 0,05$).

A figura 12B apresenta os níveis plasmáticos de LH nos grupos estudados. A ANOVA de uma via revelou um aumento significativo do LH no grupo Kp-10 ($26,9 \pm 5,1$ ng/mL) comparado ao grupo Vei ($9,0 \pm 0,8$ ng/mL; $P < 0,001$; Fig. 12B). Por outro lado, o tratamento com Kp-234 impediu o efeito estimulatório da Kp-10 sobre o LH, tendo em vista que as concentrações plasmáticas desse hormônio no grupo Kp-234+Kp10 ($7,5 \pm 0,6$ ng/mL) foram semelhantes às do grupo Vei e significativamente menores que as do grupo Kp-10 ($P < 0,001$).

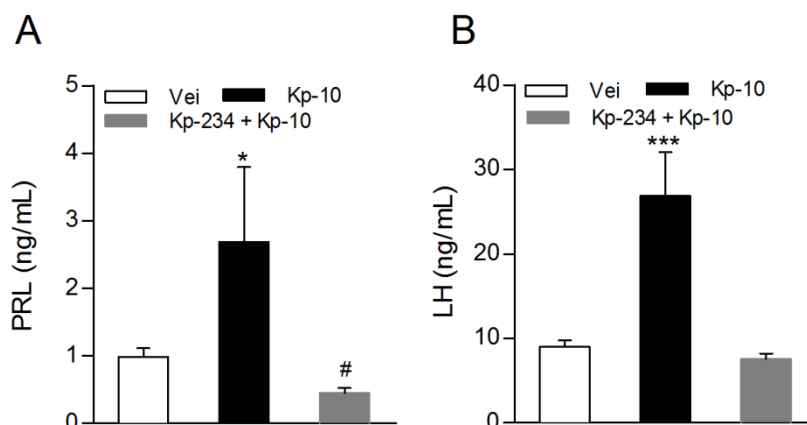


Figura 12: Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos com estradiol (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam duas injeções i.c.v de Kp-234, 60 e 45 min antes da injeção i.c.v. de 1 nmol de Kp-10 ($n = 7-10$ por grupo). As ratas foram decapitadas 5 min após a última injeção i.c.v. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ comparado ao Vei. # $P < 0,05$ em relação aos demais grupos. Dados expressos em média \pm E.P.M.

A figura 13 apresenta o efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 sobre os parâmetros dopaminérgicos na EM de ratas OVX+E. A injeção de Kp-10 reduziu em 40 % a razão DOPAC/DA na EM comparado ao grupo Vei ($P < 0,05$). Interessantemente as ratas Kp-234+Kp-10 também apresentaram uma redução em torno de 49 % na razão

DOPAC/DA na EM comparado ao grupo Vei ($P < 0,05$), evidenciando que o bloqueio de Kiss1r em nada alterou a resposta do *turnover* dopaminérgico à Kp-10.

As alterações da razão DOPAC/DA foram associadas a uma elevação das concentrações de DA. Tanto o grupo Kp-10 quanto o grupo Kp-234+Kp-10 apresentaram níveis de DA significativamente maiores (71 % e 61 % , respectivamente) que o de ratas Vei ($P < 0,05$; Fig. 13B). Por fim, nenhuma diferença significativa nos níveis de DOPAC foi observada entre os grupos estudados.

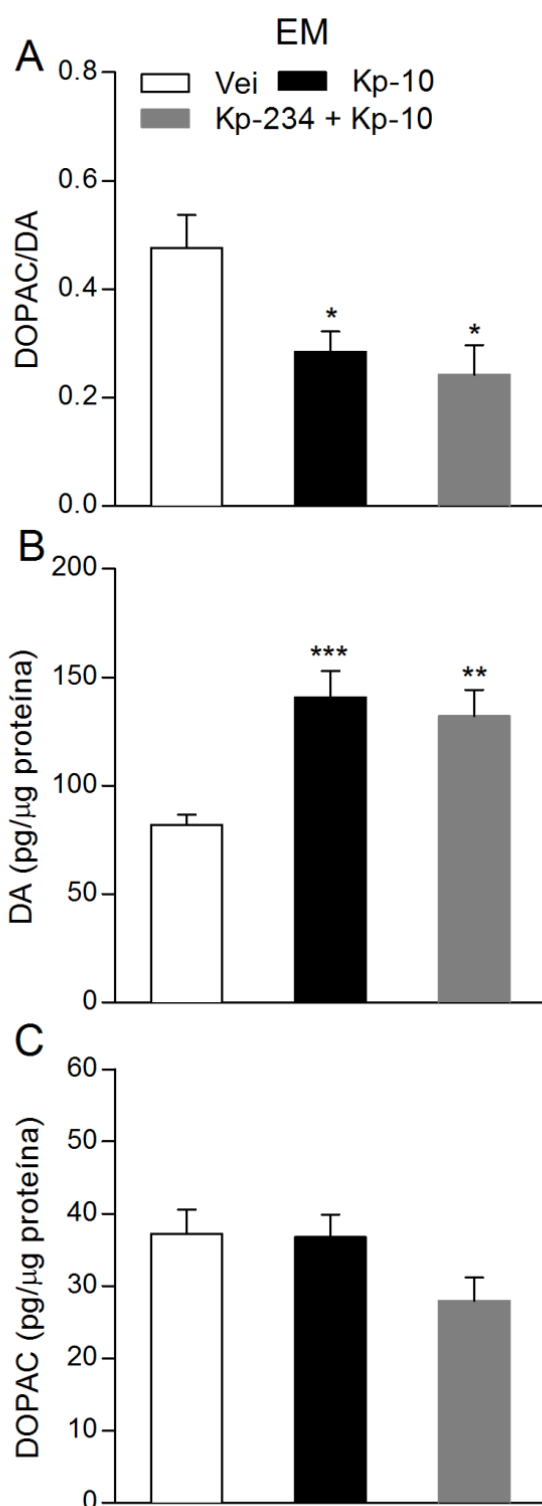


Figura 13: Efeito do bloqueio de Kiss1r com Kp-234 na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam duas injeções i.c.v de Kp-234 60 e 45 min antes da injeção i.c.v. de 1 nmol de Kp-10 (n = 7-10 por grupo). As ratas foram decapitadas 5 min após a última injeção i.c.v. (A-C) Razão DOPAC/DA e concentrações de DA e DOPAC na EM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Vei. Dados expressos em média \pm E.P.M.

Experimento 4: Avaliação do efeito da kisspeptina sobre a secreção de PRL e expressão de TH e S⁴⁰pTH na EM de camundongos transgênicos Kiss1r^{-/-}R

A figura 14 apresenta os níveis plasmáticos de PRL e a expressão de TH e S⁴⁰pTH na EM de camundongos fêmeas WT e Kiss1r^{-/-}R tratadas com Kp-10 ou Vei. Imagens representativas da análise de WB fluorescente para TH e S⁴⁰pTH na EM são apresentadas na figura 14A. As bandas foram quantificadas e representadas graficamente. Conforme demonstrado na figura 14B, a injeção de Kp-10 em camundongos WT não alterou a razão S⁴⁰pTH/TH ($0,6 \pm 0,2$) comparado aos animais injetados com Vei ($0,4 \pm 0,05$). Semelhantemente, a razão S⁴⁰pTH/TH não foi alterada pela injeção de Kp-10 nos camundongos Kiss1r^{-/-}R. Entretanto, a ANOVA de duas vias revelou níveis de PRL significativamente maiores nos animais WT tratados com Kp-10 ($18,4 \pm 4,3$ ng/mL) comparado aos animais injetados com Vei ($7,2 \pm 1,8$ ng/mL; $P < 0,05$). Este efeito estimulatório da Kp-10 sobre a PRL foi suprimido nos animais Kiss1r^{-/-}R, nos quais os níveis de PRL foram estatisticamente semelhantes após a injeção de Kp-10 ($6,4 \pm 2,4$ ng/mL) ou Vei ($6,8 \pm 2,1$ ng/mL; Fig. 14C).

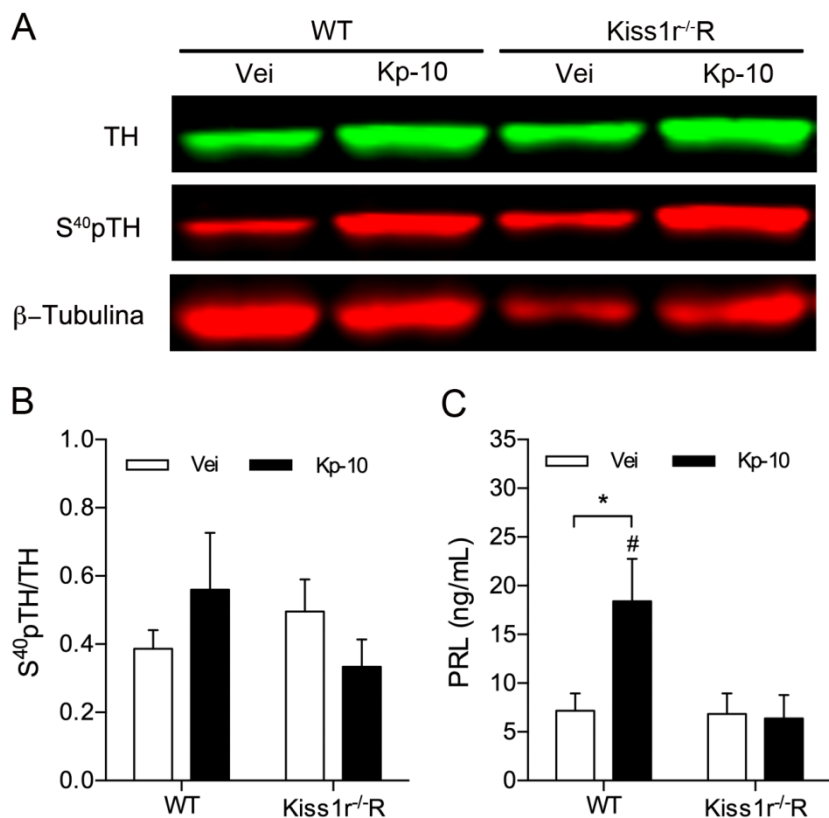


Figura 14: Níveis de PRL e razão tirosina hidroxilase (TH)/tirosina hidroxilase fosforilada na serina 40 (S⁴⁰pTH) na EM de animais *wild type* (WT) e Kiss1r^{-/-}R. Camundongos fêmeas em proestro foram decapitadas 10 minutos após a injeção i.c.v de 3 nmol de Kp-10 ou Vei (n = 6 por grupo). (A) Imagens representativas da membrana de Western Blotting fluorescentemente marcada para TH, S⁴⁰pTH e β-tubulina em microdissecções da EM. (B) Representação gráfica da razão S⁴⁰pTH/TH na EM dos grupos estudados. (C) Níveis plasmáticos de PRL em camundongos WT e Kiss1r^{-/-}R. **P* < 0,05 em relação ao Vei; #*P* < 0,05 comparado ao grupo Kiss1r^{-/-}R que recebeu Kp-10. Dados expressos como média ± EPM.

Experimento 5: Efeito do antagonismo dos receptores NPFFR sobre as ações da kisspeptina nos neurônios TIDA e secreção de PRL em ratas

Os resultados anteriores sugeriram que os efeitos da Kp-10 sobre os terminais dopaminérgicos na EM são exercidos de forma independente do receptor Kiss1r. Assim, testamos se a Kp-10 se ligaria aos NPFFR para regular a atividade dopaminérgica na EM. A figura 15 apresenta os níveis plasmáticos de PRL e LH em ratas tratadas com o antagonista de NPFFR (RF-9) e injetadas com Kp-10, ambos i.c.v. Conforme demonstrado pela ANOVA de duas vias, a injeção i.c.v. de Kp-10 elevou

significativamente os níveis de PRL ($2,5 \pm 1,0$ ng/mL) comparado ao grupo injetado com Vei ($0,9 \pm 0,1$ ng/mL; $P < 0,05$; Fig. 15A). Por outro lado, o efeito da Kp-10 foi bloqueado pelo pré-tratamento com RF-9, conforme evidenciado pelos valores similares de PRL entre as ratas RF-9+Kp-10 ($1,2 \pm 0,2$ ng/mL) e RF-9+Vei ($1,8 \pm 0,6$ ng/mL).

Na figura 15B são apresentadas as respostas do LH à Kp-10 nos grupos estudados. Como esperado, quando comparado ao grupo Vei ($8,9 \pm 0,8$ ng/mL) a injeção de Kp-10 elevou significativamente os níveis plasmáticos de LH ($24,18 \pm 4,9$ ng/mL; $P < 0,01$). O tratamento com RF-9 estimulou a secreção de LH promovendo níveis hormonais estatisticamente maiores ($40,1 \pm 8,3$ ng/mL) que os de animais Vei ($P < 0,01$). Ainda, a secreção de LH permaneceu elevada nas ratas tratadas com RF-9 e Kp-10 ($46,6 \pm 8,1$ ng/mL), sendo os níveis significativamente maiores comparado àquelas tratadas apenas com Kp-10 ($P < 0,05$).

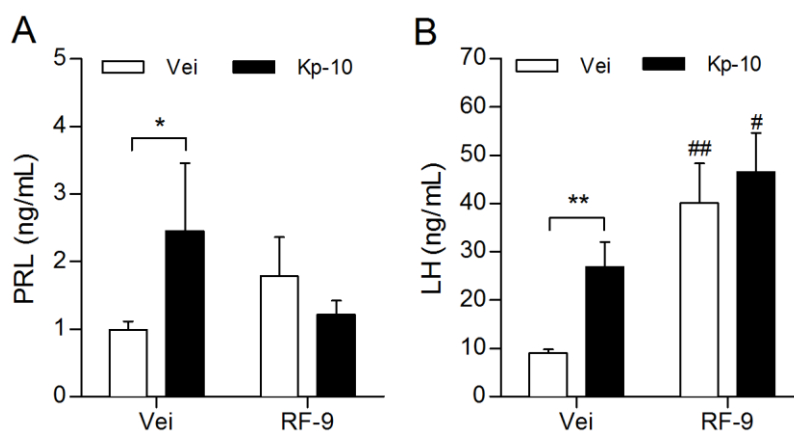


Figura 15: Efeito do bloqueio de NPFFR com RF-9 na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e LH. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam duas injeções i.c.v de RF-9 ou Vei, 60 e 45 min antes da injeção i.c.v. de 1 nmol de Kp-10 ou Vei (n = 7-14 por grupo). As ratas foram decapitadas 5 min após a última injeção i.c.v. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Vei vs Kp-10. # $P < 0,05$; ## $P < 0,001$ em relação aos grupos Vei+Kp-10 e Vei, respectivamente. Dados expressos em média \pm E.P.M.

A figura 16 apresenta os parâmetros dopaminérgicos na EM em resposta à Kp-10 nas ratas cujo NPFFR foi bloqueado com RF-9. A injeção de Kp-10 reduziu em 44% a razão DOPAC/DA em relação ao grupo injetado com Vei ($P < 0,01$; Fig. 16A). Esse

efeito da Kp-10 foi inibido no grupo RF-9+Kp-10, cuja razão DOPAC/DA foi semelhante à de animais RF-9+Vei. As alterações da kisspeptina na razão DOPAC/DA foram relacionadas a mudanças no conteúdo de DA na EM. Ratas injetadas com Kp-10 tiveram valores de DA 85% maiores que os de ratas Vei ($P < 0,001$). Novamente o efeito da Kp-10 foi inibido pelo tratamento com RF-9, tendo em vista que o conteúdo de DA das ratas RF-9+Kp-10 foi semelhante ao das ratas RF-9+Vei e significativamente menor que o de ratas tratadas apenas com Kp-10 (35%; $P < 0,05$). Por outro lado, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do RF-9 de aumentar o conteúdo de DA (33%) comparado às ratas que receberam a injeção apenas de Vei ($P < 0,05$).

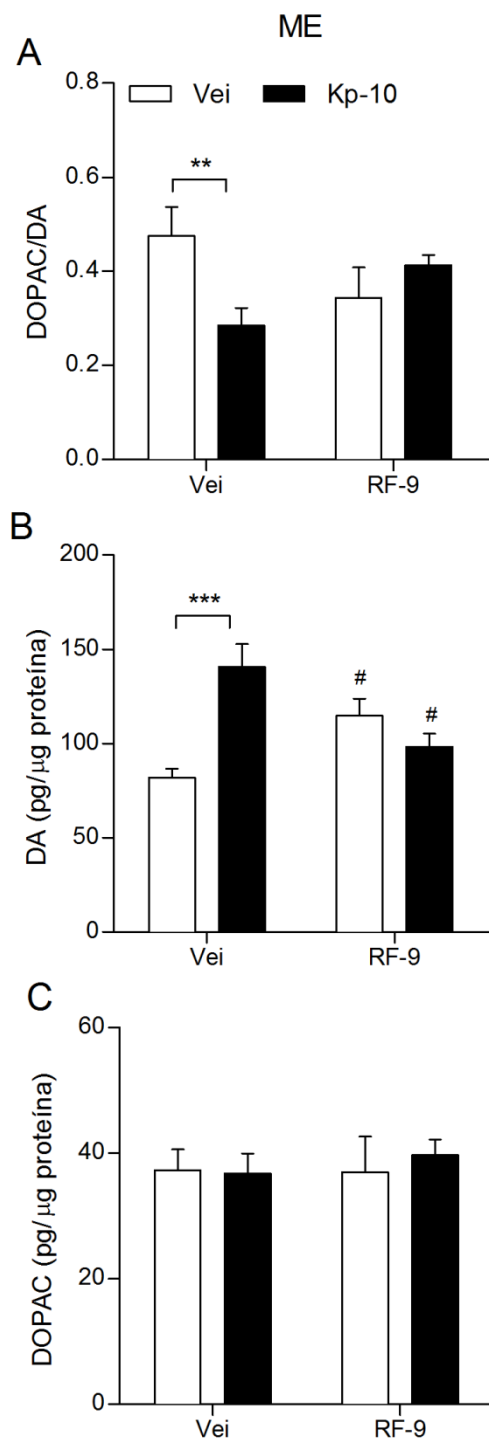


Figura 16: Efeito do bloqueio de NPFFR com RF-9 na ação da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam duas injeções i.c.v de RF-9 ou Vei 60 e 45 min antes da injeção i.c.v. de 1 nmol de Kp-10 ou Vei (n = 7-14 por grupo). As ratas foram decapitadas 5 min após a última injeção i.c.v. (A-C) Razão DOPAC/DA e concentrações de DA e DOPAC na EM. $**P < 0,01$; $***P < 0,001$ comparado ao grupo Vei. $\#P < 0,05$; $\#\#P < 0,01$ em relação ao grupo pré-tratado com Vei que recebeu a mesma injeção icv (Kp-10 ou Vei). Dados expressos em média \pm E.P.M.

Experimento 6: Efeito da ativação do NPFFR sobre a secreção de PRL e sobre a atividade dos neurônios TIDA em ratas

Tendo em vista que os resultados do experimento anterior mostraram que o bloqueio de NPFFR impede a ação da kisspeptina nos neurônios dopaminérgicos, decidimos investigar o efeito da estimulação específica de NPFF1R sobre a atividade dopaminérgica na EM e secreção de PRL. A figura 17 apresenta as concentrações de PRL e LH em ratas OVX+E após a injeção icv de 1 nmol do agonista de NPFF1R (RFRP-3). Conforme indicado pelo teste-t de Student o tratamento com RFRP-3 elevou significativamente a secreção de PRL ($2,5 \pm 0,5$ ng/mL) em relação às ratas injetadas com Vei ($1,0 \pm 0,2$ ng/mL; $P < 0,05$, Fig. 17A). O efeito estimulatório do RFRP-3 entretanto não foi observado sobre a secreção de LH, que foi estatisticamente semelhante entre os grupos tratados com RFRP-3 ($9,2 \pm 0,5$ ng/mL) ou Vei ($9,5 \pm 0,9$ ng/mL; Figura 17B).

O aumento na secreção de PRL após a injeção de RFRP-3 foi associado a uma redução de 23% na razão DOPAC/DA na EM, efeito que apresentou forte tendência a ser estatisticamente significativo ($P < 0,1$; Figura 18A). Adicionalmente, o tratamento com RFRP-3 elevou em 31% os níveis de DA comparado aos animais Vei ($P < 0,01$) sem, no entanto, alterar as concentrações de DOPAC na EM (Fig. 18 B e C), efeito este semelhante ao observado após a injeção de Kp-10.

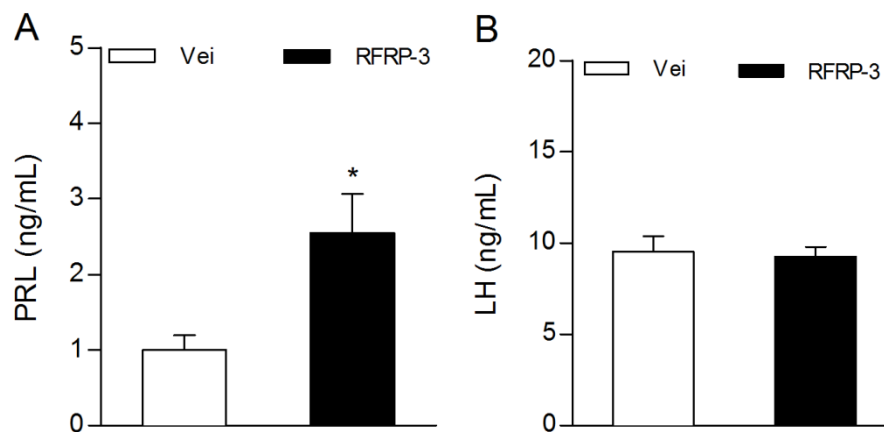


Figura 17: Efeito da ativação de NPFFR com RFRP-3 sobre a secreção de PRL e LH. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam a injeção i.c.v. de 1 nmol de RFRP-3 ou Vei (n = 8 por grupo) e foram decapitadas 5 min após a injeção i.c.v. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Vei. Dados expressos em média \pm E.P.M.

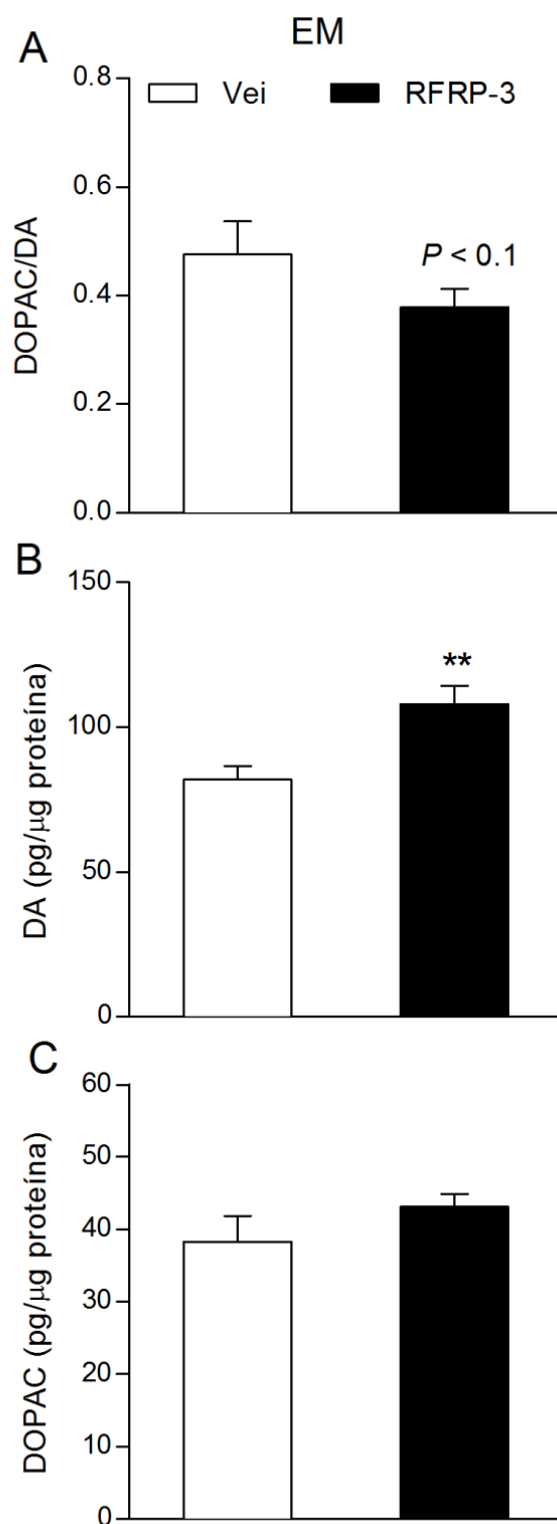


Figura 18: Efeito da estimulação de NPFF1R com RFRP-3 sobre a atividade dos neurônios TIDA na EM. Ratas OVX foram tratadas com estradiol por 3 dias consecutivos (OVX+E). No quarto dia, as ratas receberam a injeção i.c.v de 1 nmol de RFRP-3 ou Vei (n = 8 por grupo) e foram decapitadas 5 min após o tratamento. (A-C) Razão DOPAC/DA e concentrações de DOPAC e DA na EM. ***P* < 0,01 comparado ao grupo Vei. Dados expressos em média ± E.P.M.

DISCUSSÃO

Este trabalho elucidou mecanismos até então desconhecidos pelos quais a kisspeptina modula os neurônios TIDA e a secreção de PRL. Inicialmente, fazendo uso do antagonista para o receptor Kiss1r (Kp-234) demonstramos que a sinalização kisspeptina-Kiss1r é importante para a gênese do pico de PRL induzido por estradiol e imprescindível para a ocorrência do pico de LH. Em seguida mostramos que, enquanto a injeção i.c.v. de Kp-10 estimula a secreção de PRL através da redução da razão DOPAC/DA na EM, o bloqueio de Kiss1r impede o efeito kisspeptinérgico sobre a PRL mas não suas ações nos neurônios TIDA. Estes resultados foram comprovados em camundongos que expressam o receptor Kiss1r apenas nos neurônios GnRH (Kiss1^{-/-}R), nos quais a Kp-10 não foi capaz de induzir o aumento da secreção de PRL. Considerando possíveis ações da kisspeptina de forma Kiss1r-independente, testamos se a Kp-10 ativaria os receptores NPFFR para modular a atividade dos neurônios TIDA. Os resultados mostraram que o bloqueio de NPFFR com RF-9 impediu tanto o efeito estimulatório da Kp-10 sobre a PRL quanto a redução do *turnover* dopaminérgico na EM. Por fim, a ativação de NPFFR com o agonista RFRP-3 mimetizou os efeitos da Kp-10 no aumento da secreção de PRL e em parâmetros dopaminérgicos na EM. Assim, os resultados indicam que a kisspeptina pode regular a secreção de PRL de duas formas: de uma maneira dependente de DA através da ativação de NPFFR e por uma via independente de DA, na qual a kisspeptina se utiliza do receptor Kiss1r.

A importância da interação kisspeptina-Kiss1r em situações fisiológicas tem sido descrita ao longo dos anos. Mutações no receptor Kiss1r acarretam falha na secreção das gonadotrofinas e infertilidade (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003) e essa via tem sido amplamente relacionada ao início da puberdade (Han et al., 2005; Pineda et al., 2010a; Herbison, 2016). Adicionalmente, a kisspeptina é um potente estimulador da secreção de LH (Gottsch et al., 2004) e também capaz de

aumentar a secreção de PRL (Szawka et al., 2010), hormônios essenciais à reprodução. Sabe-se que tanto as secreções de PRL quanto de LH estão sobre estrito controle hormonal pelo estradiol. Em roedores, o estradiol estimula a secreção de PRL e LH e induz picos fisiológicos diários desses hormônios que ocorrem ao longo da tarde (Aquino et al., 2016). No presente trabalho, demonstramos que a interação kisspeptina-Kiss1r é importante para a indução pelo estradiol do pico de PRL e fundamental para o pico de LH. De fato, estudos prévios de nosso grupo corroboram a relação existente entre os níveis plasmáticos de estradiol e o efeitos da kisspeptina na secreção de PRL. Nossos achados anteriores demonstraram que a kisspeptina é incapaz de estimular a secreção de PRL em ratas OVX, e que esse efeito pode ser restaurado pelo tratamento com estradiol (Szawka et al., 2010). Ainda, resultados obtidos durante nosso projeto de mestrado, demonstraram que esta modulação pelo estradiol é exercida através de ER α e potencializada pela progesterona (Aquino et al., 2017).

Os neurônios dopaminérgicos expressam PRLR e a PRL controla sua própria secreção através de um mecanismo de *feedback* negativo nesses neurônios (Moore, 1987; Arbogast & Voogt, 1997; Kokay & Grattan, 2005). Por muito tempo acreditou-se que a resposta dos neurônios dopaminérgicos à PRL envolvesse prioritariamente um componente lento ligado à TH (Moore, 1987; Pasqualini et al., 1994; Ma et al., 2005). Entretanto, estudos recentes de eletrofisiologia demonstram uma rápida ativação dos neurônios dopaminérgicos após a administração de PRL tanto em ratos quanto em camundongos (Romano et al., 2013; Lyons & Broberger, 2014). Os neurônios TIDA, por exemplo, tem sua atividade elétrica aumentada de forma aguda cinco minutos após a exposição à PRL *in vitro* (Brown et al., 2012) e, portanto, sugere-se que análises da atividade dos neurônios TIDA após esse período podem refletir o efeito da hiperprolactinemia sobre a ativação dopaminérgica. De fato, trabalhos não publicados

de nosso grupo demonstraram que após 10 minutos da injeção de Kp-10, são observadas alterações no *turnover* dopaminérgico na EM que parecem refletir o *feedback* dos altos níveis de PRL. Por essa razão é possível que o Western Blotting dos camundongos WT no experimento 4 não tenha indicado alterações na razão $S^{40}pTH/TH$, ainda que esses animais tenham apresentado PRL plasmática elevada. Adicionalmente, demonstramos recentemente em ratas que o efeito inibitório da kisspeptina sobre a expressão de $S^{40}pTH$ na EM depende da presença de progesterona (Aquino et al., 2017) e os níveis de progesterona estavam provavelmente ainda baixos na manhã do proestro quando foi realizado o experimento em camundongos WT e Kiss1^{-/-}R. De toda forma, entre o experimento 2 no qual analisamos apenas a secreção hormonal e o experimento 3, em que avaliamos a atividade dos neurônios dopaminérgicos após o tratamento com Kp-10 ou Kp-234, optamos por reduzir o tempo de análise após as injeções de Kp-10. A mudança de dez para cinco minutos visou captar o efeito primário da Kp-10 sobre os neurônios dopaminérgicos e evitar interferências do *feedback* dos níveis aumentados de PRL estimulados pela Kp-10 sobre os neurônios TIDA.

Os efeitos da kisspeptina sobre os neurônios TIDA e sobre a PRL foram parcialmente mimetizados pelo RFRP-3. Em mamíferos o RFRP-3 é ortólogo ao GnIH das aves (Ubuka et al., 2009). Portanto, após a ovariectomia em ratas, o RFRP-3, ao se ligar aos NPFRR, reduz a secreção de LH (Pineda et al., 2010c). Fibras RFRP-3 se projetam tanto para os neurônios GnRH quanto kisspeptinérgicos, enfatizando sua habilidade de modulá-los (Rizwan et al., 2012). Com efeito, estudos prévios demonstraram que o bloqueio do receptor para RFRP-3 com RF-9 eleva potentemente os níveis de LH e FSH em ratos machos e fêmeas devido a uma ação direta nos neurônios GnRH (Pineda et al., 2010b; Rizwan et al., 2012). O RF-9 é assim, descrito como antagonista seletivo dos NPFRR. No primeiro artigo que o caracteriza para esse

fim, Simonin e coautores (2006) comprovaram que o RF-9 apresenta afinidade para ambos os NPPFR e antagoniza tanto o NPPF1R quanto o NPPF2R (Simonin et al., 2006). O mesmo trabalho relata que ações características dos neuropeptídios FF são bloqueadas pelo RF-9, tais como o aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e a hiperalgesia. Entretanto com o advento de mais estudos envolvendo o RF-9 sua ação se mostrou controversa. Contrariando o estudo de Simonin, Kim e coautores (2015) demonstraram que o RF-9 antagoniza apenas o NPPF2, possuindo na verdade uma atividade agonista nos NPPF1R. No nosso trabalho entretanto, o aumento da PRL decorrente da estimulação de NPPF1 com RFRP-3 não foi reproduzido pelo tratamento com RF-9, sugerindo que ao contrário do demonstrado por Kim e coautores, e assim como demonstrado por Simonin, o RF-9 não deve estar estimulando o NPPF1R.

Embora a caracterização farmacológica inicial do RF-9 tenha demonstrado que ele atua como antagonista seletivo de NPPFR, sem possuir afinidade pelo Kiss1r (Simonin et al., 2006), estudos recentes tem apontado também a sua ligação ao receptor para kisspeptina. É digno de nota que o tratamento com RF-9 aumenta a concentração de Ca^{2+} e IP_3 intracelular e a fosforilação de ERK de forma similar à Kp-10 (Min et al., 2015). Ainda, a ação estimulatória do RF-9 sobre a secreção de GnRH/LH se mantém em camundongos que não expressam o NPPF1R mas é reduzida em animais knockouts para o Kiss1r, podendo ser restaurada pela reinserção desse receptor nos neurônios GnRH (Liu & Herbison, 2014; Min et al., 2015). Adicionalmente, os efeitos do RF-9 sobre o LH podem ser inibidos pela Kp-234 ou pelo bloqueio da sinalização por proteínas Gαq/11 nos neurônios GnRH (Babwah et al., 2015; Sahin et al., 2015). Portanto, é possível que no nosso trabalho o aumento do LH em animais tratados com RF-9 tenha decorrido tanto da supressão de RFRP-3 quanto da ativação de Kiss1r nos neurônios GnRH. No entanto, apesar da interação RF-9/Kiss1r é pouco provável que os

efeitos do RF-9 sobre os neurônios TIDA observados em nossos resultados sejam devido a uma ativação de Kiss1r. Isso porque estudos de nosso grupo de pesquisa demonstraram a ausência de expressão de Kiss1r nos neurônios TIDA (Kokay et al., 2016). Esse achado foi corroborado por trabalhos de outros grupos que demonstraram que embora a kisspeptina se ligue ao corpo celular dos neurônios TIDA, apenas cerca de 15 % desses neurônios expressam Kiss1r, sugerindo um receptor adicional (Iijima et al., 2015; Higo et al., 2017). Portanto, é presumível que os efeitos do RF-9 sobre as ações da Kp-10 no *turnover* dopaminérgico na EM sejam exercidos, sobretudo pelo bloqueio dos receptores NPFF1R em detrimento à ativação de Kiss1r. Assim, nossos resultados mostrando que o bloqueio de NPFF1R com RF-9 inibe ação da Kp-10 sobre os neurônios TIDA sugerem que, ao contrário do que se pensava, o controle kisspeptinérgico desses neurônios pode ser exercido através dos receptores NPFFR.

A expressão do NPFFR é difusa ao longo do hipotálamo e a população de neurônios dopaminérgicos da região periventricular expressa NPFF1R, embora a expressão desses receptores nos neurônios dopaminérgicos do ARC seja, de fato, muito baixa ou ausente (Hinuma et al., 2000; Kokay et al., 2016). Dessa forma, a subpopulação de neurônios dopaminérgicos da região periventricular que se projeta para a EM (Kawano & Daikoku, 1987) parece participar da ação da kisspeptina exercida através de NPFF1R sobre a atividade dopaminérgica na EM. Ademais, a sinalização kisspeptina-NPFF1R nos neurônios dopaminérgicos ajuda a entender um efeito até então considerado paradoxal da kisspeptina, qual seja sua ligação a um receptor do tipo Gq (Kiss1r) para exercer tanto ações excitatórias sobre os neurônios GnRH quanto ações inibitórias sobre os neurônios dopaminérgicos. Pelo contrário, os achados aqui apresentados sugerem que os efeitos inibitórios da kisspeptina não são exercidos através de Kiss1r, e sim pela sua ligação ao NPFF1R, um GPCR do tipo Gi/o.

Nossos resultados mostraram um efeito estimulatório do RFRP-3 sobre a PRL, 5 minutos após sua injeção i.c.v. Diferentemente dos nossos resultados, outro trabalho não encontrou efeitos do tratamento crônico com RFRP-3 sobre a secreção de PRL estimulada pelo estradiol ou efeitos da injeção i.c.v. de RFRP-3 sobre a PRL em ratas estroginizadas (Anderson et al., 2009). Entretanto nesse trabalho o efeito estimulatório do RFRP-3 pode ter sido mascarado pelos níveis já altos do pico de PRL ou pelo período da coleta (2,5 horas depois da injeção de RFRP-3). Contrariando esses achados, a literatura corrobora nossos resultados e apresenta fortes evidências das ações dos RFRP-1 sobre a secreção de PRL. A injeção i.c.v. de 3 nmol de RFRP-1 aumenta significativamente a secreção de PRL. Entretanto o RFRP-1 não apresenta efeitos estimulatórios quando a síntese de DA é inibida ou quando os receptores D2 são bloqueados, mostrando que a ação desse peptídeo sobre a secreção de PRL é exercida através da modulação da atividade dos neurônios dopaminérgicos. (Samson et al., 2003). Esse resultado fortifica nossa hipótese de que a ativação dos NPFFR1 pela kisspeptina pode alterar a atividade dos neurônios dopaminérgicos para controlar a secreção de PRL. Adicionalmente tanto a ligação do RFRP-1 quanto do RFRP-3 ao NPFF1R suprime a síntese de AMPc, efeito que é pertinente quanto à inibição da secreção de DA e pode conseqüentemente elevar a secreção de PRL (May et al., 1995; Hinuma et al., 2000). Ademais, a relação entre os RFRP e a PRL é evidenciada pelo aumento da expressão de RFRP no hipotálamo em resposta a sucção dos mamilos, um dos mais fortes estímulos conhecidos para a secreção de PRL (Noroozi et al., 2015).

Embora possa existir a hipótese de que em nosso estudo o RFRP-3 exerça um efeito estimulatório direto na hipófise, ações hipofisiotróficas dos RFRP são improváveis fisiologicamente. A expressão de NPFF1R é abundante no hipotálamo mas praticamente inexistente na hipófise (Hinuma et al., 2000). Adicionalmente embora

algumas ações estimulatórias dos RFRP já tenham sido demonstradas em culturas de células hipofisárias (Clarke et al., 2008; Sari et al., 2009), a maioria dos estudos demonstra que em roedores fibras RFRP-3 não se projetam para a zona externa da EM (Ukena & Tsutsui, 2001; Kriegsfeld et al., 2006; Johnson et al., 2007; Rizwan et al., 2009), onde fatores hipofisiotróficos são liberados, levando a conclusão de que neste caso os efeitos dos RFRP são restritos ao hipotálamo.

Considerando que o bloqueio de Kiss1r não impediu a ação da kisspeptina sobre os neurônios TIDA mas bloqueou seus efeitos na secreção de PRL, conclui-se que para regular a PRL através de Kiss1r, a kisspeptina se ligue a esse receptor expresso em outros neurônios que não os TIDA e promova a liberação de outros hormônios que não a DA. A busca por fatores liberadores de PRL (PRF) que complementem a ação inibitória dopaminérgica é um assunto largamente discutido ao longo dos anos. É válido ressaltar que o aumento da PRL em resposta à sucção do mamilo não decorre exclusivamente de uma redução do tônus dopaminérgico (de Greef et al., 1981) e o tratamento com DA não bloqueia o aumento de PRL induzido pelo estresse (Shin, 1979). Adicionalmente, o completo antagonismo dos receptores D2 não é suficiente para inibir os padrões de liberação de PRL ao longo do dia (Arey et al., 1989), levando a conclusão que, de fato, outros fatores independentes da DA regulem a PRL plasmática. Neste sentido, diversas substâncias têm sido apontadas como possíveis PRFs. Alguns estudos indicam o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) como um PRF, entretanto, apesar de um potente estimulador da secreção de PRL, em determinados períodos da lactação o TRH não responde ao estímulo de sucção dos mamilos (Rondeel et al., 1988) além disso o TRH possui padrão de liberação independente da secreção de PRL em ovelhas lactantes (Thomas et al., 1988).

Por outro lado, é muito provável que a ocitocina seja um importante PRF que, em conjunto com a DA, controle a secreção de PRL (Kennett & McKee, 2012). Isso porque há um aumento na secreção de PRL quando a hipófise é tratada com ocitocina e a secreção de PRL é reduzida quando o receptor para ocitocina é bloqueado (Johnston & Negro-Vilar, 1988; Kennett et al., 2009). Adicionalmente, a PRL parece exercer um mecanismo de *feedback* sobre os neurônios ocitocinérgicos, já que estes neurônios expressam receptores para PRL e tem sua atividade reduzida pela PRL (Kokay et al., 2006; Sapsford et al., 2012). Os neurônios ocitocinérgicos também expressam Kiss1r e são ativados pela injeção i.c.v. de Kp-10 (Scott & Brown, 2013; Higo et al., 2016). Adicionalmente, novas projeções kisspeptinérgicas excitatórias emergem para os neurônios ocitocinérgicos no final da gestação, o que parece importante para o aumento da secreção de ocitocina necessária para o parto e lactação (Seymour et al., 2017). Portanto, é aceitável sugerir que nossos achados mostrando a ativação do Kiss1r pela Kp-10 para regular a PRL de forma independente dos neurônios TIDA, indicam uma ação indireta da kisspeptina sobre neurônios intermediários, entre os quais os neurônios ocitocinérgicos emergem como possíveis candidatos, embora mais estudos sejam necessários para comprovar essa hipótese.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstraram que a ligação da kisspeptina ao receptor Kiss1r é importante para a gênese do pico de PRL induzido por estradiol e fundamental para o pico de LH. Adicionalmente a inibição de Kiss1r impede o efeito estimulatório da Kp-10 sobre as secreções de LH e PRL, mas não seus efeitos sobre os neurônios TIDA. Ainda, a Kp-10 é inefetiva em estimular a secreção de PRL quando o receptor Kiss1r é expresso apenas em neurônios GnRH. Por outro lado, embora o bloqueio de NPPFR não iniba o efeito da Kp-10 sobre o LH, ele impede as ações kisspeptinérgicas sobre a secreção de PRL e sobre os neurônios TIDA. Por fim, a ativação de NPPF1R simula o efeito estimulatório da Kp-10 sobre a secreção de PRL e suas ações nos neurônios TIDA. Assim, a figura 19 descreve o mecanismo proposto por esse trabalho para a ação estimulatória da kisspeptina sobre a secreção de PRL. De acordo com os resultados aqui apresentados, ao se ligar aos receptores NPPF1R nos neurônios dopaminérgicos a kisspeptina reduz a atividade dopaminérgica na EM elevando a secreção de PRL. Paralelamente, através do receptor Kiss1r, a kisspeptina estimula a secreção de PRL de forma indireta e independente da DA, possivelmente através da liberação de um PRF por neurônios intermediários. Mais estudos se fazem necessários a fim de descrever os neurônios participantes dessa via indireta e os possíveis PRFs envolvidos.

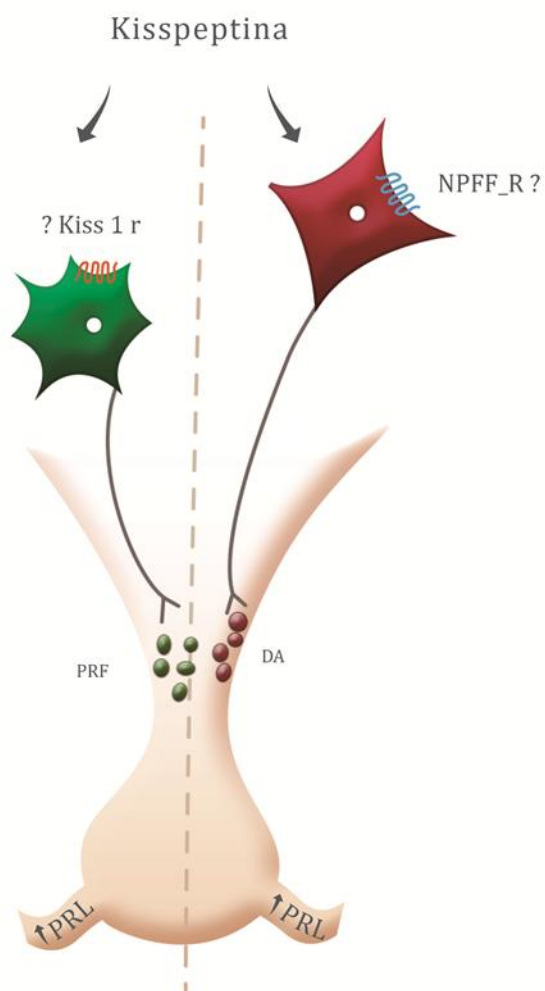


Figura 19: Diagrama esquemático mostrando o mecanismo proposto para a ação estimulatória da kisspeptina sobre a secreção de PRL. Ao ativar os NPFFR, a kisspeptina reduz a atividade dos neurônios dopaminérgicos na EM aumentando a secreção de PRL. Por outro lado, através de uma via independente de DA, a kisspeptina se liga ao receptor Kiss1r em neurônios intermediários aumentando a secreção de PRL, possivelmente pela liberação de um PRF.

REFERÊNCIAS

1. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 2007; 53: 367-378.
2. Anderson GM, Relf HL, Rizwan MZ, Evans JJ. Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* 2009; 150: 1834-1840.
3. Aquino NS, Araujo-Lopes R, Batista IA, Henriques PC, Poletini MO, Franci CR, Reis AM, Szawka RE. Hypothalamic Effects of Tamoxifen on Oestrogen Regulation of Luteinising Hormone and Prolactin Secretion in Female Rats. *J Neuroendocrinol* 2016; 28.
4. Aquino NS, Araujo-Lopes R, Henriques PC, Lopes FE, 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.
5. Arbogast LA, Ben-Jonathan N. The preovulatory prolactin surge: an evaluation of the role of dopamine. *Endocrinology* 1988; 123: 2690-2695.
6. Arbogast LA, Voogt JL. Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* 1997; 138: 3016-3023.
7. Arey BJ, Averill RL, Freeman ME. A sex-specific endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 1989; 124: 119-123.
8. Babwah AV, Navarro VM, Ahow M, Pampillo M, Nash C, Fayazi M, Calder M, Elbert A, Urbanski HF, Wettschureck N, Offermanns S, Carroll RS, Bhattacharya M, Tobet SA, Kaiser UB. GnRH Neuron-Specific Ablation of Galphaq/11 Results in Only Partial Inactivation of the Neuroendocrine-Reproductive Axis in Both Male and Female Mice: In Vivo Evidence for Kiss1r-Coupled Galphaq/11-Independent GnRH Secretion. *J Neurosci* 2015; 35: 12903-12916.
9. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22: 724-763.
10. Bjorklund A, Moore RY, Nobin A, Stenevi U. The organization of tuberohypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron systems in the rat brain. *Brain Res* 1973; 51: 171-191.
11. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-268.
12. Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, Smith KE, Tamm JA, Boteju LW, Lakhani PP, Raddatz R, Yao WJ, Ogozalek KL, Boyle N, Kouranova EV, Quan Y, Vaysse PJ, Wetzel JM, Branchek TA, Gerald C, Borowsky B. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* 2000; 275: 39324-39331.
13. Brooks CL. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev* 2012; 33: 504-525.

14. Brown RS, Piet R, Herbison AE, Grattan DR. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2012; 153: 2375-2384.
15. Bruzzone F, Lectez B, Alexandre D, Jegou S, Mounien L, Tollemer H, Chatenet D, Leprince J, Vallarino M, Vaudry H, Chartrel N. Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 2007; 503: 573-591.
16. Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 1974; 60: 205-215.
17. Carr LA, Voogt JL. Catecholamine synthesizing enzymes in the hypothalamus during the estrous cycle. *Brain Res* 1980; 196: 437-445.
18. Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2008; 149: 5811-5821.
19. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147: 5817-5825.
20. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2008; 28: 8691-8697.
21. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 673-682.
22. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 2008; 149: 3926-3932.
23. de Greef WJ, Plotsky PM, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 1981; 32: 229-233.
24. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10972-10976.
25. Demarest KT, Johnston CA, Moore KE. Biochemical indices of catecholaminergic neuronal activity in the median eminence during the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* 1981; 32: 24-27.
26. DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME. Characterization of the dopaminergic input to the pituitary gland throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 377-383.
27. Dubois SL, Acosta-Martinez M, DeJoseph MR, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Urban JH, Levine JE. Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor alpha in kisspeptin neurons. *Endocrinology* 2015; 156: 1111-1120.
28. Ducret E, Anderson GM, Herbison AE. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 2009; 150: 2799-2804.

29. Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci* 2007; 27: 12088-12095.
30. Elhabazi K, Humbert JP, Bertin I, Schmitt M, Bihel F, Bourguignon JJ, Bucher B, Becker JA, Sorg T, Meziane H, Petit-Demouliere B, Ilien B, Simonin F. Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* 2013; 75: 164-171.
31. Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres PG, Evans NA, Schmidt DB, Buckley PT, Dytko GM, Murdock PR, Milligan G, Groarke DA, Tan KB, Shabon U, Nuthulaganti P, Wang DY, Wilson S, Bergsma DJ, Sarau HM. Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 25965-25971.
32. Engstrom M, Brandt A, Wurster S, Savola JM, Panula P. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 825-832.
33. Everett JW. Luteotrophic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology* 1954; 54: 685-690.
34. Frazao R, Cravo RM, Donato J, Jr., Ratra DV, Clegg DJ, Elmquist JK, Zigman JM, Williams KW, Elias CF. Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor alpha. *J Neurosci* 2013; 33: 2807-2820.
35. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80: 1523-1631.
36. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *BiochemBiophysResCommun* 2003; 312: 1357-1363.
37. George JT, Hendrikse M, Veldhuis JD, Clarke IJ, Anderson RA, Millar RP. Effect of gonadotropin-inhibitory hormone on luteinizing hormone secretion in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2017; 86: 731-738.
38. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides* 2009; 30: 4-9.
39. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 4073-4077.
40. Gouarderes C, Puget A, Zajac JM. Detailed distribution of neuropeptide FF receptors (NPFF1 and NPFF2) in the rat, mouse, octodon, rabbit, guinea pig, and marmoset monkey brains: a comparative autoradiographic study. *Synapse* 2004; 51: 249-269.
41. Gouarderes C, Mazarguil H, Mollereau C, Chartrel N, Leprince J, Vaudry H, Zajac JM. Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor coupling: high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [³⁵S]GTPγS binding. *Neuropharmacology* 2007; 52: 376-386.
42. Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 147-154.
43. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 752-763.

44. Grattan DR, Le Tissier P. Hypothalamic control of prolactin secretion, and multiple reproductive functions of prolactin. In: Plant TM, Zeleznik AJ, eds. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th ed: Elsevier 2015: 469-506.
45. 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. *JNeurosci* 2005; 25: 11349-11356.
46. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 1998; 19: 302-330.
47. 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: 277-287.
48. Herbison AE. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Plant TM, Zeleznik AJ, eds. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th ed: Elsevier 2015: 469-506.
49. Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12: 452-466.
50. Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 312-321.
51. Higo S, Iijima N, Ozawa H. Characterisation of Kiss1r (Gpr54)-Expressing Neurones in the Arcuate Nucleus of the Female Rat Hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2017; 29.
52. Higo S, Honda S, Iijima N, Ozawa H. Mapping of Kisspeptin Receptor mRNA in the Whole Rat Brain and its Co-Localisation with Oxytocin in the Paraventricular Nucleus. *J Neuroendocrinol* 2016; 28.
53. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 703-708.
54. Holzbauer M, Racke K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 1985; 63: 97-116.
55. Iijima N, Takumi K, Matsumoto K, Ozawa H. Visualization of Kisspeptin Binding to Rat Hypothalamic Neurons. *Acta Histochem Cytochem* 2015; 48: 179-184.
56. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 264-272.
57. Jhamandas JH, Goncharuk V. Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 8.
58. Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 2007; 51: 171-180.
59. Johnston CA, Negro-Vilar A. Role of oxytocin on prolactin secretion during proestrus and in different physiological or pharmacological paradigms. *Endocrinology* 1988; 122: 341-350.

60. Kawano H, Daikoku S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1987; 265: 242-253.
61. 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: 103-113.
62. Kennett JE, McKee DT. Oxytocin: an emerging regulator of prolactin secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 403-412.
63. Kennett JE, Poletini MO, Fitch CA, Freeman ME. Antagonism of oxytocin prevents suckling- and estradiol-induced, but not progesterone-induced, secretion of prolactin. *Endocrinology* 2009; 150: 2292-2299.
64. Kirilov M, Clarkson J, Liu X, Roa J, Campos P, Porteous R, Schutz G, Herbison AE. Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nat Commun* 2013; 4: 2492.
65. 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: 827-835.
66. Kokay IC, Szawka RE, Grattan DR. Kisspeptin stimulation of prolactin secretion is not mediated by a direct action on tuberoinfundibular neurons: Prolactin, GH and IGF Biology and Signaling (posters). *Proc Endocrine Society's 98th Annual Meeting and Expo*. Boston, MA 2016.
67. Kokay IC, Bull PM, Davis RL, Ludwig M, Grattan DR. Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons is associated with specific prolactin regulation of oxytocin neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R1216-1225.
68. Kotani M, Mollereau C, Dethoux M, Le Poul E, Brezillon S, Vakili J, Mazarguil H, Vassart G, Zajac JM, Parmentier M. Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br J Pharmacol* 2001a; 133: 138-144.
69. Kotani M, Dethoux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le PE, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001b; 276: 34631-34636.
70. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2410-2415.
71. Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996; 67: 443-462.
72. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 2009; 89: 535-606.
73. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999; 446: 103-107.
74. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-1737.

75. Liu Q, Guan XM, Martin WJ, McDonald TP, Clements MK, Jiang Q, Zeng Z, Jacobson M, Williams DL, Jr., Yu H, Bomford D, Figueroa D, Mallee J, Wang R, Evans J, Gould R, Austin CP. Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem* 2001; 276: 36961-36969.
76. Liu X, Herbison AE. RF9 excitation of GnRH neurons is dependent upon Kiss1r in the adult male and female mouse. *Endocrinology* 2014; 155: 4915-4924.
77. Liu X, Herbison A. Kisspeptin regulation of arcuate neuron excitability in kisspeptin receptor knockout mice. *Endocrinology* 2015; 156: 1815-1827.
78. Liu X, Porteous R, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Millar R, Petersen SL, Herbison AE. Frequency-dependent recruitment of fast amino acid and slow neuropeptide neurotransmitter release controls gonadotropin-releasing hormone neuron excitability. *J Neurosci* 2011; 31: 2421-2430.
79. Lookingland KJ, Jarry HD, Moore KE. The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. *Brain Res* 1987; 419: 303-310.
80. Lyons DJ, Broberger C. TIDAL WAVES: Network mechanisms in the neuroendocrine control of prolactin release. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35: 420-438.
81. Lyubimov Y, Engstrom M, Wurster S, Savola JM, Korpi ER, Panula P. Human kisspeptins activate neuropeptide FF2 receptor. *Neuroscience* 2010; 170: 117-122.
82. Ma FY, Grattan DR, Goffin V, Bunn SJ. Prolactin-regulated tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid expression in mediobasal hypothalamic cultures: the differential role of specific protein kinases. *Endocrinology* 2005; 146: 93-102.
83. Ma L, MacTavish D, Simonin F, Bourguignon JJ, Watanabe T, Jhamandas JH. Prolactin-releasing peptide effects in the rat brain are mediated through the Neuropeptide FF receptor. *Eur J Neurosci* 2009; 30: 1585-1593.
84. 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: 2587-2600.
85. May V, Brandenburg CA, Braas KM. Differential regulation of sympathetic neuron neuropeptide Y and catecholamine content and secretion. *J Neurosci* 1995; 15: 4580-4591.
86. Min L, Leon S, Li H, Pinilla L, Carroll RS, Tena-Sempere M, Kaiser UB. RF9 Acts as a KISS1R Agonist In Vivo and In Vitro. *Endocrinology* 2015; 156: 4639-4648.
87. 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: 2800-2812.
88. Mollereau C, Mazarguil H, Marcus D, Quelven I, Kotani M, Lannoy V, Dumont Y, Quirion R, Detheux M, Parmentier M, Zajac JM. Pharmacological characterization of human NPPF(1) and NPPF(2) receptors expressed in CHO cells by using NPY Y(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2002; 451: 245-256.
89. Moore KE. Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol Reprod* 1987; 36: 47-58.

90. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Stepkowski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *JBiolChem* 2001; 276: 28969-28975.
91. Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 2008; 199: 105-112.
92. Nagy GM, DeMaria JE, Freeman ME. Changes in the local metabolism of dopamine in the anterior and neural lobes but not in the intermediate lobe of the pituitary gland during nursing. *Brain Res* 1998; 790: 315-317.
93. Neill JD, Freeman ME, Tillson SA. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* 1971; 89: 1448-1453.
94. Nikitovitch-Winer M, Everett JW. Functional restitution of pituitary grafts retransplanted from kidney to median eminence. *Endocrinology* 1958; 63: 916-930.
95. Noroozi A, Jafarzadeh Shirazi MR, Tamadon A, Moghadam A, Niazi A. Increased Litter Size and Suckling Intensity Stimulate mRNA of RFamide-related Peptide in Rats. *Int J Fertil Steril* 2015; 9: 380-386.
96. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613-617.
97. Oishi S, Misu R, Tomita K, Setsuda S, Masuda R, Ohno H, Naniwa Y, Ieda N, Inoue N, Ohkura S, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda K, Hirasawa A, Tsujimoto G, Fujii N. Activation of Neuropeptide FF Receptors by Kisspeptin Receptor Ligands. *ACS Med Chem Lett* 2011; 2: 53-57.
98. Palkovits M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 1973; 59: 449-450.
99. Parker RM, Copeland NG, Eyre HJ, Liu M, Gilbert DJ, Crawford J, Couzens M, Sutherland GR, Jenkins NA, Herzog H. Molecular cloning and characterisation of GPR74 a novel G-protein coupled receptor closest related to the Y-receptor family. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 77: 199-208.
100. Pasqualini C, Guibert B, Frain O, Leviel V. Evidence for protein kinase C involvement in the short-term activation by prolactin of tyrosine hydroxylase in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *J Neurochem* 1994; 62: 967-977.
101. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* New York, NY: Academic Press, 1998.
102. Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* New York, NY: Academic Press, 2004.
103. Peters LL, Hofer MT, Ben-Jonathan N. The posterior pituitary: regulation of anterior pituitary prolactin secretion. *Science* 1981; 213: 659-661.
104. Piet R, Boehm U, Herbison AE. Estrous cycle plasticity in the hyperpolarization-activated current ih is mediated by circulating 17beta-estradiol in preoptic area kisspeptin neurons. *J Neurosci* 2013; 33: 10828-10839.
105. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M. Critical roles of

- kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 2010a; 151: 722-730.
106. Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Romero M, Ruiz-Pino F, Aguilar E, Dijcks FA, Blomenrohr M, Pinilla L, van Noort PI, Tena-Sempere M. Characterization of the potent gonadotropin-releasing activity of RF9, a selective antagonist of RF-amide-related peptides and neuropeptide FF receptors: physiological and pharmacological implications. *Endocrinology* 2010b; 151: 1902-1913.
 107. Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Romero M, Ruiz-Pino F, Aguilar E, Dijcks FA, Blomenrohr M, Pinilla L, van Noort PI, Tena-Sempere M. Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010c; 299: E39-46.
 108. Poletini MO, Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Ovarian steroids but not the locus coeruleus regulate stress-induced prolactin secretion in female rats. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 938-948.
 109. Poling MC, Quennell JH, Anderson GM, Kauffman AS. Kisspeptin neurones do not directly signal to RFRP-3 neurones but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. *J Neuroendocrinol* 2013; 25: 876-886.
 110. Poling MC, Shieh MP, Munaganuru N, Luo E, Kauffman AS. Examination of the influence of leptin and acute metabolic challenge on RFRP-3 neurons of mice in development and adulthood. *Neuroendocrinology* 2014; 100: 317-333.
 111. Quillet R, Ayachi S, Bihel F, Elhabazi K, Ilien B, Simonin F. RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol Ther* 2016; 160: 84-132.
 112. Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 2008; 149: 4387-4395.
 113. Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE. Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 2015; 27: 88-99.
 114. Rizwan MZ, Porteous R, Herbison AE, Anderson GM. Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 2009; 150: 1413-1420.
 115. Rizwan MZ, Poling MC, Corr M, Cornes PA, Augustine RA, Quennell JH, Kauffman AS, Anderson GM. RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* 2012; 153: 3770-3779.
 116. 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: 4424-4433.

117. 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: 93-96.
118. 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: 3920-3929.
119. Russo KA, La JL, Stephens SB, Poling MC, Padgaonkar NA, Jennings KJ, Piekarski DJ, Kauffman AS, Kriegsfeld LJ. Circadian Control of the Female Reproductive Axis Through Gated Responsiveness of the RFRP-3 System to VIP Signaling. *Endocrinology* 2015; 156: 2608-2618.
120. Sahin Z, Canpolat S, Ozcan M, Ozgocer T, Kelestimur H. Kisspeptin antagonist prevents RF9-induced reproductive changes in female rats. *Reproduction* 2015; 149: 465-473.
121. 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: 115-126.
122. Samson WK, Keown C, Samson CK, Samson HW, Lane B, Baker JR, Taylor MM. Prolactin-releasing peptide and its homolog RFRP-1 act in hypothalamus but not in anterior pituitary gland to stimulate stress hormone secretion. *Endocrine* 2003; 20: 59-66.
123. 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: 1062-1077.
124. Sari IP, Rao A, Smith JT, Tilbrook AJ, Clarke IJ. Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 2009; 150: 5549-5556.
125. Sawai N, Iijima N, Ozawa H, Matsuzaki T. Neurokinin B- and kisspeptin-positive fibers as well as tuberoinfundibular dopaminergic neurons directly innervate periventricular hypophyseal dopaminergic neurons in rats and mice. *Neurosci Res* 2014; 84: 10-18.
126. Sawai N, Iijima N, Takumi K, Matsumoto K, Ozawa H. Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. *Neurosci Res* 2012; 74: 10-16.
127. Scott V, Brown CH. Beyond the GnRH axis: kisspeptin regulation of the oxytocin system in pregnancy and lactation. *Adv Exp Med Biol* 2013; 784: 201-218.
128. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614-1627.
129. Seymour AJ, Scott V, Augustine RA, Bouwer GT, Campbell RE, Brown CH. Development of an excitatory kisspeptin projection to the oxytocin system in late pregnancy. *J Physiol* 2017; 595: 825-838.
130. Shin SH. Prolactin secretion in acute stress is controlled by prolactin releasing factor. *Life Sci* 1979; 25: 1829-1835.

131. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252: 802-808.
132. Simonin F, Schmitt M, Laulin JP, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, Matifas A, Mollereau C, Laurent P, Parmentier M, Kieffer BL, Bourguignon JJ, Simonnet G. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 466-471.
133. Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE. Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 1999; 140: 5195-5201.
134. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005a; 146: 3686-3692.
135. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006; 26: 6687-6694.
136. 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: 1001-1012.
137. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005b; 146: 2976-2984.
138. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96: 219-226.
139. Stafford LJ, Xia C, Ma W, Cai Y, Liu M. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res* 2002; 62: 5399-5404.
140. Steyn FJ, Anderson GM, Grattan DR. Differential effects of centrally-administered oestrogen antagonist ICI-182,780 on oestrogen-sensitive functions in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 26-33.
141. 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: 4939-4945.
142. Szawka RE, Anselmo-Franci JA. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. *Life Sci* 2004; 75: 911-922.
143. Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 629-639.
144. Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 3247-3257.
145. Thomas GB, Cummins JT, Yao B, Gordon K, Clarke IJ. Release of prolactin is independent of the secretion of thyrotrophin-releasing hormone into hypophysial portal blood of sheep. *J Endocrinol* 1988; 117: 115-122.
146. Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1

- and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* 2009; 4: e8400.
147. Ukena K, Tsutsui K. Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system. *Neurosci Lett* 2001; 300: 153-156.
 148. Valença MM, Martins C, Antunes-Rodrigues J. Anatomia e Embriologia do Hipotálamo e da Hipófise. In: Antunes-Rodrigues J, ed. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2005.
 149. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 2006; 52: 271-280.
 150. Xiang W, Zhang B, Lv F, Ma Y, Chen H, Chen L, Yang F, Wang P, Chu M. The Inhibitory Effects of RFamide-Related Peptide 3 on Luteinizing Hormone Release Involves an Estradiol-Dependent Manner in Prepubertal but Not in Adult Female Mice. *Biol Reprod* 2015; 93: 30.
 151. Yen SH, Pan JT. Progesterone advances the diurnal rhythm of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the prolactin surge in ovariectomized, estrogen-primed rats and in intact proestrous rats. *Endocrinology* 1998; 139: 1602-1609.
 152. 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: 2582-2594.
 153. Yoshida H, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S. Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1593: 151-157.
 154. Yun S, Kim DK, Furlong M, Hwang JI, Vaudry H, Seong JY. Does Kisspeptin Belong to the Proposed RF-Amide Peptide Family? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 134.

ARTIGO CIENTÍFICO