

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto De Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Ana Clara Campideli Santana

**PAPEL DOS NEURÔNIOS KNDY NA REGULAÇÃO ESTROGÊNICA DA
SECREÇÃO DE HORMÔNIO LUTEINIZANTE E PROLACTINA EM RATAS**

Belo Horizonte

2020

Ana Clara Campideli Santana

**PAPEL DOS NEURÔNIOS KNDY NA REGULAÇÃO ESTROGÊNICA DA
SECREÇÃO DE HORMÔNIO LUTEINIZANTE E PROLACTINA EM RATAS**

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

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Belo Horizonte

2020

- 043 Santana, Ana Clara Campideli.
Papel dos neurônios KNDY na regulação estrogênica da secreção de hormônio luteinizante e prolactina em ratas [manuscrito] / Ana Clara Campideli Santana. – 2020.
69 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.
1. Fisiologia. 2. Kisspeptinas. 3. Neurocinina B. 4. Dinorfinas. 5. Hormônio Luteinizante. 6. Prolactina. 7. Dopamina. I. Szawka, Raphael Escorsim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 531 DE ANA CLARA CAMPIDELI SANTANA

Às 14:00 horas do dia 17 do mês de setembro de 2020, transmitida através da plataforma Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Ana Clara Campideli Santana**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis**, Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Renata Frazão**, ICB/ Universidade de São Paulo, e **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Papel dos Neurônios Kndy na Regulação Estrogênica da Secreção de Hormônio Luteinizante e Prolactina em Ratas**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 17 de setembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Frazão, Usuário Externo**, em 17/09/2020, às 18:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 17/09/2020, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Escorsim Szawka, Professor do Magistério Superior**, em 18/09/2020, às 13:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0260370** e o código CRC **EFB2C8D9**.

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos, por apoiarem minhas escolhas.

Ao professor Raphael Szawka, pela orientação, dedicação e atenção de professor coruja.

À professora Adriana Saraiva por ter me oferecido a primeira oportunidade de conhecer o mundo acadêmico.

À Roberta, por ter me acolhido em seu projeto durante a minha iniciação científica e colaborado em meu projeto de mestrado.

À Daniela, pelas colaborações e incentivo para bater placas de elisa o dia todo.

À Patrícia e Kaoma, pela ajuda com as imunos.

Ao Juneo, pela colaboração em artigo e pelo grand gateau que marcou o food da quarta.

À professora Fernanda Radicchi e seus alunos, pela colaboração com o artigo.

À Simone, por cuidar de mim e me chamar atenção quanto a biossegurança enquanto estive no nosso laboratório.

A todos do laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, pelos ensinamentos, colaborações e momentos felizes.

Aos membros da banca examinadora, professor Fernando Marcos Reis, professora Renata Frazão, professora Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida e professora Maristela de Oliveira Poletini, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Aos meus animais pelo sacrifício e pelo estímulo mútuo de ocitocina e dopamina.

Às agências FAPEMIG, CNPq, CAPES e Pró-reitoria de pesquisa da UFMG, pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A hiperprolactinemia, uma disfunção do eixo hipotálamo-hipófise altamente prevalente, está frequentemente associada a distúrbios reprodutivos em mulheres. Um importante estimulador do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é a kisspeptina, um peptídeo chave para a fertilidade. Neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico (ARC) que coexpressam kisspeptina (Kp), neurocinina B e dinorfina A (KNDy) desempenham um papel importante, mas ainda não completamente elucidado, no controle das secreções de hormônio luteinizante (LH) e prolactina (PRL). Este trabalho teve por objetivo determinar os efeitos da ablação dos neurônios KNDy sobre a regulação estrogênica da secreção das secreções de LH e PRL em ratas. Para tal, foi utilizado saporina conjugada a agonista do receptor 3 da neurocinina (NK3-SAP) para lesionar seletivamente neurônios KNDy. Ratas com ciclo estral regular receberam injeções estereotáxicas intra-ARC de NK3-SAP (NK3-SAP; n = 5) ou veículo (Veh; n = 6). A ciclicidade estral foi monitorada por 21 dias antes e após as injeções e em seguida foi feita a ovariectomia. Os ovários foram coletados e processados para análise histológica. As ratas foram tratadas com cipionato de estradiol (E2; modelo OVX+E2). O tratamento com E2 foi realizado durante três dias e no quarto dia as amostras de sangue foram coletadas pela cauda a cada 30 min, das 13:00 h às 19:00 h, para análise de LH e PRL no sangue total. Após 6 dias, as ratas receberam tratamento com óleo por três dias e no quarto dia as amostras de sangue foram colhidas novamente nos mesmos horários da coleta anterior (modelo OVX). Logo após a última coleta, os animais foram anestesiados e perfundidos. Os cérebros foram processados para marcação imunohistoquímica de Kp, tirosina hidroxilase (TH) e TH fosforilada (pTH). Os animais NK3-SAP apresentaram redução média de 66% no número de neurônios imunorreativos (ir) à Kp no ARC. Essa lesão induziu uma diminuição no ganho de peso corporal, irregularidade do ciclo estral e a análise ovariana revelou um aumento de 50% na atresia folicular comparado ao grupo Veh. Esse efeito foi acompanhado por uma queda no número de folículos saudáveis pequenos. A taxa de ovulação, entretanto, não foi afetada, como demonstrado pela não alteração do número de corpos lúteos. No modelo OVX+E2, as ratas NK3-SAP apresentaram um pico de LH induzido por E2 amplificado e adiantado em uma hora em relação ao grupo Veh. Por sua vez, o pico de PRL foi suprimido nos animais NK3-SAP. Subsequentemente, no modelo OVX, a secreção basal de LH foi semelhante entre os grupos, enquanto as concentrações basais de PRL foram indetectáveis. Não houve diferença no número de neurônios imunorreativos para TH entre

os grupos, porém, a imunorreatividade à pTH e a razão pTH/TH foi maior na eminência mediana das ratas NK3-SAP. Dessa forma, a perda seletiva de neurônios KNDy altera de maneira diferenciada a regulação estrogênica das secreções de LH e PRL. Nossos resultados corroboram o papel inibitório dos neurônios KNDy na geração do pico de LH. Assim, a perda substancial, mas não absoluta dos neurônios KNDy parece facilitar a ocorrência do pico de LH e ovulação mesmo em um ambiente de ciclo ovariano irregular. A redução do pico de PRL acompanhado por um aumento da atividade dos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares revela que os neurônios KNDy inibem a liberação de dopamina e este efeito está associado ao aumento da secreção de PRL induzido por E2. Esses achados sugerem uma nova via no controle neuroendócrino da secreção de PRL, na qual os peptídeos KNDy orquestram mudanças na liberação de PRL através de neurônios dopaminérgicos. Assim, os neurônios KNDy parecem exercer múltiplos efeitos hipotalâmicos que impactam a função reprodutiva em fêmeas.

Palavras-chave: kisspeptina; neurocinina; dinorfina; hormônio luteinizante; prolactina; dopamina.

ABSTRACT

Hyperprolactinemia, a highly prevalent dysfunction of the hypothalamus-pituitary axis, is frequently associated with reproductive disorders in women. An important stimulator of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis is kisspeptin, a key neuropeptide for fertility. Hypothalamic arcuate nucleus (ARC) neurons that coexpress kisspeptin (Kp), neurokinin B and dynorphin A (KNDy) play an important role in the control of luteinizing hormone (LH) and prolactin (PRL) secretions, but the neuroendocrine mechanisms involved are to be elucidated. The current study aimed to determine the effects of selective neurochemical ablation of KNDy neurons on the estrogenic regulation of LH and PRL secretion in female rats. For this purpose, neurokinin B receptor 3 agonist conjugated with saporin (NK3-SAP) was used to cause selective lesion of KNDy neurons. Regular cycling rats received intra-ARC stereotaxic injections of NK3-SAP (NK3-SAP; n = 5) or vehicle (Veh; n = 6). Estrous cyclicity was monitored over 21 days before and after injections followed by ovariectomy. Ovaries were collected and processed for histological analysis. Rats were treated with estradiol (E2) cypionate (OVX+E2 model). E2 treatment lasted three days and on the fourth day, blood samples were withdrawn from the tail tip at each 30 min from 13:00 h to 19:00 h, for whole blood LH and PRL measurement. After 6 days, animals received corn oil treatment for 3 days and on the fourth day blood samples were taken from the tail again following the same protocol described above (OVX model). Shortly after the last sampling, animals were anaesthetized and perfused. Brains were processed for immunohistochemical staining of Kp, tyrosine hydroxylase (TH) and phosphorylated TH (pTH). NK3-SAP animals displayed an average loss of 66% in the number of Kp-immunoreactive (ir) neurons in the ARC. This lesion induced a decrease in body weight gain, irregularity of estrous cycles, and ovarian analysis revealed an increase in 50% of follicular atresia compared to Veh group. This effect was accompanied by a decrease in the number of small healthy follicles. However, ovulation was not affected, as revealed by the unchanged number of corpora lutea. In the OVX+E2 model, E2-induced LH surge was amplified and advanced by 1 hour compared to Veh. In turn, the PRL surge was suppressed in NK3-SAP OVX+E2 rats. In the OVX model, basal LH secretion was unaffected by the NK3-SAP lesion, and PRL levels were undetectably low in both groups. NK3-SAP and Veh rats displayed a similar number of TH-ir neurons in the ARC but the immunoreactivity to pTH and pTH/TH ratio were increased in the

median eminence of NK3-SAP rats. Thus, selective loss of KNDy neurons differently affects the E2 regulation of LH and PRL secretion in female rats. Our results support an inhibitory role of KNDy neurons in the generation of the LH surge. The substantial, but not absolute, loss of KNDy neurons seems to facilitate the LH surge and ovulation even in a condition of irregular estrous cyclicity. The reduction in PRL surge, associated with the increased activity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons, reveals that KNDy neurons inhibit neuroendocrine dopamine and this effect seems to be implicated in the E2-induced increase in PRL secretion. These findings suggest a new pathway for the neuroendocrine control of PRL secretion, in which KNDy peptides orchestrate changes in PRL release through dopaminergic neurons. Thus, KNDy neurons seem to exert multiple hypothalamic effects impacting the female reproductive function.

Keywords: kisspeptin; neurokinin; dynorphin; luteinizing hormone; prolactin; dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lesão neuroquímica seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy)	36
Figura 2: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) reduz o ganho de peso corporal, perturba a ciclicidade estral, mas não altera o peso ovariano	37
Figura 3: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) aumenta o número de folículos atresicos, diminui o número de folículos saudáveis pequenos, mas não altera o número de corpos lúteos	39
Figura 4: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) amplifica o pico de hormônio luteinizante (LH) induzido por estradiol (E2) mas não afeta a secreção basal de LH na ausência de E2	41
Figura 5: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) reduz o pico de prolactina (PRL) induzido por estradiol (E2)	43
Figura 6: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) aumenta a atividade enzimática de terminais de neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) na eminência mediana (ME)	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
Justificativa e relevância	12
Kisspeptina e seu receptor	13
Kisspeptina e a regulação do eixo HPG.....	15
Papel da PRL na reprodução e controle neuroendócrino de sua secreção	18
Envolvimento dos neurônios KNDy no controle da secreção de PRL	20
Envolvimento dos neurônios KNDy nas secreções concomitantes de LH e PRL	22
Abordagens de estudo da função dos neurônios KNDy <i>in vivo</i>	24
2. OBJETIVOS	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
Animais	27
Planejamento experimental	27
Cirurgias e drogas	29
Citologia vaginal.....	30
Histologia ovariana	30
Tratamentos hormonais.....	30
Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para LH e PRL	31
Processamento dos cérebros	32
Imunohistoquímica	33
Obtenção e análise das imagens das secções cerebrais.....	34
Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS	36
Lesão neuroquímica seletiva para neurônios KNDy	36
Efeito da lesão dos neurônios KNDy no peso corporal e na ciclicidade estral.....	36
Efeito da lesão dos neurônios KNDy na função ovariana	38
Efeito da lesão dos neurônios KNDy na regulação estrogênica da secreção de LH.....	39

Efeito da lesão dos neurônios KNDy na secreção de PRL induzida por E2.....	42
Efeito da lesão dos neurônios KNDy na atividade enzimática dos neurônios TIDA ..	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Justificativa e relevância

A hiperprolactinemia, uma doença endócrina altamente prevalente no eixo hipotálamo-hipófise, se enquadra como uma das causas mais comuns de infertilidade entre em mulheres com problemas reprodutivos (Biller, Luciano et al. 1999). Essa patologia eleva cronicamente os níveis de prolactina (PRL) de modo a provocar aciclicidade, anovulação, hipogonadismo, galactorreia e perda óssea (Grattan and Kokay 2008). Esse fenômeno é desencadeado pela inibição da liberação de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) que implica na diminuição da secreção de hormônio luteinizante (LH) (Bohnet, Dahlen et al. 1976, Moulton, REES et al. 1982, Matsuzaki, Azuma et al. 1994). A secreção de LH é controlada por neurônios *upstream* aos neurônios GnRH, denominados neurônios kisspeptinérgicos. Esses neurônios exercem potente efeito estimulatório sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), pelo fato dos neurônios GnRH expressarem receptor para kisspeptina (Kiss1r) (Irwig, Fraley et al. 2004, Han, Gottsch et al. 2005, Messenger, Chatzidaki et al. 2005, Pinilla, Aguilar et al. 2012). De fato, a administração de kisspeptina em mulheres com hiperprolactinemia reativa a secreção gonadotrófica e restaura a função ovariana desse quadro (Millar, Sonigo et al. 2017).

A puberdade precoce e a não ocorrência da puberdade no tempo ideal são associadas à hiper e hipofunção, respectivamente, do sistema de sinalização kisspeptinérgico. Uma mutação que confere alta resistência da kisspeptina à degradação foi previamente identificada em crianças com antecipação da puberdade (Silveira, Noel et al. 2010). Por sua vez, crianças que apresentam mutações deletérias do gene *KISS1R* não se desenvolvem sexualmente e apresentam fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico (de Roux, Genin et al. 2003). Se tratadas com infusão contínua de GnRH, esse quadro não é revertido, porém se a infusão de GnRH for dada sob a forma de pulsos, as gonadotrofinas são estimuladas e o desenvolvimento sexual é desencadeado (Delemarre-van de Waal 2004). Essa secreção pulsátil de GnRH se mostra relevante para a manutenção da sensibilidade dos gonadotrofos (Belchetz, Plant et al. 1978) e os neurônios kisspeptinérgicos do núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico são fortes candidatos a controladores da secreção pulsátil de GnRH, com reflexos para a pulsatilidade de LH. Esses neurônios do ARC secretam kisspeptina, neurocinina B e

dinorfina A e, por isso, foram denominados neurônios KNDy (Goodman, Lehman et al. 2007, Navarro, Gottsch et al. 2009, Lehman, Merkley et al. 2010, Wakabayashi, Nakada et al. 2010).

Sabe-se que a administração subcutânea ou intravenosa de kisspeptina é capaz de estimular a liberação de gonadotrofinas e a maturação de óvulos em pessoas saudáveis, assim como em homens e mulheres inférteis e modelos animais diversos, tendo potencial terapêutico para uso em fertilização in vitro (Jayasena, Abbara et al. 2014, Prague and Dhillo 2015). Entretanto, quando realizado de modo crônico, o tratamento com kisspeptina pode suprimir o eixo HPG em humanos e em outras espécies animais devido a uma dessensibilização do eixo, a qual apresenta potencial contraceptivo (Prague and Dhillo 2015).

Levando em consideração a importância reprodutiva dos neurônios KNDy e o potencial terapêutico da kisspeptina, este trabalho buscou expandir a compreensão do envolvimento dos neurônios KNDy no controle neuroendócrino da secreção de LH e PRL, através da análise dos efeitos da lesão neuroquímica desses neurônios em diferentes condições estrogênicas em ratas Wistar. Entender o papel do circuito neuronal kisspeptinérgico pode abrir fronteiras para o desenvolvimento de novas abordagens de tratamento para desordens de fertilidade, puberdade, além de novos métodos de contracepção.

Kisspeptina e seu receptor

Originalmente, a kisspeptina era conhecida como metastina, uma vez que o gene *KISS1* foi primeiramente identificado como gene supressor de metástase em linhagens de células de melanoma (Lee, Miele et al. 1996) e de carcinoma mamário humanos (Lee and Welch 1997). A nomenclatura *KISS1* se deve ao gene *KISS* estar localizado no cromossomo 1 em humanos e a escolha da palavra “kiss” é atribuída ao fato desse gene ter sido descoberto na cidade de Hershey, na Pensilvânia, EUA, conhecida pela fábrica de mesmo nome que produz os chocolates “kisses”.(Lee, Miele et al. 1996).

Por convenção, a palavra kisspeptina é frequentemente usada no singular, porém ela se refere a um grupo de peptídeos, as kisspeptinas. Em humanos, o gene *KISS1* codifica a prepro-kisspeptina, uma proteína composta por 145 aminoácidos, a qual é biologicamente inativa. Quando clivada proteoliticamente, a kisspeptina-145 produz fragmentos bioativos classificados de acordo com o número de aminoácidos em kisspeptina-54, kisspeptina-14,

kisspeptina-13 e kisspeptina-10 (Kp-10) (West, Vojta et al. 1998, Gottsch, Clifton et al. 2009). Os fragmentos kisspeptina-54 e Kp-10 também são encontrados no cérebro de ratas (Desroziers, Mikkelsen et al. 2010). Esses fragmentos bioativos fazem parte de uma ampla família denominada de peptídeos RF amida, visto que os peptídeos dessa família compartilham uma sequência comum de arginina-fenilalanina-NH₂ em sua porção C-terminal, indispensáveis à sua atividade biológica (Tsutsui, Bentley et al. 2010).

Essa família de peptídeos, derivados da clivagem da kisspeptina-154, se liga a um receptor inicialmente conhecido como GPR54. Esse receptor era considerado órfão quando foi primeiramente isolado a partir do cérebro de rato e revelado como homólogo do GPR54 humano (Lee, Nguyen et al. 1999). Após a confirmação de que as kisspeptinas se ligavam ao GPR54, esse receptor foi então denominado Kiss1r (Kotani, Detheux et al. 2001, Muir, Chamberlain et al. 2001, Ohtaki, Shintani et al. 2001). O Kiss1r é um receptor com sete domínios transmembrana associado a proteína Gq cuja ativação provoca a fosforilação de fosfolipase C, que por sua vez eleva os níveis de Ca²⁺ intracelular através da hidrólise de bifosfato de inositol em inositol 1,4,5-trifosfato. Esse aumento de Ca²⁺ provoca uma despolarização da membrana celular (Kotani, Detheux et al. 2001, Stafford, Xia et al. 2002, Navarro, Castellano et al. 2004). A localização do Kiss1r no cérebro ainda é controversa na literatura, mas pode-se afirmar com segurança que ele é majoritariamente expresso em áreas hipotalâmicas (Lee, Nguyen et al. 1999, Herbison, d'Anglemont de Tassigny et al. 2010, Aquino, Kokay et al. 2019).

Alguns anos após o descobrimento do envolvimento do gene *KISS1* na supressão de metástase em células humanas, o envolvimento do sistema de sinalização de kisspeptina e seu receptor (Kisspeptina/Kiss1r) foi associado à reprodução. Isso ocorreu quando foi constatado que mutações inativadoras de *Kiss1r* geram um quadro conhecido como hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos (de Roux, Genin et al. 2003, Seminara, Messager et al. 2003) e roedores (Funes, Hedrick et al. 2003), caracterizado pela deficiência na secreção de gonadotropinas, retardo na maturação da função reprodutiva e infertilidade. Desta forma, a identificação do sistema Kisspeptina/Kiss1r culminou em um grande avanço no entendimento dos mecanismos neurais que regulam a secreção de GnRH e é considerado um marco da neuroendocrinologia moderna (Roa, Aguilar et al. 2008, Pinilla, Aguilar et al. 2012).

Kisspeptina e a regulação do eixo HPG

Em várias espécies de mamíferos, a fertilidade é estabelecida e mantida por sinais hormonais produzidos pelo eixo HPG. No topo desse eixo, se encontram neurônios hipotalâmicos secretores de GnRH. Os neurônios GnRH possuem uma morfologia bipolar e suas projeções podem tanto conduzir potencial de ação, assim como receber *inputs* sinápticos, assumindo assim propriedades tanto de axônios quanto de dendritos e, por isso, essas projeções são denominadas *dendrons* (Herde, Iremonger et al. 2013). Essas projeções estão distribuídas em torno do soma em projeções soma-proximais, que se encontram na área preoptica, e em projeções soma-distais, cujos terminais se concentram na eminência mediana (ME) (Campbell, Han et al. 2005, Cottrell, Campbell et al. 2006). Através dos terminais das projeções soma-distais na ME, a secreção de GnRH é liberada no sistema vascular porta-hipofisário, a partir de onde chega aos gonadotrofos estimulando a produção das gonadotrofinas LH e hormônio folículo-estimulante (FSH). Nos ovários, o FSH age estimulando a maturação dos folículos, enquanto o LH promove a ovulação e a formação dos corpos lúteos. O ciclo estral da rata tem duração média de 4–5 dias, sendo constituído das fases de metaestro, diestro, proestro e estro. Durante o início do dia de estro, ocorre o recrutamento de um *cohort* de folículos secundários em desenvolvimento, os quais crescem rapidamente até a metade do ciclo, a ponto de secretarem altos níveis de estradiol (E2) durante a fase de proestro. Em níveis suficientemente altos, o E2 é capaz de realizar retroalimentação positiva sobre o hipotálamo e a hipófise, deflagrando um pico de GnRH que se reflete em um pico preovulatório de LH, processo chave para a ocorrência da ovulação na madrugada do estro. Após a ovulação, a produção estrogênica ovariana diminui, resultando em baixos níveis de E2 que exercem retroalimentação negativa sobre a secreção de GnRH e LH (Levine 2015).

Esse efeito do E2 sobre a secreção de GnRH não parece ser explicado pela expressão de receptores para estrógeno (ER) nesses neurônios. Os subtipos alfa (ER α) e beta (ER β) desse receptor parecem exercer diferentes papéis no controle da secreção gonadotrófica, uma vez que camundongos *knockout* para ER α , mas não os *knockout* para ER β , são inférteis (Lubahn, Moyer et al. 1993) e incapazes de gerar o pico pré-ovulatório de LH (Wintermantel, Campbell et al. 2006). A deleção de ER β em camundongos, por sua vez, não resulta em absoluta infertilidade, embora esteja associada com redução da eficiência ovariana e reprodutiva (Krege, Hodgin et al. 1998, Dupont, Krust et al. 2000, Rumi, Singh et al. 2017).

Contudo, os neurônios de GnRH expressam apenas ER β (Herbison and Pape 2001), a isoforma que não é essencial para o efeito do E2 sobre o eixo hipotálamo-hipófise de induzir o pico pré-ovulatório de LH (Wintermantel, Campbell et al. 2006, Jayes, Burns et al. 2014). Essa lacuna de sinalização existente sobre o controle da secreção de gonadotrofinas pelo E2, despertou o interesse de vários grupos de pesquisadores a fim de investigar a existência de interneurônios hipotalâmicos que expressassem ER α e que participassem do controle da reprodução. Desse modo, os candidatos a interneurônios em maior evidência no momento são os neurônios kisspeptinérgicos, uma vez que esses neurônios expressam ER α (Kinoshita, Tsukamura et al. 2005, Smith, Cunningham et al. 2005) e enviam projeções para os neurônios GnRH, os quais expressam Kiss1r e são altamente responsivos à kisspeptina (Irwig, Fraley et al. 2004, Han, Gottsch et al. 2005, Messenger, Chatzidaki et al. 2005).

Em relação ao efeito bimodal do E2 sobre a secreção de GnRH/LH, a explicação mais plausível atualmente é que populações kisspeptinérgicas fenotipicamente e regionalmente distintas medeiam esse efeito em roedores. Na área preóptica do hipotálamo, mais especificamente no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), reside uma população neuronal kisspeptinérgica, enquanto no ARC reside a população kisspeptinérgica dos neurônios KNDy. Ambas essas populações emitem projeções para os neurônios de GnRH (Kinoshita, Tsukamura et al. 2005, Krajewski, Anderson et al. 2005, Clarkson and Herbison 2006, Kumar, Candlish et al. 2015). Os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV respondem ao E2 com um aumento na expressão de kisspeptina (Smith, Popa et al. 2006, Clarkson, de Tassigny et al. 2008). Sendo assim, essa população kisspeptinérgica do AVPV é considerada o sítio de retroalimentação positiva do E2, o qual promove a geração do pico de LH. Por sua vez, os neurônios KNDy também são responsivos ao E2, mas neste caso há redução da expressão de kisspeptina no ARC. Assim, os KNDy estão associados à retroalimentação negativa do E2, responsável pelo controle da secreção basal de LH (Smith, Cunningham et al. 2005). Contudo, a divisão funcional rígida dessas duas populações kisspeptinérgicas não parece ser corroborada por evidências de ativação dos neurônios KNDy durante o pico pré-ovulatório de LH em ovelhas (Estrada, Clay et al. 2006, Merkley, Porter et al. 2012). Ainda, evidências neurais revelaram a existência de uma maior proporção de projeções aferentes dos neurônios KNDy encontradas no AVPV de camundongos fêmeas em relação a machos (Moore, Coolen et al. 2019) e a inibição da porção distal das projeções de GnRH, as quais recebem densas projeções de neurônios KNDy (Yip, Boehm et al. 2015), provoca alterações na frequência de pulso e no pico de LH (Wang, Guo et al. 2020). Essas evidências sugerem

que os neurônios KNDy poderiam assumir um papel na gênese do pico pré-ovulatório de LH, além de seu envolvimento na secreção basal desse hormônio.

Quando avaliada em menor escala temporal, a secreção basal de LH é caracterizada por um padrão pulsátil, que corresponde quase que exatamente ao padrão de secreção de GnRH (Levine and Duffy 1988). Assim, é conhecida a existência de duas maneiras distintas de secreção de LH. O modo de pulso de LH prevalece quando há níveis circulantes baixos de E2 e promove aumentos pontuais da secreção de LH em intervalos em torno de 1 h. Por sua vez, o modo de pico de LH é desencadeado em situações de altos níveis de E2 e determina a ocorrência do pico pré-ovulatório deste hormônio nas fêmeas, que se caracteriza por ocorrer em intervalos de tempo mais longo e apresenta maior magnitude que a secreção pulsátil. Acredita-se que estes modos distintos de secreção sejam controlados por vias hipotalâmicas distintas. Entretanto, permanece a dúvida se o pico pré-ovulatório de LH é constituído por pulsos de alta frequência e/ou amplitude, ou se corresponde a um aumento de secreção não-pulsátil. Estas duas opções são comumente aventadas hipoteticamente, mas, no momento, ainda não há evidências experimentais que claramente suportem uma ou outra (Herbison 2016, Herbison 2020).

Um mecanismo proposto pelo qual o modo pulso de secreção de LH é controlado pelos neurônios KNDy é conhecido como “hipótese KNDy” ou “modelo KNDy”. Essa hipótese postula que os peptídeos kisspeptina, neurocinina B e dinorfina A interagem uns com os outros para formar uma rede neural que opera de forma sincronizada para controlar a atividade de neurônios GnRH (Lehman, Coolen et al. 2010). Essa hipótese partiu de evidências de imunohistoquímica que revelaram a existência de fibras contendo dinorfina A e neurocinina B em contato com corpos celulares contendo esses mesmos peptídeos no ARC de ratos (Burke, Letts et al. 2006). Isso vai ao encontro de evidências em camundongos que mostraram que os neurônios KNDy não somente expressam kisspeptina, dinorfina A e neurocinina B, mas também expressam os genes dos receptores de neurocinina A (*Nk3*) e dinorfina B, conhecido como receptor kappa-opioide (*Kor*) (Navarro, Gottsch et al. 2009). Essas evidências levaram a deduzir que os neurônios KNDy são interconectados. De fato, as subpopulações desses neurônios dos dois lados do ARC emitem projeções umas para as outras, as quais foram identificadas paralelamente ao assoalho do terceiro ventrículo atravessando a camada interna da ME, como demonstrado por estudos de rastreamento de tratos neurais em ratos (Krajewski, Burke et al. 2010) e de fotoestimulação unilateral em camundongos (Qiu, Nestor et al. 2016). Dessa forma, os neurônios KNDy sincronizariam sua atividade de forma a liberar sinais de iniciação e de terminação do pulso de GnRH e, por

consequência, do pulso de LH. Em roedores, os sinais iniciadores do pulso seriam a neurocinina B e a kisspeptina, enquanto a dinorfina A terminaria o pulso de GnRH (Kinsey-Jones, Grachev et al. 2012, Qiu, Nestor et al. 2016). Contudo, apesar da expressão de Kiss1r e Nk3r em neurônios de GnRH (Han, Gottsch et al. 2005, Krajewski, Anderson et al. 2005), não há presença de Kor nesses neurônios em roedores (Mitchell, Prevot et al. 1997).

Ainda, existe uma provável uma integração de atividade entre os neurônios KNDy e os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV para controlar a atividade dos neurônios GnRH. Densas fibras imunorreativas para neurocinina B foram encontradas partindo do ARC em direção ao AVPV (Rance, Krajewski et al. 2010). Interessantemente, foi descoberto que os neurônios KNDy também expressam o transportador vesicular de glutamato 2 (vGluT2) e liberam o neurotransmissor glutamato (Cravo, Margatho et al. 2011, Nestor, Qiu et al. 2016), o qual poderia estimular neurônios hipotalâmicos (Van Den Pol, Wuvarin et al. 1990). Essa possibilidade de integração foi demonstrada pela estimulação de alta frequência de neurônios KNDy, a qual resulta na liberação de glutamato nos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV. A ativação dos neurônios do AVPV pelos neurônios KNDy de forma sincronizada resultou numa robusta excitação dos neurônios GnRH (Qiu, Nestor et al. 2016).

Papel da PRL na reprodução e controle neuroendócrino de sua secreção

A PRL é um hormônio com efeitos sistêmicos bastante diversos que vão além de seu papel de promoção da lactação, originalmente descrito em coelhas (Riddle, Bates et al. 1933). Em fêmeas, a PRL está envolvida na modulação da função ovariana, no metabolismo energético, no comportamento materno e na resposta ao estresse e ansiedade (Grattan and Kokay 2008). Em roedores, a deleção do receptor de PRL (PRL-R) é capaz de reduzir a expressão de enzimas ovarianas envolvidas na esteroidogênese e de reduzir a sobrevivência de corpos lúteos. Esse último efeito é atribuído à capacidade da PRL de modular a expressão de receptores de LH nos corpos lúteos (Grosdemouge, Bachelot et al. 2003). Durante a tarde do proestro de ratas, ocorre um pico de secreção de PRL (Smith, Freeman et al. 1975), o qual induz adaptações comportamentais para a cópula e sensibiliza o corpo lúteo para responder a outros fatores luteotróficos caso ocorra uma implantação (Levine 2015). Um segundo pico circadiano de PRL acontece no período noturno sob indução de um estímulo cervical provocado pela cópula (Freeman, Smith et al. 1974). Esse pico noturno de PRL também ocorre durante todos os quatro primeiros dias da prenhes (Butcher, Fugo et al. 1972).

Classicamente, a PRL regula sua própria secreção agindo sobre o sistema dopaminérgico neuroendócrino hipotalâmico por meio de um mecanismo de *feedback* de alça curta (Ben-Jonathan and Hnasko 2001). Esse sistema é responsável por liberar dopamina de forma tônica na ME (Fuxe 1965), região que se configura como uma porta de entrada para o sistema vascular porta-hipofisário (Ben-Jonathan, Oliver et al. 1977, Gibbs and Neill 1978). A partir da circulação porta, a dopamina chega aos lactotrofos hipofisários, onde age em receptores dopaminérgicos do tipo D2, inibindo então a secreção de PRL (Meador-Woodruff, Mansour et al. 1989).

Esse sistema liberador de dopamina responsável pela regulação da secreção de PRL é formado por populações distintas de neurônios dopaminérgicos, identificadas de acordo com a localização dos seus corpos celulares e seus respectivos terminais. Os neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) encontram-se no ARC e projetam-se para a camada externa da EM (Kawano and Daikoku 1987). Os neurônios tuberohipofisários dopaminérgicos (THDA) residem na porção rostral do ARC e emitem projeções para os lobos intermediário e neural da hipófise (Holzbauer and Racke 1985). A população de neurônios dopaminérgicos periventriculares hipofisários (PHDA) é localizada no núcleo periventricular hipotalâmico e projeta para o lobo intermediário da hipófise (Goudreau, Falls et al. 1995). Entre essas populações, os neurônios TIDA emergem como os que secretam a maior parte da dopamina liberada na EM (Ben-Jonathan and Hnasko 2001).

A natureza direta ou indireta da ação da PRL sobre neurônios dopaminérgicos tem sido demonstrada nos últimos anos. Estudos *in vitro* utilizando células hipotalâmicas fetais demonstraram coexpressão de tirosina hidroxilase (TH) e PRL-R em 10% das células em cultura, sendo que essa mesma cultura também apresentava 20-25% de células de populações heterogêneas que expressavam PRL-R, mas não expressavam TH (Arbogast and Voogt 1997). Por sua vez, um estudo *in vivo*, demonstrou que o tratamento com haloperíol, um antagonista do receptor de dopamina D2, foi capaz de aumentar os níveis circulantes de PRL, quadro este associado ao aumento da expressão de Fos nos neurônios TIDA de ratos (Hentschel, Moore et al. 2000). Ainda, estudos recentes demonstram que a PRL é capaz de atuar diretamente sobre os neurônios TIDA induzindo a fosforilação do fator ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 5 (STAT5), bem como causando o aumento dos disparos de potenciais de ação destes neurônios em preparações de eletrofisiologia em fatias cerebrais (Romanò, Yip et al. 2013, Grattan 2015).

Outro importante regulador da secreção de PRL é o E2, visto que o pico de PRL que ocorre durante a tarde do proestro está associado a elevados níveis de E2 (Smith,

Freeman et al. 1975). Esse fenômeno pode ser explicado pela ação do E2 tanto em nível hipofisário quanto hipotalâmico. Esse esteroide ovariano é capaz de estimular diretamente a secreção de PRL pela adenohipófise, através do aumento do número de lactotrofos (Takahashi, Okazaki et al. 1984, Scully, Gleiberman et al. 1997, Kansra, Yamagata et al. 2005, Kansra, Chen et al. 2010) e da alteração da responsividade destes à dopamina (Raymond, Beaulieu et al. 1978). À nível hipotalâmico, o E2 regula a secreção de PRL indiretamente através de sua ação em neurônios TIDA, via ER α (Jones and Naftolin 1990, Steyn, Anderson et al. 2007). A ação do E2 sobre esses neurônios é predominantemente inibitória (Demarest, Riegler et al. 1984, Arita and Kimura 1987, DeMaria, Lerant et al. 1999, Morel, Carón et al. 2009), a qual provoca redução da secreção de dopamina na circulação porta hipofisária e, assim, facilitação da secreção de PRL (Cramer, Parker et al. 1979, Blum, McEwen et al. 1987, Morrell, Rosenthal et al. 1989). Ademais, o E2 pode regular respostas celulares à PRL em diversas regiões do hipotálamo, nas quais grande parte dos neurônios que expressam PRL-R também coexpressam ER α (Furigo, Kim et al. 2014). Nas populações de neurônios dopaminérgicos, o E2 pode regular a expressão de PRL-R de forma diferenciada, uma vez que os neurônios TIDA apresentam maior aumento da expressão de PRL-R em resposta ao E2 (Lerant and Freeman 1998). Além da responsividade de neurônios dopaminérgicos à PRL estar sob regulação esteroideal, a via de sinalização do PRL-R também é regulada pelo E2. Ratas ovariectomizadas tratadas com E2 apresentam aumento da fosforilação de STAT5 e dos níveis de RNAm de supressores de sinalização de citocinas na área preóptica e no ARC (Anderson, Kieser et al. 2008). Portanto, é descrito que a regulação estrogênica da secreção de PRL se dá nos diversos níveis hipotalâmico, hipofisário e celular.

Envolvimento dos neurônios KNDy no controle da secreção de PRL

Apesar da ação direta da PRL sobre neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos os neurônios KNDy emergem como mediadores do controle da liberação de dopamina e a secreção de PRL (Grattan and Szawka 2019). Há quase três décadas é sabido que projeções dinorfinérgicas provenientes do ARC inervam densamente os neurônios TIDA (Fitzsimmons, Olschowka et al. 1992). Posteriormente, foi demonstrado que essa inervação é crítica para a regulação da secreção de PRL durante a gravidez e a lactação (Andrews and Grattan 2003) e que a dinorfina reduzia a atividade dos neurônios TIDA (Durham, Johnson

et al. 1996, Callahan, Klosterman et al. 2000). A partir da descoberta que essas projeções de dinorfina originadas no ARC eram provenientes de neurônios KNDy (Navarro, Gottsch et al. 2009), foi aventada a hipótese da kisspeptina regular a atividade de neurônios TIDA e, consequentemente, a secreção de PRL.

De fato, foram identificadas por nosso grupo de pesquisa, projeções kisspeptinérgicas em contato com a pericaria de neurônios TIDA (Szawka, Ribeiro et al. 2010). Adicionalmente, neste último trabalho, foi observado que a injeção intracerebroventricular (ICV) de Kp-10 resultou em uma redução da secreção de dopamina pelos neurônios TIDA na ME, associada a uma elevação da secreção de PRL. Esse efeito sobre a secreção de PRL se mostrou dependente da dose de Kp-10, uma vez que doses mais altas desse peptídeo foram necessárias para aumentar a secreção de PRL quando comparado com a secreção de LH. Isso sugeriu que neurônios dopaminérgicos eram menos sensíveis à kisspeptina que neurônios GnRH. Uma vez observado que ratas em proestro, mas não em diestro, eram responsivas à Kp-10, foi testada a hipótese de que esse mesmo efeito era dependente de E2. Dessa forma, essa responsividade dos neurônios TIDA à kisspeptina foi testada em modelos de ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com E2 (OVX+E2), as quais mimetizam a condição de baixos níveis de E2 do diestro e a os altos níveis de E2 do proestro, respectivamente. As ratas OVX+E2 tratadas com Kp-10 apresentaram redução da atividade dopaminérgica na ME sugerindo uma ação central da kisspeptina de inibição de neurônios TIDA dependente de E2 (Szawka, Ribeiro et al. 2010). Isso foi ao encontro da expressão de ER α que encontramos nos neurônios TIDA de ratos, cuja ativação seletiva se mostrou necessária para que a secreção de PRL respondesse à kisspeptina (Ribeiro, Leite et al. 2015, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017).

Apesar da ação da kisspeptina sobre a atividade de neurônios TIDA, neurônios dopaminérgicos apresentam baixa expressão de receptores Kiss1r. Contudo, foi detectado RNAm para outro receptor com certa afinidade à kisspeptina, o receptor 1 do neuropeptídeo FF (Npffr1) (Elhabazi, Humbert et al. 2013), na maioria dos neurônios PHDA, mas em uma menor proporção em neurônios TIDA (Aquino, Kokay et al. 2019). Dessa forma, a ação da kisspeptina sobre os neurônios TIDA poderia ocorrer de maneira indireta. Nesse sentido, para investigar o papel de Kiss1r na regulação dopaminérgica, foi utilizada uma linhagem de camundongos *knockout* para esse receptor, exclusivamente em neurônios GnRH. Dessa maneira, foi possível avaliar a regulação da secreção de PRL sem o comprometimento da função reprodutiva associado a um modelo de *knockout* global de Kiss1r (Kirilov, Clarkson et al. 2013). Os animais com deficiência do Kiss1r em neurônios GnRH não apresentaram

aumento da liberação de PRL induzido por administração ICV de Kp-10. Em adição, a administração do antagonista de Kiss1r, kisspeptina-234, em ratas OVX+E2 foi capaz de bloquear o aumento de PRL induzido por Kp-10, mas sem alteração na atividade de neurônios TIDA (Aquino, Kokay et al. 2019). Esses achados indicaram que a supressão de neurônios TIDA induzida pela kisspeptina era independente de Kiss1r nesses neurônios e, dessa forma, a ação da kisspeptina sobre a regulação da secreção de PRL poderia se dar através de outras vias ainda não esclarecidas.

Uma segunda possibilidade seria que outros peptídeos KNDy regulassem a atividade de neurônios TIDA, visto que a kisspeptina não parece atuar diretamente sobre esses neurônios dopaminérgicos de forma a impactar a secreção de PRL (Aquino, Kokay et al. 2019). Fibras de neurocinina B são encontradas em aposição aos neurônios TIDA, os quais expressam Nk3r (Sawai, Iijima et al. 2012, Sawai, Iijima et al. 2014). A dinorfina é um peptídeo KNDy que poderia atuar na regulação da secreção de PRL, via inibição da liberação de dopamina, visto que há aposição de fibras dinorfinérgicas na pericária de neurônios TIDA (Fitzsimmons, Olschowka et al. 1992). Em linha com essa hipótese, um trabalho ainda não publicado de nosso grupo investigou os terminais de neurônios KNDy em contato com neurônios TIDA e demonstrou que o E2 promove uma mudança funcional nesses terminais, na qual o número de fibras kisspeptinérgicas diminuiu ao passo que o número de fibras dinorfinérgicas aumentou em ratas OVX+E2. Dessa forma, o E2 aumentou os *inputs* de dinorfina provenientes dos neurônios KNDy sobre os neurônios TIDA, inibindo a atividade dos neurônios TIDA e aparentemente desencadeando o pico de PRL induzido por E2 (Araujo-Lopes, Yip et al. 2017).

Envolvimento dos neurônios KNDy nas secreções concomitantes de LH e PRL

É sabido que elevados níveis de E2 durante o proestro desencadeia um pico pré-ovulatório de LH e, também, um pico de PRL. Sendo que, as fases do ciclo estral nas quais apresentam baixos níveis de E2, ambas secreções de LH e PRL se encontram em níveis basais (Smith, Freeman et al. 1975). De forma interessante, as secreções de pico de LH e PRL ocorrem de modo concomitante, o que gera a hipótese de que os neurônios KNDy poderiam possuir um papel de integração da regulação estrogênica e de sincronização das secreções pré-ovulatórias de LH e PRL.

À nível de secreção basal, o padrão pulsátil de secreção de LH foi associado a pulsos simultâneos de PRL tanto em homens quando em mulheres de acordo com vários estudos

(Cetel and Yen 1983, Masaoka, Kitazawa et al. 1988, Veldhuis and JOHNSON 1988). Isso sugere que ambas as secreções de LH e PRL compartilham o mesmo “gerador de pulso”, o qual seria os neurônios KNDy em roedores (Clarkson, Han et al. 2017). Contudo, esse padrão pulsátil concomitante não é observado de forma uniforme em macacos e roedores, nos quais o padrão pulsátil de secreção de PRL ocorre apenas sob a influência de anestésicos e agonistas de dopamina (Belchetz, Dufy et al. 1978, Shin and Chi 1979). Assim, o padrão de secreção pulsátil de PRL parece ser naturalmente inibido de forma tônica em macacos e roedores, e ainda permanece pouco elucidado.

Tanto a secreção basal quando a secreção de pico de LH e PRL foram investigadas por nosso grupo de pesquisa. Mostramos que a injeção ICV de kisspeptina-234 perturba a fase de pico das secreções de LH e PRL induzidas pelo E2 em ratas OVX+E2 (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017) e que o tratamento com tamoxifen, um modulador seletivo de ER, provoca redução de níveis basais de LH e PRL e bloqueia os picos das duas secreções hormonais em ratas OVX e OVX+E2. O bloqueio de ER nesses animais também provocou a inibição dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV, porém esse efeito foi menos evidente nos neurônios KNDy, o que sugere uma inibição do *feedback* positivo, mas não do *feedback* negativo do E2 sobre o hipotálamo (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2016). Esses achados sugerem que os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV estariam envolvidos na secreção de pico PRL, mas não descartou a possibilidade dos neurônios KNDy modularem a ativação dos neurônios do AVPV através de projeções dinorfinérgicas (Rance, Krajewski et al. 2010, Qiu, Nestor et al. 2016).

Por outro lado, existem situações em que as secreções de LH e PRL não apresentam o mesmo padrão, e a PRL apresenta um efeito inibitório sobre a secreção de LH. Em ratos machos e fêmeas, a PRL apresenta um efeito de supressão do eixo HPG através da diminuição dos pulsos de GnRH e, consequentemente, de LH, o que indicaria que a PRL inibe a secreção de GnRH (Koike, Aono et al. 1984, Sarkar and Yen 1985, Fox, Hoefer et al. 1987, Koike, Miyake et al. 1991, Park and Selmánoff 1991, Park, Keenan et al. 1993). Porém, a maioria dos neurônios GnRH não expressa PRL-R, enquanto que os RNAm de *Prlr* e *Kiss1* se colocalizam nos núcleos AVPV e ARC de roedores e também em várias outras espécies (Grattan, Jasoni et al. 2007, Kokay, Petersen et al. 2010, Lehman, Hileman et al. 2013). Interessantemente, os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV são aparentemente quatro vezes menos responsivos à PRL quando comparados aos neurônios do ARC (Brown, Khant Aung et al. 2019), sugerindo que os neurônios KNDy desempenham um papel mais importante na mediação da ação da PRL sobre a secreção de GnRH.

Abordagens de estudo da função dos neurônios KNDy *in vivo*

Sabe-se que *knockouts* globais para kisspeptina ou para seu receptor não permitem a avaliação da função de cada uma das populações de neurônios kisspeptinérgicos. Abordagens mais específicas e locais se fazem necessárias para investigação da função dos neurônios KNDy em particular, visto o interesse em avaliar seu papel no controle das secreções de GnRH e LH.

Estudos que administraram injeções ICV ou intra-ARC de antagonista de Kiss1r, observaram uma diminuição da frequência de pulsos de LH (Li, Kinsey-Jones et al. 2009). Contudo, não foi esclarecido a participação dos neurônios KNDy na regulação da secreção de gonadotrofinas, uma vez que a administração intra-ARC do antagonista de Kiss1r interfere nos *inputs* de apenas um dos peptídeos KNDy, a kisspeptina, e não permite avaliar a participação dessa população como um todo, uma vez que o antagonista age apenas em um dos receptores alvo desses peptídeos.

Através de estudo utilizando microinjeções bilaterais de vírus adeno-associado (AAV) para inserção de cDNA antisense de kisspeptina foi possível silenciar cerca de 32% dos neurônios KNDy de ratas pré-puberes (Hu, Li et al. 2015). Apesar desse procedimento não ter afetado o início da puberdade e a manutenção da fertilidade das ratas, foi observado uma perturbação da ciclicidade estral, bem como a diminuição da frequência dos pulsos de LH, mas sem interferência nos picos pré-ovulatórios de LH.

Por sua vez, um método mais preciso e eficaz para lesão de neurônios KNDy é a técnica utilizando saporina, uma toxina inativadora de ribossomo, conjugada a agonista do Nk3r (NK3-SAP). O primeiro estudo a empregar essa técnica alcançou uma lesão seletiva de 95% do número de neurônios imunorreativos (ir) à kisspeptina no ARC, o que provocou a redução da secreção LH e FSH em ratas OVX e OVX+E2 (Mittelman-Smith, Williams et al. 2012). A seletividade dessa lesão foi validada através da marcação imunohistoquímica das populações neuronais vizinhas que expressam proopiomelanocortina (POMC), neuropeptídeo Y (NPY) e GnRH, as quais permaneceram intactas. (Mittelman-Smith, Williams et al. 2012). Nesse trabalho, as coletas de sangue foram realizadas apenas no período da manhã, entre às 7:00 e 11:00 h. Porém, esse não é um horário ideal para análise dos picos de LH e PRL, uma vez que em ratas intactas em proestro e no modelo OVX+E2 os picos pré-ovulatórios desses hormônios ocorre no período da tarde (Smith, Freeman et al. 1975, Szawka, Rodovalho et al. 2009). Portanto,

Mittelman-Smith et al. (2012) descreveram um importante papel dos neurônios KNDy na secreção basal de LH e FSH, ao passo que a participação desses neurônios no *feedback* positivo de E2 ainda não foi totalmente elucidada.

Adicionalmente, um segundo trabalho utilizando a técnica NK3-SAP, alcançou uma lesão de 65% dos neurônios ir à kisspeptina no ARC, a qual foi considerada uma ablação parcial (Helena, Toporikova et al. 2015). Por sua vez, essa lesão provocou a redução tanto da secreção basal quanto na secreção de pico de LH em ratas OVX e OVX+E2, o que sugere que os neurônios KNDy participem tanto do mecanismo de *feedback* negativo quanto do *feedback* positivo do E2 exercido sobre o eixo HPG. Helena et al. (2015) aventaram a hipótese de que a ablação dos neurônios KNDy removeria o *input* inibitório de dinorfina provenientes desses neurônios sobre os neurônios do AVPV, o que resultaria no aumento da amplitude do pico de LH induzido por E2. De fato, a administração intra-AVPV de um antagonista seletivo à Kor, a nor-binaltorfimina (nor-BNI), foi capaz de amplificar a magnitude do pico de LH em ratas OVX+E2, ao passo que a reposição de dinorfina intra-AVPV reduziu a magnitude do pico. Dessa forma, esse trabalho demonstrou que os neurônios KNDy apresentam um papel de limitar a magnitude do pico de LH induzido por E2, através de uma inibição dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV mediada pela dinorfina. Ademais, esse trabalho validou a seletividade da lesão em preservar neurônios TIDA, através da marcação de TH no ARC (Helena, Toporikova et al. 2015), a qual permitiu inferir que esse método de lesão neuronal poderia ser usado para investigar o papel dos neurônios KNDy na secreção de PRL, o que foi feito no estudo subsequente descrito logo a seguir.

O papel da dinorfina sobre a secreção dos picos diurno e noturno de PRL foi avaliado por Stathopoulos et al. (2016). Através do uso de nor-BNI, foi demonstrado que a dinorfina desempenha um papel de facilitação do pico noturno de PRL, mas não altera o pico diurno de PRL induzido por E2. Esse efeito do nor-BNI sobre o pico noturno foi associado ao aumento da secreção dopaminérgica na ME, sugerindo a possibilidade da dinorfina atuar sobre neurônios dopaminérgicos para facilitar a secreção de PRL. Nesse sentido, foi avaliada a expressão de Kor no ARC de ratas OVX, porém dificuldades técnicas impossibilitaram atestar se essa expressão se dava em neurônios TIDA, gerando evidência da presença de Kor no ARC, mas determinar em quais neurônios. Por sua vez, uma lesão de cerca de 50% dos neurônios KNDy, por NK3-SAP, atenuou o pico de PRL induzido por E2, mas apresentou pouco impacto sobre o pico noturno de PRL, sugerindo que mecanismos neurais diferentes controlariam esses dois modos de pico de PRL

(Stathopoulos, Helena et al. 2016). Contudo, ainda não foi totalmente esclarecido quais são os mecanismos neurais responsáveis pelo controle do pico de PRL e como esses circuitos atuam nesse processo.

Por fim, em um estudo recente, a ablação de cerca de 90% dos neurônios KNDy em ratas, resultou em redução de ganho de peso corporal e irregularidade estral, acompanhada de redução do número de corpos lúteos, aumento da atresia folicular, bem como um quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico, caracterizado por baixos níveis de secreção basal de LH (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Apesar dos dados contraditórios sobre a perda de neurônios KNDy e secreção basal de LH, esse trabalho demonstrou que o pico de LH induzido por E2 foi amplificado no modelo de ratas OVX+E2, o que corrobora o papel dos neurônios KNDy no *feedback* positivo de E2 (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Entretanto, ainda existem lacunas a serem esclarecidas quanto à participação dos neurônios KNDy no controle da secreção de LH e PRL em ratas.

Considerando-se que os neurônios KNDy expressam ERs e projetam-se para neurônios GnRH e neurônios TIDA, eles estão em posição central para mediar os efeitos regulatórios do E2 sobre as secreções de LH e PRL. Entretanto, pelo fato de produzirem três peptídeos com efeitos celulares distintos é provável que os neurônios KNDy apresentem múltiplos efeitos neuroendócrinos. Contudo, como estes efeitos são integrados no hipotálamo e quais os principais impactos reprodutivos da perda desta população neuronal ainda permanecem pouco entendidos. Neste estudo, investigamos de forma integrada nos mesmos animais os efeitos da perda seletiva dos neurônios KNDy sobre a atividade do eixo HPG e do eixo neuroendócrino da PRL em ratas.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Este trabalho teve por objetivo determinar de forma integrada os efeitos da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy sobre a função do eixo HPG e regulação estrogênica da secreção de LH e PRL em ratas.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy com NK3-SAP sobre a função do ovariana de ratas.
2. Avaliar o efeito da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy sobre a secreção de LH e PRL em ratas OVX+E2.
3. Avaliar o efeito da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy sobre a secreção de LH em ratas OVX.
4. Avaliar o efeito da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy sobre a atividade enzimática dos neurônios TIDA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratas Wistar adultas pesando entre 220 e 260 g provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG) foram mantidas em gaiolas coletivas de polipropileno (39 x 32 x 17 cm), à temperatura de 22 °C, luz controlada (12:00 h claro / 12:00 h escuro), com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA N° 83/2014).

Planejamento experimental

Efeito da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy sobre a atividade ovariana e a regulação das secreções de LH e PRL em diferentes condições estrogênicas em ratas

Sabe-se que os neurônios KNDy expressam ERs (Smith, Cunningham et al. 2005), apresentam comunicação direta com neurônios chave dos eixos HPG (Kinoshita, Tsukamura et al. 2005, Clarkson and Herbison 2006) e também participam do controle

neuroendócrino da secreção de PRL (Szawka, Ribeiro et al. 2010). Assim, esses neurônios são potenciais integradores hipotalâmicos da regulação estrogênica de processos reprodutivos, tais como a secreção de LH e PRL e a atividade ovariana. Embora o papel dos neurônios KNDy no *feedback* negativo do E2 seja bem estabelecido na literatura, é necessário elucidar sua função no controle da secreção basal de LH (Helena, Toporikova et al. 2015, Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016), bem como o seu envolvimento nos picos pré-ovulatórios de LH e PRL induzidos por E2 (Mittelman-Smith, Williams et al. 2012, Helena, Toporikova et al. 2015, Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016, Stathopoulos, Helena et al. 2016). Adicionalmente, é necessário investigar melhor os efeitos da perda desses neurônios sobre a função ovariana e reprodutiva em ratas (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Desse modo, este trabalho avaliou de forma integrada os efeitos da lesão neuroquímica dos neurônios KNDy sobre a função gonadal e a regulação estrogênica da secreção de LH e PRL no modelo de ratas OVX e OVX+E2, a fim de investigar o envolvimento destes neurônios no *feedback* positivo e negativo do E2 sobre o LH e nos mecanismos neuroendócrinos que desencadeiam o pico de PRL induzido por E2.

Ratas Wistar com ciclo estral regular receberam injeções estereotáxicas intra-ARC de NK3-SAP (NK3-SAP; n = 5) ou veículo (Veh; n = 6). Após a cirurgia estereotáxica, o ciclo estral foi monitorado diariamente durante 21 dias e, em seguida, as ratas foram OVX. Os ovários foram coletados e processados para análise histológica. Os animais foram tratados com cipionato de E2 (modelo OVX+E2; 10 µg/0.2 mL/rata/dia, subcutâneo, Pfizer, diluído em óleo de milho). Esse tratamento hormonal com cipionato de E2 é capaz de produzir níveis plasmáticos fisiológicos de 17β-E2 (Szawka, Rodovalho et al. 2009). O tratamento foi realizado por três dias e no quarto dia, amostras de sangue foram colhidas pela cauda a cada 30 minutos das 13:00 h às 19:00 h para análise hormonal. Após 6 dias, iniciou-se o tratamento das ratas com óleo de milho por três dias (modelo OVX). No quarto dia após início do tratamento e, portanto, décimo dia após experimento no modelo OVX+E2, amostras de sangue foram obtidas novamente pela cauda nos mesmos horários da coleta anterior para realização da análise hormonal. Logo após a última coleta, os animais foram anestesiados, perfundidos transcardiacamente e os cérebros coletados para análise imunohistoquímica de kisspeptina, TH e pTH. O desenho experimental está esquematizado na figura 1A.

Cirurgias e drogas

Uma solução de xilazina [10 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)] e cetamina (cloridrato de cetamina; 80 mg/kg, i.p.) foi administrada antes da cirurgia estereotáxica como anestésico e analgésico geral. Uma injeção local de 0,2 mL de lidocaína (cloridrato de lidocaína 2%) foi utilizada como anestésico local e vasoconstritor. Como anti-inflamatório foi usado injeção subcutânea (s.c.) de bananine (flunixin meglumina 2,5 mg/kg, s.c.). Para o tratamento antimicrobiano, pentabiótico intramuscular (benzilpenicilina benzatina, procaína, potássica e sulfato de estreptomicina 55,3%; 24.000 UI/kg, i.m.) foi aplicado. Os animais anestesiados foram colocados no aparato estereotáxico e receberam 2 injeções bilaterais de NK3-SAP (10 ng/100 nL/injeção; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016) ou tampão fosfato salina (PBS; 0,14 M cloreto de sódio; 0,003 M cloreto de potássio; 0,002 M fosfato de potássio; 0,01 M fosfato de sódio; pH 7,4). As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram: 2,4 e 3,5 mm posterior ao bregma; $\pm$ 0,5 mm lateral a partir do seio venoso; 9,7 mm de profundidade ventral a partir da superfície do crânio; com a barra de incisivo em -3.3 mm (Paxinos and Watson 2009). O sistema de microinjeção foi constituído de uma agulha gengival 30 G 0,3 x 144 mm (INJECTA, Ibiporã, PR, Brasil) adaptada e conectada a um tubo de polietileno inserido em uma seringa Hamilton de 10 μ L acoplada a uma bomba microinjeção digital (kdScientific, Holliston, MA, U.S.A.). Após as injeções, a agulha permaneceu no local por 1 minuto para prevenir o refluxo da solução. Após esse tempo, a agulha foi removida e a incisão na pele foi suturada.

Após 21 dias de realização da cirurgia estereotáxica, foi realizada a ovariectomia dos animais sob o mesmo protocolo de anestesia, analgesia e tratamento antimicrobiano. Os animais passaram por incisões bilaterais na pele e no tecido muscular. Os ovários foram removidos após o clampeamento das extremidades coronais dos cornos uterinos. As incisões na pele e no músculo foram suturadas.

Ao final da última coleta de sangue realizada às 19:00 h do último dia de experimento, os animais receberam uma *overdose* de anestésico (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg, i.p.) e foram perfundidos através da artéria aorta ascendente com 50 mL de PBS heparinizado (0,01 M PBS, 5 UI/mL heparina) seguido de 400 mL de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (PB; 0.1 M, pH 7,4), ambos à temperatura ambiente.

Citologia vaginal

Para o acompanhamento do ciclo estral, foram feitas colheitas diárias de secreção vaginal em solução fisiológica. As amostras foram observadas ao microscópio óptico no aumento de 10x e discriminadas de acordo a predominância dos diferentes tipos celulares. Amostras com predominância de leucócitos, células nucleadas e células cornificadas foram classificadas como as fases de diestro, proestro e estro, respectivamente. (Freeman 2006).

Histologia ovariana

Os ovários foram coletados e fixados inteiros em solução de PFA 8% por no mínimo 24 h. Em seguida foi realizada a pós-fixação em PFA 4% durante 10 minutos. O processamento para desidratação do tecido foi realizado em álcool 70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II e a diafanização em soluções de xilol I e II, subsequentemente, com duração de 10 minutos em cada etapa. Em seguida, o tecido foi submetido a três banhos de parafina com temperatura entre 59 – 62 °C, e duração de 30 minutos cada um. Posteriormente, os ovários foram emblocados em parafina para posterior realização dos cortes histológicos em micrótomo. Um ovário aleatório de cada animal foi seccionado por inteiro a uma espessura de 7 µm com auxílio de um micrótomo manual (Leica RM2125, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Uma a cada dez secções foi corada com hematoxilina e eosina e analisada ao microscópio óptico com câmera acoplada (Axiovision 3.1, Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) nas objetivas de 20x e 40x. Foram quantificados corpos lúteos, folículos saudáveis e atresícos em toda a área das secções (Yoshida, Sanbuisso et al. 2009). Folículos saudáveis foram classificados em primordiais, pequenos (< 50 µm), médios (50 - 170 µm) e grandes (> 170 µm) (Pedersen and Peters 1968). Os nucléolos e núcleos foram usados como referência para contagem, a fim de evitar duplicação. A quantificação de folículos primordiais e pequenos foi normalizada por um fator de correção de 10x de acordo com o espaçamento entre as secções analisadas (Tilly 2003).

Tratamentos hormonais

Em duas ocasiões distintas, cada rata OVX recebeu tratamentos diários com cipionato de E2 (10 µg/0,2 mL por rata, s.c.; Pfizer) ou óleo de milho (0,2 mL por rata)

durante 3 dias pela manhã e as coletas de sangue foram realizadas no quarto dia após o início do tratamento. Esse regime de tratamento de E2 é capaz de produzir níveis plasmáticos fisiológicos de 17β -E2 e induzir picos de LH e PRL similares aos que ocorrem naturalmente na tarde do proestro (Szawka, Rodovalho et al. 2009, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2016, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017).

Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para LH e PRL

Para avaliação da secreção de LH e PRL foi utilizado o método de coleta de sangue pela cauda da rata, como descrito previamente pelo nosso laboratório (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017). Os animais foram treinados diariamente, a partir do primeiro dia de experimento. Durante o treinamento, grupos de 4–5 ratas foram mantidas em suas respectivas caixas coletivas habituais e movidas para uma caixa idêntica ao lado uma a uma por um único experimentador, o qual envolveu o animal em uma toalha para simular a ordenha pela cauda. As ratas foram transferidas para a sala de experimentos uma semana antes da realização das coletas. No momento de cada coleta, o mesmo procedimento foi repetido, porém acrescentando um pequeno corte na ponta da cauda utilizando uma tesoura esterilizada. Foram coletadas amostras de sangue com volume de 10 μ L, das 13:00 h às 19:00 h com intervalos de 30 minutos, totalizando 13 amostras. As amostras de sangue foram imediatamente diluídas em PBS com tween 20 (PBS-T) em diluição de 20 vezes, congeladas em gelo seco e então transferidas para um freezer a -20°C .

As amostras de sangue total foram processadas por ensaio de ELISA sanduíche para quantificação dos níveis plasmáticos de LH e PRL, seguindo o método descrito anteriormente (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017, Silva, Henriques et al. 2020). Para o ensaio de ELISA de LH, foram pipetados 50 μ L de anticorpo monoclonal anti-LH- β bovino (518B7, UC Davis; RRID: AB_2756886; diluição 1:2.500) como anticorpo de captura primário em cada poço de placas de 96 poços (9018, Corning, Kennebunk, ME, EUA), as quais foram incubadas à 4°C *overnight*. O anticorpo de captura foi decantado e os poços foram incubados com 200 μ L de tampão de bloqueio (leite desnatado 5 % em PBS-T) por 2 h à temperatura ambiente. A curva padrão foi preparada previamente usando uma diluição seriada de duas vezes de LH RP-3 de rato [AFP718B, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program (NIDDK-NHPP)] em 0,2% de albumina de soro bovino PBS-T. Os poços foram incubados com 50 μ L de amostras de sangue total em uma diluição de 1:20 à temperatura

ambiente por 24 h. As placas foram lavadas e os poços incubados com 50 µL de anticorpo de detecção policlonal de coelho anti-LH de rato (AFP240580Rb, NIDDK-NHPP; diluição 1:40.000) como anticorpo de detecção por 24 h à 4 °C. O ELISA de PRL foi realizado seguindo os mesmos passos descritos acima, exceto pela utilização de anticorpo de captura produzido em cobaia anti-PRL de rato (AFP65191, NIDDK-NHPP; RRID: AB_2756841; diluição 1:1.500), do anticorpo policlonal de coelho anti-PRL de rato (AFP131581570, NIDDK-NHPP; RRID: AB_2722653; diluição 1:70.000) como anticorpo de detecção. A curva padrão foi preparada previamente usando uma diluição seriada de duas vezes de PRL PR-3 de rato (AFP-4459B, NIDDK-NHPP). Em ambos os ensaios, anticorpo de cabra anti-imunoglobulina-G de coelho (anti-IgG; P044801-2, Dako Pathology Solutions, EUA; RRID: AB_2617138; diluição 1:2.000) foi usado como anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Após uma lavagem final, os poços foram incubados com 100 µL de o-fenilendiamina (P1526, Sigma-Aldrich; 2 mg/mL), diluída em tampão citrato-fosfato, com pH 5,0, contendo 0,02% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 45 minutos à temperatura ambiente. Essa reação foi parada com 50 µL de ácido clorídrico (HCl, 3 M). Em ambos os ensaios hormonais, a leitura das placas foi feita em um comprimento de onda de 490 nm para determinação da absorbância e de 650 nm para determinação de correção de fundo usando leitor de placa espectrofotômetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). As amostras testadas para o mesmo hormônio foram processadas em um mesmo ensaio para minimizar a variação. As concentrações hormonais foram produtos da interpolação entre densidade óptica de amostra e da regressão não linear de suas respectivas curvas padrão. A sensibilidade dos ensaios de PRL e LH foi de 0,20 e 0,07 ng/mL respectivamente.

Processamento dos cérebros

Os cérebros perfundidos foram coletados, pós-fixados em PFA 4% por 2 h à 4 °C e em seguida crioprotégidos em sacarose 30%. Os tecidos permaneceram nessa última solução até alcançarem a saturação, que foi constatada quando os cérebros se encontravam precipitados no fundo do recipiente, processo que durou aproximadamente 48 h. Em seguida, os cérebros foram congelados em isopentano 99%, à uma temperatura entre -40 e -50 °C, durante 60 segundos. Depois de congelados, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até a realização da microtomia. Em um criostato, fatias de 30 µm, entre as coordenadas 0,48 e 0,72 mm posteriores ao bregma (Paxinos and

Watson 2009), foram seccionadas e separadas em quatro séries de secções. As secções foram mantidas em solução crioprotetora à -20 °C (Watson Jr, Wiegand et al. 1986) até a realização dos ensaios descritos a seguir.

Imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados usando o método de flutuação livre descrito previamente (Araujo-Lopes, Crampton et al. 2014, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2016). Entre cada passo do processo, as secções foram lavadas em PBS, exceto quando mencionada uma solução diferente. Todos os passos foram realizados à temperatura ambiente, exceto quando mencionado outra temperatura em algum determinado momento. Os anticorpos primário e secundário foram diluídos em PBS contendo Triton X-100 0,3 % (TX-100) e albumina bovina 1 % (BSA). O primeiro passo consistiu na lavagem dos cortes que foi realizada dez vezes por 6 minutos cada para remoção da solução crioprotetora.

Para a marcação de kisspeptina, uma série de cortes do ARC foi processada segundo os passos descritos previamente (Szawka, Ribeiro et al. 2010). Após a lavagem inicial mencionada acima, as secções passaram por uma lavagem com glicina 0,1 M por 10 minutos, com o objetivo de expor os sítios antigênicos que podem ocasionalmente ser mascarados pela fixação com PFA 4%, e posteriormente incubadas com TX-100 0,4% por 30 minutos. O TX-100 atua permeabilizando a membrana celular, o que possibilita a posterior difusão dos anticorpos. Foi realizada a incubação das secções com peróxido de hidrogênio 1% por um período de 30 minutos, a fim de inativar as peroxidases endógenas do tecido. As secções foram incubadas por 1 h com BSA 3%, para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário a serem utilizados. Os cortes foram incubados em um anticorpo primário anti-kisspeptina-10 de camundongo produzido em coelho (A.C. 564; diluição 1:30.000) por 1 h à temperatura ambiente e em seguida passaram 47 h à temperatura de 4 °C. As secções foram incubadas em anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotilado produzido em cavalo (BA-1100; diluição 1:2.000; Vector Laboratories) por 2 h. Como ligante para o anticorpo secundário, foi utilizado uma incubação em um complexo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories; diluição 1:400) por 1 h seguido de lavagem em PBS e lavagem em solução Tris-HCl. Como cromógeno, foi utilizado uma solução de Ni-DAB-HCl peroxidase (Ni, 25 mg/mL; DAB, 0,2 mg/mL; H₂O₂, 0,03%) por 20 minutos. Essa reação foi parada

através de lavagem com tris-HCl seguida de lavagem com PBS. Os cortes foram montados sobre lâminas gelatinizadas que passaram por um processo de secagem natural por 24 h. Em seguida, as lâminas foram hidratadas com água destilada e desidratadas com álcoois em concentrações crescentes. As lâminas foram diafanizadas em xilol e, ao final do processo, os cortes foram protegidos por uma lamínula colada com Entellan (Merck).

A dupla-marcação para TH e TH fosforilada na serina 40 (S⁴⁰pTH) foi realizada como descrito previamente (Silva, Aquino et al. , Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017). Uma série de cortes do ARC passou pela lavagem inicial com PBS seguida de uma lavagem com boridreto de sódio 0,1 M. Os cortes foram incubados em solução TX-100 0,4% por 30 minutos e em BSA 3% por 1 h. Em seguida, foram incubados em um coquetel de anticorpo primário de coelho anti-S⁴⁰pTH de rato (36-8600; Zymed Laboratories; Invitrogen, Camarillo, CA, USA; diluição 1:10.000) e anticorpo primário de camundongo anti-TH de rato (T1299, Sigma-Aldrich; diluição 1:10.000) por 48 h à 4 °C. Os anticorpos secundários fluorescentes anti-IgG de coelho produzido em burro (IgG 488-coupled, Molecular Probes, Eugene, OR, USA; diluição 1:1.000) e anti-IgG de camundongo produzido em cabra (IgG 568-coupled, Alexa Fluor, Molecular Probes; diluição 1:1.000) foram incubados por 2 h na ausência de luz. Os cortes passaram por uma lavagem final e foram montados sobre lâminas gelatinizadas que passaram por um processo de secagem natural por 24 h. Em seguida, as lâminas foram hidratadas com água destilada e desidratadas com álcoois em concentrações crescentes. As lâminas foram diafanizadas em xilol, preservadas por uma lamínula colada com Kristalon e mantidas em uma caixa protegida da luz.

Obtenção e análise das imagens das secções cerebrais

Fotomicrografias bilaterais de cerca de 4 secções de ARC foram adquiridas utilizando a objetiva de 20x de um microscópio óptico acoplado a um sistema de câmera digital (AxioCam MRC e Axiovision SE64, Zeiss) para análise do número de neurônios imunorreativos para kisspeptina no ARC. Esses neurônios foram identificados pelos corpos neuronais corados em preto. Esses corpos foram detectados e contabilizados bilateralmente em cada secção de forma automática usando as ferramentas de análise e contagem de partículas de acordo com a circularidade do programa Image J (ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Essa análise automática foi conferida e corrigida à medida que o observador identificava artefatos nas secções sem

conhecimento prévio dos grupos experimentais. As secções de ARC com dupla marcação para TH e S⁴⁰pTH foram fotomicrografadas bilateralmente utilizando a objetiva de 20x de um microscópio fluorescente (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) acoplado a um sistema de câmera digital (AxioCam MRC e Axiovision SE64, Zeiss), em uma sala escura. Os neurônios imunorreativos à TH foram quantificados bilateralmente em cerca de 4 secções de ARC. Fotomicrografias de cerca de 2 secções da região da EM do ARC foram usadas para a análise da imunorreatividade à TH e S⁴⁰pTH nos terminais dos neurônios TIDA. Para tanto, uma região de interesse (ROI) de 280 x 140 µm foi delimitada na camada externa da EM. A densidade óptica integrada (IOD) de S⁴⁰pTH e TH, delimitada por esse ROI, foi quantificada através do programa ImageJ (ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Os valores de IOD de TH, S⁴⁰pTH e da razão de S⁴⁰pTH por TH (S⁴⁰pTH/TH) foram normalizados como porcentagens do grupo controle Veh (Considerado 100%).

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados com GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, EUA). Quando necessário, os dados foram transformados em escala logarítmica antes das análises para corrigir a heterogeneidade das variâncias. Os dados de ovário e de imunohistoquímica foram analisados por teste *t* de Student. Para comparações de peso corporal e frequências de ciclo estral, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias. Para as análises hormonais de comparação de dados ao longo da escala de tempo dentro do mesmo grupo foi utilizada ANOVA de uma para medidas repetidas. No caso de comparação entre grupos ao longo do tempo, utilizamos ANOVA de duas vias. As respostas hormonais integradas foram expressas como área sob a curva (AUC) e comparadas usando ANOVA de duas vias ou teste *t* de Student. Em todos os casos, ANOVA foi seguida do pós-teste de Holm-Sidak. Para comparação das proporções de animais que apresentaram picos hormonal em categorias de tempo, foi utilizado o teste de Chi-quadrado. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

Lesão neuroquímica seletiva para neurônios KNDy

Para avaliar a extensão da lesão neuroquímica de neurônios KNDy por injeção de NK3-SAP, realizamos a marcação de cortes do ARC para kisspeptina. Sete semanas após as injeções intra-ARC de NK3-SAP ou Veh, as ratas NK3-SAP apresentaram redução média de dois terços no número de neurônios imunorreativos à kisspeptina no ARC em relação às ratas Veh ($t_9 = 6,7$, $P < 0,001$, Fig. 1D), como determinado pelo teste t de Student. Desse modo, esse resultado indica uma lesão neuroquímica seletiva de aproximadamente 66% dos neurônios KNDy.

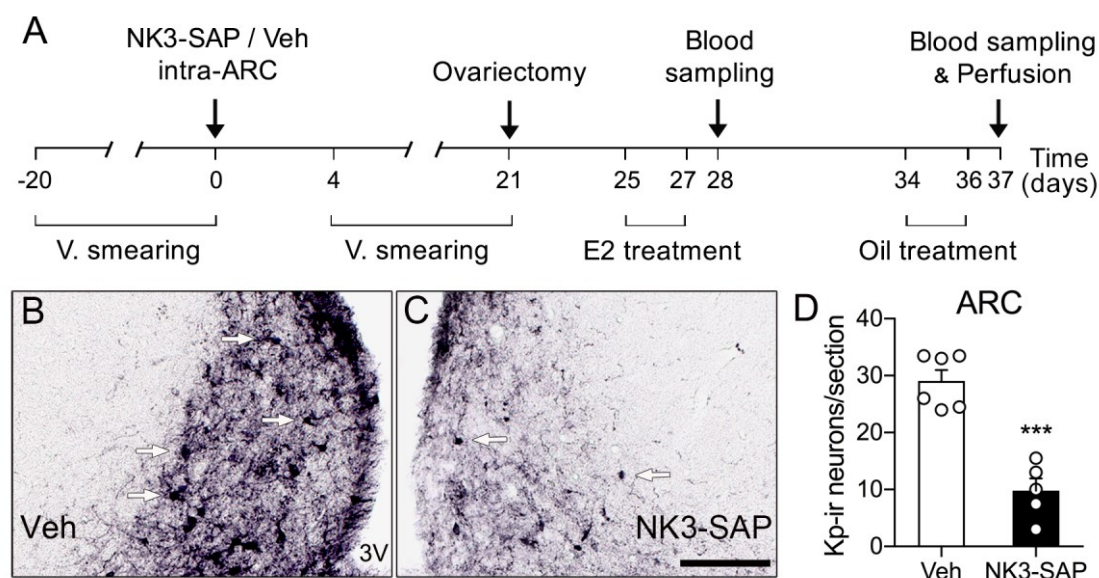


Figura 1: Lesão neuroquímica seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy). (A) Linha do tempo experimental. O esfregaço vaginal (*V. smearing*) foi realizado 3 semanas antes e 3 semanas depois das injeções (dia 0) de um agonista do receptor 3 de neurocinina B conjugado a saporina (NK3-SAP, $n = 5$) ou veículo (Veh, $n = 6$) no núcleo arqueado (ARC). Os animais foram ovariectomizados (Ovariectomy) no dia 21 e receberam reposição de cipionato de estradiol (E2) por três dias (dias 25-27) antes da coleta de sangue (dia 28). Em seguida, os animais receberam tratamento com óleo de milho por três dias (dias 34-36) antes da segunda coleta de sangue, eutanásia e perfusão (dia 37). (B-C) Imagens representativas mostrando neurônios kisspeptinérgicos indicados por setas no ARC. (D) Média $\pm$ SEM do número de neurônios imunorreativos para kisspeptina (Kp-ir) por secção no ARC. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh, determinado por teste t de Student. 3V, terceiro ventrículo. Escala, 100 μ m.

Efeito da lesão dos neurônios KNDy no peso corporal e na ciclicidade estral

O peso corporal foi monitorado semanalmente durante o experimento. Entre 7 e 35 dias após a injeção intra-ARC, o grupo NK3-SAP apresentou menor peso corporal em comparação ao grupo Veh ($F_{1,90} = 12,4$, $P < 0,001$) como determinado por ANOVA de

duas vias (Fig. 2A). Pelo fato do principal efeito da lesão dos neurônios KNDy ocorrer no eixo reprodutivo (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016), nosso trabalho avaliou também a função gonadal desses animais. Como apresentado na figura 2B e C, as ratas NK3-SAP apresentaram ciclos irregulares com uma redução na frequência de proestros em comparação ao período antes da lesão ($F_{1,20} = 26,6$; $P < 0,05$) e uma pronunciada redução na ocorrência de estros em relação ao período anterior ($F_{1,20} = 19,2$; $P < 0,05$) e ao grupo Veh ($F_{1,20} = 14,9$; $P < 0,05$). O grupo NK3-SAP também apresentou aumento na frequência de diestros em relação ao período anterior ($F_{1,20} = 36,7$; $P < 0,001$) e ao grupo Veh ($F_{1,20} = 12,3$; $P < 0,05$). Por sua vez, os pesos ovarianos dos grupos NK3-SAP e Veh foram similares (Fig. 2D). Esses resultados demonstram que a perda substancial de neurônios KNDy reduziu o ganho de peso corporal, perturbou a ciclicidade estral, mas não alterou o peso ovariano.

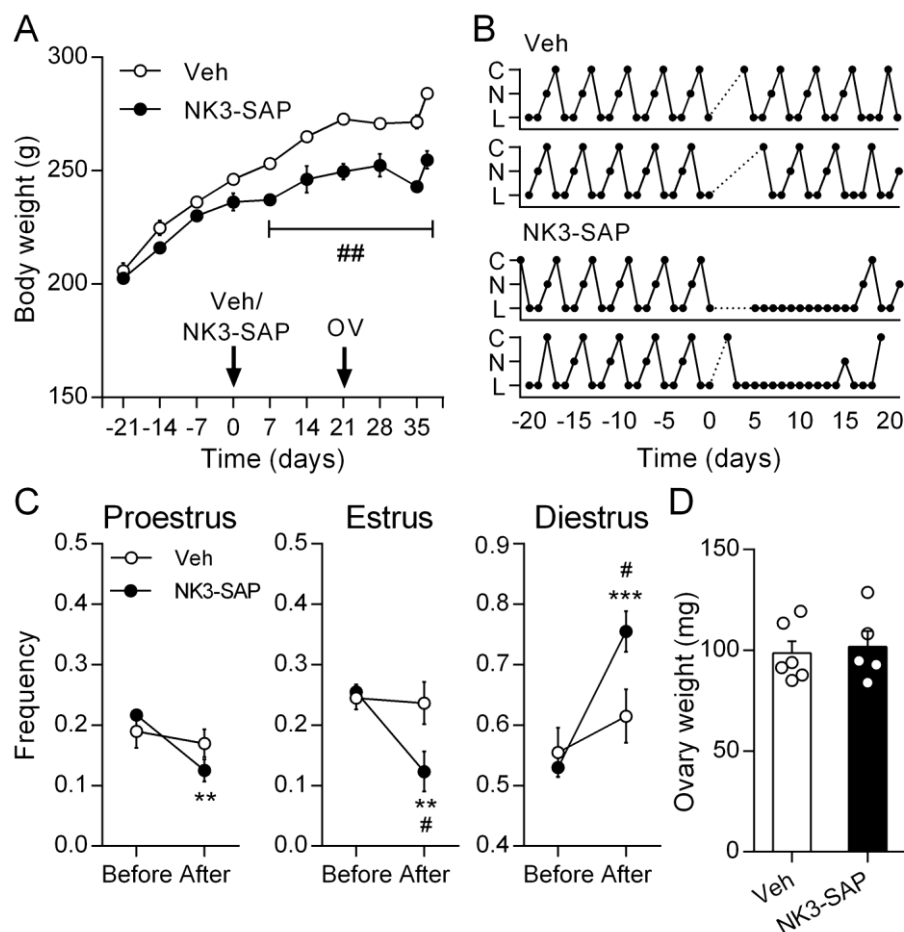


Figura 2: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) reduz o ganho de peso corporal, perturba a ciclicidade estral, mas não altera o peso ovariano. Efeito de injeções intra-núcleo-arqueado de um agonista do receptor 3 de neurocinina B conjugado a saporina (NK3-SAP, n = 5) ou veículo (Veh, n = 6) no peso corporal e na ciclicidade estral. (A)

Medidas semanais de peso corporal. $##P < 0,01$ comparado com grupo Veh, determinado por ANOVA de duas vias. OV, ovariectomia. (B) Ciclos estrais representativos de 20 dias antes e 20 dias depois da injeção de Veh ou NK3-SAP (dia 0). As fases do ciclo estral foram representadas de acordo com as células predominantes na citologia vaginal: células cornificadas (C) para estro, células nucleadas (N) para proestro e leucócitos (L) para metaestro e diestro. (C) Frequência de dias em proestro, estro e diestro antes e depois da injeção. $***P < 0,001$, $**P < 0,01$ comparado com antes. $\#P < 0,001$ comparado com grupo Veh. Determinado por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Holm-Sidak. (D) Peso ovariano 21 dias após as injeções intra-ARC. Dados representados como média $\pm$ SEM.

Efeito da lesão dos neurônios KNDy na função ovariana

Relatos prévios da literatura demonstram que a lesão dos neurônios KNDy causa aumento do número de folículos atrésicos, redução do número de corpos lúteos, mas não altera o número de folículos saudáveis no ovário (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Neste trabalho, reavaliamos a resposta ovariana em ratas a fim de aprofundar a investigação do impacto da perda de neurônios KNDy sobre a função gonadal, a qual pode ser diretamente associada à irregularidade estral. Para tal, realizamos o processamento do ovário para posterior análise histológica dos folículos ovarianos. Não foram observadas alterações no número de folículos primordiais, médios e grandes entres os grupos NK3-SAP e Veh. Entretanto, houve uma diminuição no número de folículos pequenos no grupo NK3-SAP ($t_8 = 3,0$, $P < 0,05$, Fig. 3G). Nossos dados mostram que a lesão dos neurônios KNDy pela NK3-SAP causou um aumento no número de folículos atrésicos ($t_8 = 2,6$, $P < 0,05$, Fig. 3H), mas não afetou o número de corpos lúteos (Fig. 3I). Vale notar que, portanto, apesar da irregularidade de ciclo induzida pela lesão dos neurônios KNDy, não houve evidência de redução da ovulação, pelo fato do número de corpos lúteos não diferir entre os grupos. Esses dados demonstram que a perda substancial dos neurônios KNDy aumenta a atresia folicular, diminui folículos pequenos saudáveis, mas não afeta a ovulação.

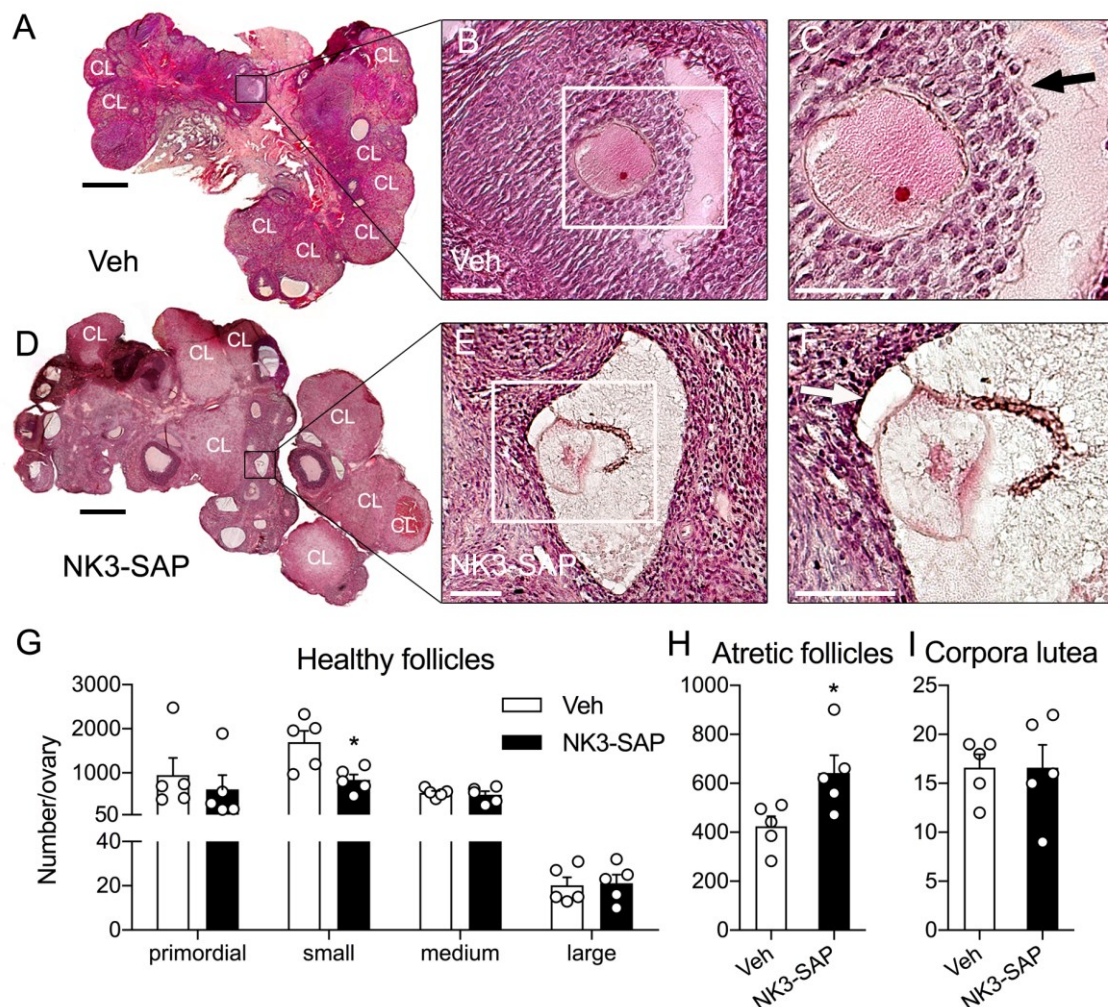


Figura 3: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) aumenta o número de folículos atrésicos, diminui o número de folículos saudáveis pequenos, mas não altera o número de corpos lúteos. Efeito de injeções intra-núcleo-arqueado de um agonista do receptor 3 de neurocinina B conjugado a saporina (NK3-SAP, n = 5) ou veículo (Veh, n = 6) na morfologia ovariana. (A) Visão panorâmica de uma secção ovariana corada com hematoxilina-eosina representativa do grupo Veh, indicando corpos lúteos (CL) e com foco para um folículo saudável (quadrado preto). Escala, 500 μ m. (B-C) Folículo saudável grande com foco nas células da granulosa intactas (seta preta) e no oócito. Escala, 50 μ m. (D) Visão panorâmica de uma secção ovariana corada representativa do grupo NK3-SAP, indicando CL e com foco em um folículo atrésico (quadrado preto). Escala, 500 μ m. (E-F) Folículo atrésico com foco na ausência de células da granulosa adjacentes à lâmina basal (seta branca) e oócito degenerado. Escala, 50 μ m. (G) Número de folículos primordiais, pequenos (< 50 μ m), médios (50-170 μ m) e grandes (> 170 μ m). (H) Número de folículos atrésicos. (I) Número de corpos lúteos. * $P < 0,05$ comparado com grupo Veh, determinado por teste t de Student. Os folículos e CL foram contados por ovários em cada animal. Dados representados como média $\pm$ SEM.

Efeito da lesão dos neurônios KNDy na regulação estrogênica da secreção de LH

Foi demonstrado em trabalhos prévios de outros grupos, que a lesão neuroquímica dos neurônios KNDy amplifica a secreção de pico de LH induzida por E2, enquanto que

em alguns experimentos diminui e em outros não altera a secreção basal de LH (Mittelman-Smith, Williams et al. 2012, Helena, Toporikova et al. 2015, Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Assim, como a análise dos ovários revelou que os animais NK3-SAP foram capazes de ovular, apesar da irregularidade de ciclo estral, o próximo passo foi investigar se a perda de neurônios KNDy poderia alterar o pico pré-ovulatório de LH induzido por E2. Modelos já estabelecidos de ovariectomia e reposição hormonal com E2 (OVX+E2) ou óleo (OVX) foram usados para testar o efeito da perda de neurônios KNDy sobre os picos das secreções de LH (Poletini, Szawka et al. 2004, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2016). A figura 4 mostra o efeito da lesão seletiva dos neurônios KNDy sobre o pico de secreção de LH induzida por E2, que mimetiza o pico pré-ovulatório de LH, e sobre a secreção basal desse hormônio na ausência de influência estrogênica. No modelo OVX+E2, em comparação aos valores à 13:00 h, as concentrações plasmáticas de LH no grupo NK3-SAP aumentaram linearmente a partir de 15:30 h, alcançaram valores médios de pico às 18:00 h, e permaneceram elevadas às 19:00 h ($F_{12,48} = 15,1$, $P < 0,001$, Fig. 4A). Os níveis de LH do grupo Veh aumentaram a partir de 16:00 h, atingiram valores médios de pico às 18:30 h e mantiveram-se elevados às 19:00 h ($F_{12,60} = 15,0$, $P < 0,001$ Fig. 4A). Como confirmado por ANOVA de duas vias, os níveis de LH das ratas NK3-SAP foram significativamente maiores que os das ratas Veh ($F_{1,117} = 33,8$, $P < 0,001$, Fig. 4A), o que está associado ao maior nível máximo de LH do grupo NK3-SAP comparado ao grupo Veh ($t_9 = 2,5$, $P < 0,05$, Fig. 4B). Adicionalmente, um efeito pôde também ser observado no tempo no qual os animais alcançaram o pico de LH. Uma proporção de 4 em 5 ratas do grupo NK3-SAP alcançou o valor de pico de LH até às 18:00 h em contraste com uma proporção de 1 em 6 ratas do grupo Veh. Assim, como determinado pelo teste de Chi-quadrado, a frequência de ocorrência do pico de LH até as 18:00 h foi maior nas ratas NK3-SAP ($\chi^2_1 = 4,4$, $P < 0,05$, Fig. 4C). Por outro lado, na ausência de E2, no modelo de ratas OVX, os níveis basais de LH foram similares nos animais Veh e NK3-SAP (Fig. 4D). A resposta secretora integrada de LH foi avaliada pela AUC. No período entre 13:00 h e 15:00 h, representando momento de retroalimentação negativa do E2 (Fig. 4A), a AUC foi maior em ambos os grupos NK3-SAP e Veh na condição OVX comparada à OVX+E2 ($F_{1,18} = 41,9$, $P < 0,001$, ANOVA de duas vias; Fig. 4E). Entre 15:00 h e 19:00 h, correspondendo ao período de retroalimentação positiva do E2 (Fig. 4A), a AUC das concentrações de LH das ratas NK3-SAP OVX+E2 foi maior comparada a das ratas Veh OVX+E2 ($F_{1,18} = 6,9$, $P < 0,05$, ANOVA de duas vias; Fig. 4E). Esses resultados demonstram que a perda

seletiva de neurônios KNDy aumentou a magnitude e antecipou o pico de LH induzido por E2, mas não afetou a secreção basal de LH em condição de ausência de E2.

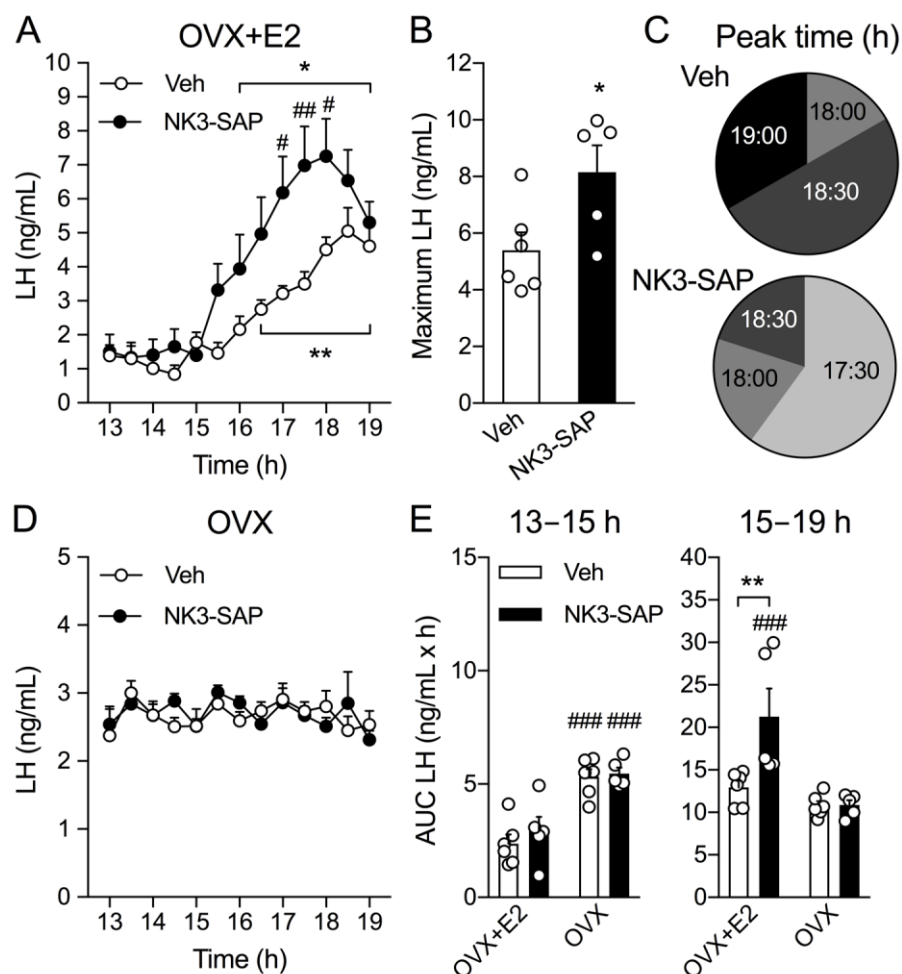


Figura 4: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) amplifica o pico de hormônio luteinizante (LH) induzido por estradiol (E2) mas não afeta a secreção basal de LH na ausência de E2. Efeito de injeções intra-núcleo-arqueado de um agonista do receptor 3 de neurocinina B conjugado a saporina (NK3-SAP, n = 5) ou veículo (Veh, n = 6) na secreção de LH em ratas ovariectomizadas tratadas com E2 (OVX+E2) ou óleo (OVX). (A) Níveis plasmáticos de LH de ratas no modelo OVX+E2. As amostras foram coletadas a cada 30 minutos das 13:00 h às 19:00 h. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparado com 13:30 h no mesmo grupo determinado por ANOVA de uma via para medidas repetidas. ### $P < 0,01$, # $P < 0,05$ comparado com grupo Veh, determinado por ANOVA de duas vias e pós-teste de Holm-Sidak. (B) Nível máximo de LH de animais OVX+E2. * $P < 0,05$ comparado com grupo Veh, determinado por teste t de Student. (C) Distribuição do horário do pico de LH nos grupos NK3-SAP e Veh, $P < 0,05$ determinado pelo teste de chi-quadrado. (D) Níveis plasmáticos de LH de ratas no modelo OVX. Amostras coletadas a cada 30 minutos das 13:00 h às 19:00 h. (E) Área sob a curva (AUC) dos níveis de LH de ratas NK3-SAP e Veh em períodos de retroalimentação negativa (13–15 h) e retroalimentação positiva (15–19h). ** $P < 0,01$ comparado com grupo Veh, determinado por ANOVA de duas vias e pós-teste de Holm-Sidak. #### $P < 0,0001$ OVX versus OVX+E2, determinado por ANOVA de duas vias e pós-teste de Holm-Sidak. Dados representados como média $\pm$ SEM.

Efeito da lesão dos neurônios KNDy na secreção de PRL induzida por E2

Estudos anteriores demonstraram que a lesão dos neurônios KNDy com NK3-SAP resultou em na supressão do pico de PRL induzido por E2 (Stathopoulos, Helena et al. 2016). O efeito da lesão seletiva dos neurônios KNDy sobre a secreção de PRL durante o período da tarde (13:00–19:00 h) no modelo de ratas OVX+E2 está apresentado na figura 5. Ratas Veh OVX+E2 apresentaram um pico de secreção de PRL como esperado. Neste grupo, as concentrações de PRL foram maiores entre às 13:30 h e 15:00 h quando comparadas aos níveis hormonais basais às 13:00 h ($F_{12,60} = 4,3$, $P < 0,001$, ANOVA de uma via para medidas repetidas; Fig. 5A) As concentrações plasmáticas de PRL no grupo NK3-SAP também apresentaram pico induzido por E2, com aumento significativo entre 13:30–14:30 h em relação ao tempo 13:00 h ($F_{12,48} = 3,2$, $P < 0,01$, ANOVA de uma via para medidas repetidas; Fig. 5A). Entretanto, os níveis de PRL das ratas NK3-SAP foram significativamente menores que os das ratas Veh, como determinado por ANOVA de duas vias ($F_{1,117} = 36,7$, $P < 0,001$, Fig. 5A). Ainda, o nível máximo de PRL do grupo NK3-SAP foi menor do que a metade do grupo Veh ($t_9 = 3,2$, $P < 0,05$, teste t de Student; Fig. 5B). Contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada no tempo em que os animais alcançaram o pico de PRL, como determinado por teste de Chi-quadrado (Fig. 5C). A resposta integrada da secreção de PRL, expressa pela AUC, das ratas NK3-SAP também foi reduzida pela metade quando comparada às ratas Veh ($t_9 = 4,2$, $P < 0,01$, Fig. 5D). Dessa forma, nossos resultados nos permitem concluir que a perda seletiva de neurônios KNDy diminui a magnitude do pico de PRL induzido por E2. Amostras de sangue do modelo OVX também foram coletadas e dosadas para PRL por ELISA, porém foram obtidos resultados indetectáveis de PRL sanguínea (dados não exibidos). É esperado concentrações menores de PRL em ratas OVX, devido à ausência do efeito estimulatório do E2 sobre a secreção de PRL (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2016). Assim, os resultados indicam que as concentrações de PRL nas amostras de sangue obtidas na diluição de 1:20 na condição OVX apresentaram-se abaixo do limite de detecção do ensaio.

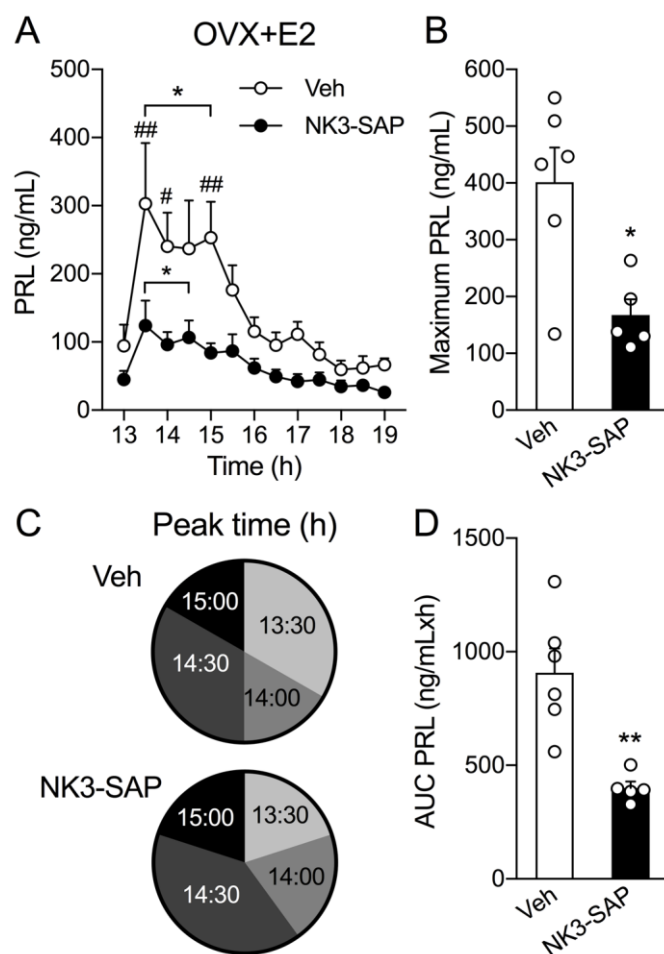


Figura 5: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) reduz o pico de prolactina (PRL) induzido por estradiol (E2). Efeito de injeções intra-núcleo-arqueado de um agonista do receptor 3 de neurocinina B conjugado a saporina (NK3-SAP, n = 5) ou veículo (Veh, n = 6) na secreção de PRL em ratas ovariectomizadas tratadas com E2 (OVX+E2). (A) Níveis plasmáticos de PRL de animais OVX+E2. Amostras coletadas a cada 30 minutos das 13:00 h às 19:00 h. * $P < 0,05$ comparado aos níveis basais do mesmo grupo (13:00 para NK3-SAP e Veh), determinado por ANOVA de uma via para medidas repetidas. ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ comparado com grupo NK3-SAP, determinado por ANOVA de duas vias e pós-teste de Holm-Sidak. (B) Nível máximo de PRL dos animais OVX+E2. * $P < 0,05$ comparado com grupo Veh, determinado por teste t de Student. (C) Distribuição do horário do pico de LH nos grupos NK3-SAP e Veh. (D) Área sob a curva (AUC) dos níveis de PRL dos animais OVX+E2. ** $P < 0,01$ comparado com grupo Veh, determinado por teste t de Student. Dados representados como média $\pm$ SEM.

Efeito da lesão dos neurônios KNDy na atividade enzimática dos neurônios TIDA

Com o propósito de elucidar o mecanismo neuroendócrino envolvido na redução da secreção de PRL após perda seletiva de neurônios KNDy foi realizada uma dupla marcação por imunofluorescência em fatias do ARC e EM para TH e S⁴⁰pTH (Fig. 6). TH

é a enzima limitante na biossíntese de dopamina, e apresenta-se ativada quando na forma fosforilada (Arbogast and Voogt 1996, Liu and Arbogast 2008). Nossos resultados demonstram que a lesão seletiva de neurônios KNDy não alterou o número de neurônios imunorreativos à TH no ARC de ratas NK3-SAP (Fig. 6A–C). Em seguida, para melhor explorar a atividade enzimática nos terminais nervosos dos neurônios TIDA, avaliamos os dados da dupla marcação de imunofluorescência para TH e S⁴⁰pTH na ME. Ao nível da ME, as marcações de TH e S⁴⁰pTH podem refletir melhor a atividade enzimática dos neurônios TIDA, uma vez que a fosforilação da TH ocorre nos terminais nervosos (Fehér, Oláh et al. 2010, Romanò, Yip et al. 2013, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017). Um aumento da imunorreatividade à S⁴⁰pTH foi observado na ME das ratas NK3-SAP comparado ao Veh ($t_9 = 3,2$, $P < 0,05$, teste t de Student; Fig. 6 D, G, J). Enquanto a imunorreatividade para TH não tenha diferido entre os grupos (Fig. 6 E, H, K), a razão S⁴⁰pTH/TH também foi aumentada nas ratas NK3-SAP em relação ao Veh ($t_9 = 2,6$, $P < 0,05$, teste t de Student; Fig. 6 F, I, L). Esses dados demonstram que a perda de neurônios KNDy aumenta a atividade enzimática de terminais dopaminérgicos na ME, os quais são correspondem a população de neurônios TIDA, sendo que esta população recebe projeções de neurônios KNDy e é responsável pela maior parte da descarga dopaminérgica na ME (Ben-Jonathan and Hnasko 2001, Szawka, Ribeiro et al. 2010).

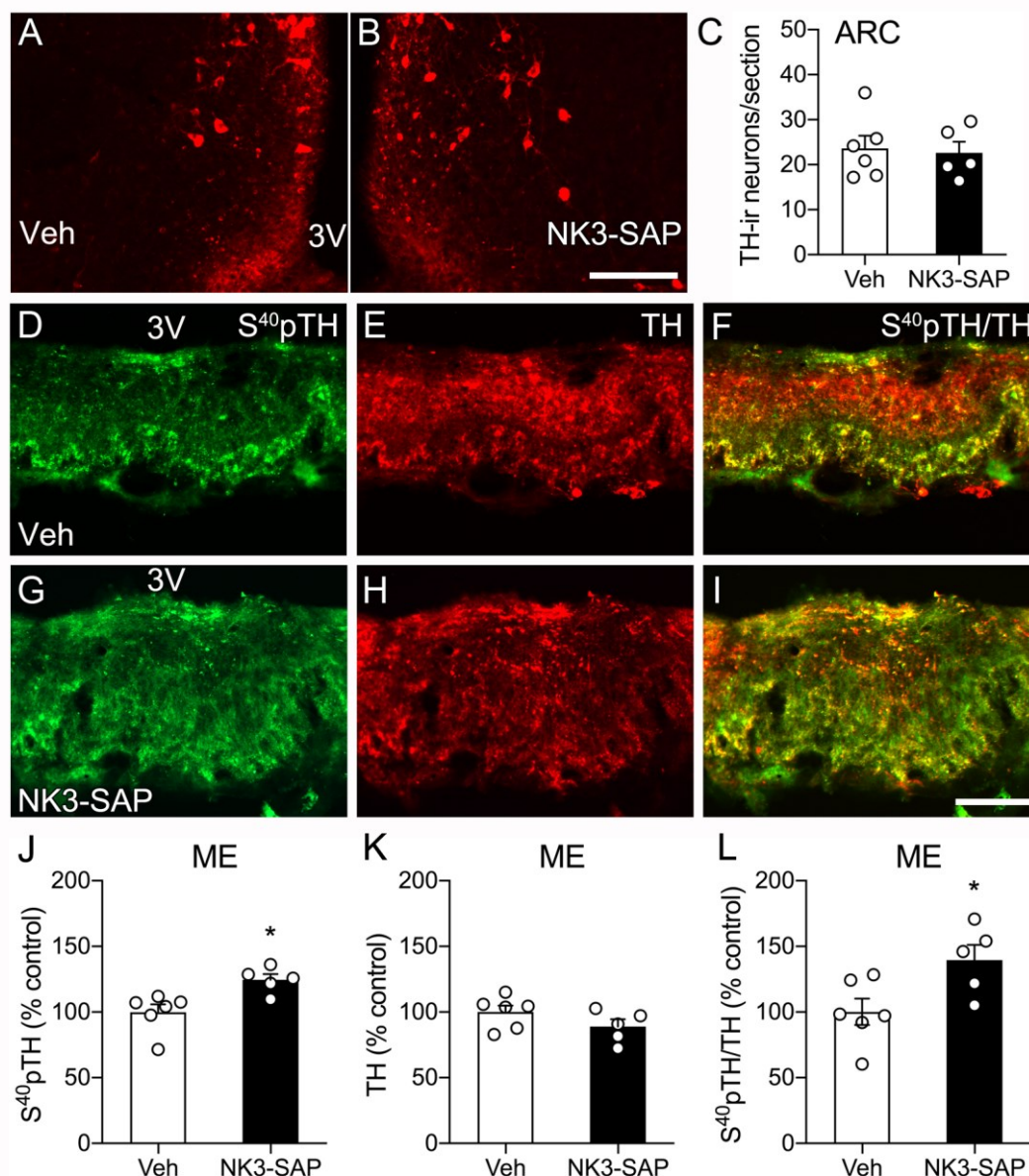


Figura 6: Perda seletiva de neurônios kisspeptina/neurocinina B/dinorfina A (KNDy) aumenta a atividade enzimática de terminais de neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA) na eminência mediana (ME). Efeito de injeções intra-núcleo-arqueado (intra-ARC) de um agonista do receptor 3 de neurocinina B conjugado a saporina (NK3-SAP, $n = 5$) ou veículo (Veh, $n = 6$) na expressão de tirosina hidroxilase (TH) no ARC e na fosforilação de TH na ME. (A-B) Imagens representativas mostrando neurônios positivos para TH no ARC. (C) Número de neurônios imunorreativos para TH (TH-ir) por secção de ARC. (D-F) Imagens representativas de TH Ser40-fosforilado (S⁴⁰pTH), TH e sobreposição de S⁴⁰pTH e TH na ME do grupo Veh. (G-I) Fotomicrografias representativas de S⁴⁰pTH, TH e sobreposição de S⁴⁰pTH e TH na ME do grupo NK3-SAP. (J) Densidade óptica integrada (IOD) de S⁴⁰pTH na ME expressa como porcentagem do controle (Veh considerado como 100%). (K) IOD de TH na ME expresso como porcentagem do controle (Veh considerado como 100%). (L) Razão de IOD de S⁴⁰pTH sobre TH na ME expressa como porcentagem do controle (Veh considerado como 100%). * $P < 0,05$ comparado com grupo Veh, determinado por teste t de Student. 3V, terceiro ventrículo. Escala, 100 μm . Dados representados como média $\pm$ SEM.

5. DISCUSSÃO

Usando um único delineamento experimental em abordagem de estudo cruzado, demonstramos pela primeira vez que a perda de neurônios KNDy altera os picos de LH e PRL induzidos por E2 de modo diferencial, com o envolvimento de neurônios TIDA. As injeções intra-ARC de NK3-SAP induziram uma lesão seletiva de em média 66% de neurônios KNDy. Os primeiros efeitos da lesão dos neurônios KNDy observados foram uma redução de ganho de peso corporal e uma irregularidade do ciclo estral. Apesar da irregularidade estral, o peso ovariano foi similar entre os grupos. Investigando a causa para essa irregularidade ao nível gonadal, foi observado um aumento na atresia folicular, acompanhada de uma diminuição do número de folículos saudáveis pequenos. Contudo, o número similar de corpos lúteos indicou que a ovulação não foi inibida. Uma vez que a ovulação não foi afetada nas ratas NK3-SAP, a próxima etapa foi avaliar a capacidade do eixo HPG de responder a diferentes níveis estrogênicos e induzir pico pré-ovulatório de LH e pico de PRL. Um modelo OVX+E2 foi utilizado para induzir secreções de pico de maneira similar aqueles que naturalmente ocorrem durante a tarde do proestro. Assim, nossos resultados demonstraram que o pico de LH induzido por E2 foi elevado e adiantado em 1 h, ao passo que o pico de PRL foi suprimido, no grupo NK3-SAP. Por sua vez, a secreção basal de LH foi semelhante entre os grupos, apesar do envolvimento dos neurônios KNDy no *feedback* negativo de E2. Tanto as ratas NK3-SAP, como as ratas Veh apresentaram número similar de neurônios ir-TH no ARC, apesar da fosforilação de TH estar elevada na EM das ratas NK3-SAP, o que sugere um aumento na atividade secretória de neurônios TIDA. Coletivamente, essas evidências propõem novos papéis para os neurônios KNDy em ações estrogênicas hipotalâmicas mediando controle negativo e sincronização do pico de LH e estimulando a secreção de PRL via inibição da atividade dos neurônios TIDA. Estas ações indicam papel reprodutivo mais amplo dos neurônios KNDy, abrangendo mais efeitos neuroendócrinos do que o controle da secreção pulsátil de LH, amplamente descrito (Smith, Cunningham et al. 2005, Moore, Coolen et al. 2018, McQuillan, Han et al. 2019, Plant 2019, Herbison 2020).

Sabe-se que a PRL também exerce efeitos na homeostasia de peso corporal (Grattan 2015). Humanos com níveis suprafisiológicos de PRL são predispostos ao ganho de peso e o tratamento com o agonista de dopamina, a bromocriptina, parece reverter esse efeito (Greenman, Tordjman et al. 1998). De forma similar, foi demonstrado que a administração subcutânea ou ICV de PRL aumenta a ingestão calórica e o ganho de peso em ratas (Noel and Woodside 1993). Adicionalmente, a expressão do receptor de PRL foi

encontrada em neurônios POMC e neurônios NPY, os quais estão envolvidos no balanço energético (Chen and Smith 2004, Kokay and Grattan 2005). Neurônios POMC e NPY também recebem projeções de neurônios KNDy e são responsivos à kisspeptina em roedores (Fu and van den Pol 2010, Nestor, Qiu et al. 2016, Higo, Iijima et al. 2017). Interessantemente, camundongos fêmeas, mas não machos, *knockouts* para *kiss1r* apresentam uma disfunção metabólica caracterizada por obesidade e menor consumo calórico (Tolson, Garcia et al. 2014). Isso vai ao encontro de evidências de que o silenciamento de neurônios KNDy provoca obesidade em camundongos fêmeas (Padilla, Perez et al. 2019). Em contraste a estes efeitos metabólicos encontrados em camundongos, em nosso estudo, a perda de neurônios KNDy em ratas induziu uma redução do ganho de peso corporal. Esse efeito pode ser atribuído a supressão da secreção de PRL induzida pela lesão dos neurônios KNDy ou por um desbalanço direto dos neurônios POMC e NPY, devido à perda das projeções dos neurônios KNDy para essas populações. Fatores estes que poderiam operar de forma diferenciada entre camundongos e ratos. De fato, a efetividade da lesão dos neurônios KNDy com NK3-SAP em reduzir o ganho de peso em ratas foi demonstrada anteriormente (Mittelman-Smith, Williams et al. 2012). Contudo, não havia dados mostrando este efeito em ratas intactas e o único estudo avaliando esse parâmetro empregou apenas três pontos de amostragem do peso. No trabalho atual, foram empregados múltiplos pontos de análise, e observamos que a ablação dos neurônios KNDy em ratas provoca redução do ganho de peso antes e após a castração e a reposição hormonal com E2. Futuros estudos deverão avaliar a inter-relação entre os efeitos dos neurônios KNDy no peso corporal e as ações do E2, uma vez que o tratamento com E2 é capaz de sensibilizar o hipotálamo à PRL (Shamgochian, Avakian et al. 1995) e o E2 pode atuar sobre a atividade dos neurônios POMC e NPY, que expressam ER (Sar, Sahu et al. 1990, de Souza, Nasif et al. 2011).

Nossos resultados indicam que a lesão de neurônios KNDy via injeção intra-ARC de NK3-SAP causa irregularidade do ciclo estral e isso pode estar relacionado às ações do E2 mediadas via ativação de ER α expresso nesses neurônios. Trabalho prévio da literatura demonstrou que em camundongas adultas, a deleção seletiva de ER α em neurônios KNDy, utilizando método de CRISPR-Cas9, resulta em irregularidade do ciclo estral, corroborando com os nossos dados (Wang, Vanacker et al. 2019). Apesar da lesão dos neurônios KNDy em nosso estudo ter prolongado as fases de diestro e reduzido a frequência de proestros e estros, a histologia ovariana revelou que não houve supressão da ovulação, uma vez que os corpos lúteos e os folículos saudáveis grandes não foram

afetados pela NK3-SAP. Além disso, a ablação dos neurônios KNDy foi efetiva em diminuir o número de folículos saudáveis pequenos, os quais estão no estágio preantral, não dependendo assim da estimulação gonadotrópica para a sua sobrevivência (Matsuda, Inoue et al. 2012). Dessa forma, a causa da redução do número de folículos preantrais saudáveis, acompanhada pelo aumento da atresia folicular em ratas, com perda de neurônios KNDy, ainda precisa ser elucidada.

Com relação ao aumento de magnitude do pico de LH em ratas NK3-SAP, este pode ser atribuído à perda de *inputs* inibitórios de dinorfina A dos neurônios KNDy para outros neurônios que projetam para os neurônios GnRH, visto que apesar da dinorfina A inibir neurônios GnRH (Goodman, Coolen et al. 2004, Wakabayashi, Nakada et al. 2010, True, Kirigiti et al. 2011, Weems, Witty et al. 2016, Weems, Coolen et al. 2018), estes neurônios não expressam Kor (Mitchell, Prevot et al. 1997). A dinorfina A age preferencialmente através de Kor (Kreek, Schluger et al. 1999) e, além disso, neurônios do ARC e do AVPV expressam somente esta isoforma do receptor (George, Zastawny et al. 1994). De fato, a injeção do antagonista de Kor, nor-BNI, no núcleo AVPV, aumenta o pico de LH induzido por E2 em uma magnitude similar ao pico de LH de ratas com neurônios KNDy lesionados, e esse efeito é revertido pela injeção de dinorfina A no AVPV (Helena, Toporikova et al. 2015). Desse modo, essas evidências suportam parcialmente o modelo que estabelece uma divisão funcional rígida em que os neurônios do AVPV são responsáveis pelo pico de LH, enquanto os neurônios KNDy estão envolvidos com o controle da secreção basal de LH. Por sua vez, nossos dados suportam que neurônios KNDy teriam também um papel na geração do pico de LH, sendo responsáveis por modular sua amplitude e retardar seu horário de ocorrência.

Em contraste com nossos resultados de secreção de LH em baixos níveis de E2, estudos prévios avaliando o efeito de lesão dos neurônios KNDy em ratas OVX encontraram uma redução nas concentrações basais de LH (Mittelman-Smith, Williams et al. 2012, Helena, Toporikova et al. 2015, Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Entretanto, nos estudos Mittelman-Smith et al. (2012; 2016) as colheitas de sangue foram realizadas em um único tempo de amostragem através de punção da veia safena sob anestesia. No trabalho de Helena et al. (2015), as amostras de sangue foram obtidas através de cânula implantada na veia jugular e foram realizadas 5 amostragens em um período de 8 h. Neste estudo, foram encontrados níveis basais de LH de 2,5-2,9 ng/mL no grupo controle e 1,3-1,8 ng/mL no grupo com lesão neuronal, evidenciando uma aparente redução da secreção basal de LH (Helena, Toporikova et al. 2015). Levando

em consideração que a secreção basal de LH é um resultado integrado da liberação pulsátil de LH com uma frequência de 3 pulsos/h em ratas OVX (Herbison 2018), uma flutuação normal dos níveis de LH pode ser detectada quando a amostragem de sangue é feita com múltiplos pontos de coleta. Em estudo prévio de nosso laboratório, amostras coletadas em intervalos de 6 min durante 3 h resultam na detecção de pulsos de LH com níveis variando entre 0,8-2,5 ng/mL em ratas OVX (Silva, Henriques et al. 2020). Assim, a variação de níveis de LH detectados nesse último estudo de perda de neurônios KNDy (Helena, Toporikova et al. 2015) se enquadra na variação normal detectada com amostragem frequente em ratas ovariectomizadas. Isso pode se tornar uma limitação para traçar uma conclusão sobre o efeito da perda de neurônios KNDy nos níveis basais de LH. No presente estudo, tanto as ratas Veh quanto as ratas NK3-SAP apresentaram níveis basais de LH variando entre 2,3-3,0 ng/mL, sem diferença estatística entre os grupos, como resultado de amostragem a cada 30 min das 13:00 h às 19:00 h. A eficiência do modelo de ratas OVX usado é demonstrada pelo aumento dos níveis basais de LH em relação aos mesmos animais na condição de OVX+E2, devido a retirada do efeito de retroalimentação negativa do E2. Ainda, em nosso método de dosagem de LH em sangue colhido da cauda de animais treinados não há efeito de anestesia nem influência de estresses cirúrgico ou hipovolêmicos (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017, Silva, Henriques et al. 2020). Desta forma, nosso método permitiu avaliação temporal mais detalhada em uma abordagem menos invasiva e com mínima interferência na fisiologia dos animais em comparação aos estudos anteriores. De acordo com nossos dados, a perda de 66% de neurônios KNDy não afeta a secreção basal de LH, demonstrando que em condições de perda submáxima destes neurônios, o eixo HPG é capaz de manter a secreção basal de LH em níveis normais. Estes achados são coerentes com a presença de corpus lúteos e, portanto, ocorrência de ovulação, em ratas com lesão dos neurônios KNDy, como relatado neste trabalho e em estudos publicados anteriormente (Mittelman-Smith, Krajewski-Hall et al. 2016). Todavia, embora não avaliada neste trabalho, é possível que a secreção pulsátil de LH tenha sido alterada pela lesão dos neurônios KNDy, haja vista as substanciais evidências de que estes neurônios constituem o elementos centrais do gerador de pulsos de GnRH (Moore, Coolen et al. 2018, McQuillan, Han et al. 2019, Plant 2019, Herbison 2020).

A lesão dos neurônios KNDy foi efetiva em suprimir o pico de PRL induzido por E2. Este dado é consistente com estudo anterior que reportou atenuação do pico de PRL induzido por E2 em ratas com injeção de NK3-SAP intra-ARC que, todavia, apresentaram

menor perda de neurônios KNDy (Stathopoulos, Helena et al. 2016). No presente estudo, não foi possível detectar os baixos níveis de PRL no sangue total das ratas na condição OVX, devido à ausência do efeito estimulatório do E2 (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2016). Neste caso, as amostras armazenadas em diluição de vinte vezes no tampão do ensaio apresentaram-se abaixo do limite de detecção do ELISA para PRL (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017, Silva, Henriques et al. 2020). Todavia, nossos dados demonstram pela primeira vez que a lesão dos neurônios KNDy aumenta a fosforilação da TH nos terminais de neurônios TIDA na ME. A magnitude reduzida do pico de PRL, combinada ao aumento de fosforilação de TH ao nível da ME, nas ratas NK3-SAP, sugere que os neurônios KNDy regulam negativamente os neurônios TIDA e desta forma reduzem o tônus dopaminérgico inibitório sobre a secreção de PRL. De fato, trabalhos de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa, revelaram que os neurônios TIDA recebem projeções de terminais de neurônios KNDy (Szawka, Ribeiro et al. 2010, Sawai, Iijima et al. 2012, Sawai, Iijima et al. 2014). Apesar da injeção ICV de Kp-10 aumenta a secreção de PRL enquanto inibe a secreção de dopamina pelos neurônios (Szawka, Ribeiro et al. 2010, Ribeiro, Leite et al. 2015, Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017), os neurônios TIDA apresentam baixa expressão de Kiss1r (Aquino, Kokay et al. 2019). Por outro lado, sabidamente, terminais dinorfinérgicos formam sinapses com os neurônios TIDA (Fitzsimmons, Olschowka et al. 1992), sendo que Kor são expressos no ARC, ainda que não tenham sido demonstrados em neurônios TIDA (Stathopoulos, Helena et al. 2016). Assim, é provável que a dinorfina seja o principal peptídeo KNDy responsável pela modulação direta dos neurônios TIDA. Isto é consistente com a maior atividade enzimática nos terminais TIDA após a lesão dos neurônios KNDy, pois o Kor exerce efeito celular inibitório em oposição a ação estimulatória do Kiss1r. Ainda, do ponto de vista de regulação neuroendócrina, é possível haver mudanças funcionais no fenótipo dos neurônios KNDy, que passariam a liberar mais dinorfina do que kisspeptina, quando estimulados por E2, no contato com a pericaria de neurônios TIDA, como visto por um estudo ainda não publicado do nosso grupo de pesquisa (Araujo-Lopes, Yip et al. 2017). Desta forma, nosso trabalho elucidou uma via neuroendócrina através da qual os neurônios KNDy facilitam a liberação de PRL através da inibição de neurônios TIDA.

6. CONCLUSÃO

A lesão de neurônios KNDy altera de maneira diferenciada a regulação estrogênica das secreções de LH e PRL. A perda substancial, mas não absoluta dos neurônios KNDy parece facilitar e antecipar a ocorrência do pico de LH e permitir a ovulação mesmo em um ambiente de ciclo ovariano irregular. Nossos dados suportam que neurônios KNDy teriam um papel na geração do pico de LH, sendo responsáveis por modular sua amplitude e retardar seu horário de ocorrência. A redução do pico de PRL acompanhado por um aumento da atividade dos neurônios TIDA revela que os neurônios KNDy inibem a liberação de dopamina, com reflexo no aumento da secreção de PRL induzido por E2. Esses achados sugerem uma nova via no controle neuroendócrino da secreção de PRL, na qual os peptídeos KNDy orquestram mudanças na liberação de PRL através dos neurônios TIDA. Assim, os neurônios KNDy parecem exercer múltiplos efeitos hipotalâmicos que impactam a função reprodutiva em fêmeas.

7. REFERÊNCIAS

- Anderson, G. M., D. C. Kieser, F. J. Steyn and D. R. Grattan (2008). "Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol." Endocrinology **149**(4): 1562-1570.
- Andrews, Z. B. and D. R. Grattan (2003). "Opioid receptor subtypes involved in the regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation." Journal of neuroendocrinology **15**(3): 227-236.
- Aquino, N., R. Araujo-Lopes, I. Batista, P. Henriques, M. Poletini, C. Franci, A. Reis and R. Szawka (2016). "Hypothalamic effects of tamoxifen on oestrogen regulation of luteinising hormone and prolactin secretion in female rats." Journal of neuroendocrinology **28**(1).
- Aquino, N. S., R. Araujo-Lopes, P. C. Henriques, F. E. Lopes, D. O. Gusmao, C. C. Coimbra, C. R. Franci, A. M. Reis and R. E. Szawka (2017). "α-Estrogen and progesterone receptors modulate kisspeptin effects on prolactin: role in estradiol-induced prolactin surge in female rats." Endocrinology **158**(6): 1812-1826.
- Aquino, N. S., I. C. Kokay, C. T. Perez, S. R. Ladyman, P. C. Henriques, J. F. Silva, C. Broberger, D. R. Grattan and R. E. Szawka (2019). "Kisspeptin stimulation of prolactin secretion requires Kiss1 receptor but not in tuberoinfundibular dopaminergic neurons." Endocrinology **160**(3): 522-533.
- Aquino, N. S. S., R. Araujo-Lopes, P. C. Henriques, F. E. F. Lopes, D. O. Gusmao, C. C. Coimbra, C. R. Franci, A. M. Reis and R. E. Szawka (2017). "alpha-Estrogen and Progesterone Receptors Modulate Kisspeptin Effects on Prolactin: Role in Estradiol-Induced Prolactin Surge in Female Rats." Endocrinology **158**(6): 1812-1826.
- Araujo-Lopes, R., J. R. Crampton, N. S. Aquino, R. M. Miranda, I. C. Kokay, A. M. Reis, C. R. Franci, D. R. Grattan and R. E. Szawka (2014). "Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats." Endocrinology **155**(3): 1010-1020.
- Araujo-Lopes, R., S. H. Yip, J. F. Silva, R. G. Bernardes, F. L. Bello, P. C. Henriques, L. T. Hipolito, M. O. Poletini, C. R. Franci and D. R. Grattan (2017). Estradiol Induces a Functional Switch in Arcuate Kndy Neurons from Kisspeptin to Dynorphin to Facilitate Prolactin Secretion. Neuroendocrine control of reproduction. Endocrine Society's 99th Annual Meeting and Expo, Orlando, FL; Abstract OR23-2.
- Arbogast, L. A. and J. L. Voogt (1996). "The responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin feedback is diminished between early lactation and midlactation in the rat." Endocrinology **137**(1): 47-54.

Arbogast, L. A. and J. L. Voogt (1997). "Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity." Endocrinology **138**(7): 3016-3023.

Arita, J. and F. Kimura (1987). "Direct inhibitory effect of long term estradiol treatment on dopamine synthesis in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: in vitro studies using hypothalamic slices." Endocrinology **121**(2): 692-698.

Belchetz, P., B. Dufy and E. Knobil (1978). "Identification of inhibitory and stimulatory control of prolactin secretion in the rhesus monkey." Neuroendocrinology **27**(1-2): 32-38.

Belchetz, P., T. Plant, Y. Nakai, E. Keogh and E. Knobil (1978). "Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone." Science **202**(4368): 631-633.

Ben-Jonathan, N. and R. Hnasko (2001). "Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor." Endocrine reviews **22**(6): 724-763.

Ben-Jonathan, N., C. Oliver, H. J. Weiner, R. S. Mical and J. C. Porter (1977). "Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy." Endocrinology **100**(2): 452-458.

Biller, B., A. Luciano, P. Crosignani, M. Molitch, D. Olive, R. Rebar, J. Sanfilippo, J. Webster and H. Zacur (1999). "Guidelines for the diagnosis and treatment of hyperprolactinemia." The Journal of reproductive medicine **44**(12 Suppl): 1075-1084.

Blum, M., B. McEwen and J. Roberts (1987). "Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment." Journal of Biological Chemistry **262**(2): 817-821.

Bohnet, H., H. Dahlen, W. Wuttke and H. Schneider (1976). "Hyperprolactinemic anovulatory syndrome." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **42**(1): 132-143.

Brown, R. S., Z. Khant Aung, H. R. Phillipps, Z. Barad, H.-J. Lein, U. Boehm, R. E. Szawka and D. R. Grattan (2019). "Acute suppression of LH secretion by prolactin in female mice is mediated by kisspeptin neurons in the arcuate nucleus." Endocrinology **160**(5): 1323-1332.

Burke, M. C., P. A. Letts, S. J. Krajewski and N. E. Rance (2006). "Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus." Journal of Comparative Neurology **498**(5): 712-726.

Butcher, R., N. Fugo and W. Collins (1972). "Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat." Endocrinology **90**(4): 1125-1127.

Callahan, P., S. Klosterman, D. Prunty, J. Tompkins and J. Janik (2000). "Immunoneutralization of endogenous opioid peptides prevents the suckling-induced prolactin increase and the inhibition of tuberoinfundibular dopaminergic neurons." Neuroendocrinology **71**(4): 268-276.

Campbell, R. E., S.-K. Han and A. E. Herbison (2005). "Biocytin filling of adult gonadotropin-releasing hormone neurons in situ reveals extensive, spiny, dendritic processes." Endocrinology **146**(3): 1163-1169.

Cetel, N. and S. Yen (1983). "Concomitant pulsatile release of prolactin and luteinizing hormone in hypogonadal women." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **56**(6): 1313-1315.

Chen, P. and M. S. Smith (2004). "Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin." Endocrinology **145**(2): 823-829.

Clarkson, J., X. d. A. de Tassigny, A. S. Moreno, W. H. Colledge and A. E. Herbison (2008). "Kisspeptin–GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge." Journal of Neuroscience **28**(35): 8691-8697.

Clarkson, J., S. Y. Han, R. Piet, T. McLennan, G. M. Kane, J. Ng, R. W. Porteous, J. S. Kim, W. H. Colledge and K. J. Iremonger (2017). "Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(47): E10216-E10223.

Clarkson, J. and A. E. Herbison (2006). "Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **147**(12): 5817-5825.

Cottrell, E. C., R. E. Campbell, S.-K. Han and A. E. Herbison (2006). "Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **147**(8): 3652-3661.

Cramer, O. M., J. Parker and J. Porter (1979). "Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood." Endocrinology **104**(2): 419-422.

Cravo, R. M., L. O. Margatho, S. Osborne-Lawrence, J. Donato Jr, S. Atkin, A. L. Bookout, S. Rovinsky, R. Frazão, C. E. Lee and L. Gautron (2011). "Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models." Neuroscience **173**: 37-56.

de Roux, N., E. Genin, J.-C. Carel, F. Matsuda, J.-L. Chaussain and E. Milgrom (2003). "Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide

receptor GPR54." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(19): 10972-10976.

de Souza, F. S., S. Nasif, R. López-Leal, D. H. Levi, M. J. Low and M. Rubinsten (2011). "The estrogen receptor α colocalizes with proopiomelanocortin in hypothalamic neurons and binds to a conserved motif present in the neuron-specific enhancer nPE2." European journal of pharmacology **660**(1): 181-187.

Delemarre-van de Waal, H. A. (2004). "Application of gonadotropin releasing hormone in hypogonadotropic hypogonadism--diagnostic and therapeutic aspects." European journal of endocrinology **151**(Suppl_3): U89-U94.

Demarest, K. T., G. D. Riegler and K. E. Moore (1984). "Long-term treatment with estradiol induces reversible alterations in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: a decreased responsiveness to prolactin." Neuroendocrinology **39**(3): 193-200.

DeMaria, J. E., A. A. Lerant and M. E. Freeman (1999). "Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats." Brain research **837**(1-2): 236-241.

Desroziers, E., J. Mikkelsen, V. Simonneaux, M. Keller, Y. Tillet, A. Caraty and I. Franceschini (2010). "Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat." Journal of neuroendocrinology **22**(10): 1101-1112.

Dupont, S., A. Krust, A. Gansmuller, A. Dierich, P. Chambon and M. Mark (2000). "Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes." Development **127**(19): 4277-4291.

Durham, R., J. Johnson, K. Moore and K. Lookingland (1996). "Evidence that D2 receptor-mediated activation of hypothalamic tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the male rat occurs via inhibition of tonically active afferent dynorphinergic neurons." Brain research **732**(1-2): 113-120.

Elhabazi, K., J.-P. Humbert, I. Bertin, M. Schmitt, F. Bihel, J.-J. Bourguignon, B. Bucher, J. A. Becker, T. Sorg and H. Meziane (2013). "Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors." Neuropharmacology **75**: 164-171.

Estrada, K., C. Clay, S. Pompolo, J. T. Smith and I. J. Clarke (2006). "Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback." Journal of neuroendocrinology **18**(10): 806-809.

Fehér, P., M. Oláh, I. Bodnár, D. Hechtel, I. Bácskay, B. Juhász, G. M. Nagy and M. Vecsernyés (2010). "Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses." Brain research bulletin **82**(1-2): 141-145.

Fitzsimmons, M., J. Olschowka, S. Wiegand and G. Hoffman (1992). "Interaction of opioid peptide-containing terminals with dopaminergic perikarya in the rat hypothalamus." Brain research **581**(1): 10-18.

Fox, S. R., M. T. Hoefer, A. Bartke and M. S. Smith (1987). "Suppression of pulsatile LH secretion, pituitary GnRH receptor content and pituitary responsiveness to GnRH by hyperprolactinemia in the male rat." Neuroendocrinology **46**(4): 350-359.

Freeman, M., M. S. Smith, S. Nazian and J. D. Neill (1974). "Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat." Endocrinology **94**(3): 875-882.

Freeman, M. E. (2006). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Elsevier Science: 2327-2388.

Fu, L.-Y. and A. N. van den Pol (2010). "Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism." Journal of Neuroscience **30**(30): 10205-10219.

Funes, S., J. A. Hedrick, G. Vassileva, L. Markowitz, S. Abbondanzo, A. Golovko, S. Yang, F. J. Monsma and E. L. Gustafson (2003). "The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system." Biochemical and biophysical research communications **312**(4): 1357-1363.

Furigo, I. C., K. W. Kim, V. S. Nagaishi, A. M. Ramos-Lobo, A. De Alencar, J. A. Pedroso, M. Metzger and J. Donato Jr (2014). "Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin." Brain research **1566**: 47-59.

Fuxe, K. (1965). "Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system." Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie **65**(4): 573-596.

George, S. R., R. L. Zastawny, R. Brionesurbina, R. Cheng, T. Nguyen, M. Heiber, A. Kouvelas, A. S. Chan and B. F. Odowd (1994). "Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain." Biochemical and biophysical research communications **205**(2): 1438-1444.

Gibbs, D. and J. Neill (1978). "Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo." Endocrinology **102**(6): 1895-1900.

Goodman, R. L., L. M. Coolen, G. M. Anderson, S. L. Hardy, M. Valent, J. M. Connors, M. E. Fitzgerald and M. N. Lehman (2004). "Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep." Endocrinology **145**(6): 2959-2967.

Goodman, R. L., M. N. Lehman, J. T. Smith, L. M. Coolen, C. V. De Oliveira, M. R. Jafarzadehshirazi, A. Pereira, J. Iqbal, A. Caraty and P. Ciofi (2007). "Kisspeptin neurons

in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B." Endocrinology **148**(12): 5752-5760.

Gottsch, M. L., D. K. Clifton and R. A. Steiner (2009). "From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature." Peptides **30**(1): 4-9.

Goudreau, J. L., W. M. Falls, K. J. Lookingland and K. E. Moore (1995). "Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland." Neuroendocrinology **62**(2): 147-154.

Grattan, D. and I. Kokay (2008). "Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone." Journal of neuroendocrinology **20**(6): 752-763.

Grattan, D. R. (2015). "60 years of neuroendocrinology: the hypothalamo-prolactin axis." Journal of Endocrinology **226**(2): T101-T122.

Grattan, D. R., C. L. Jasoni, X. Liu, G. M. Anderson and A. E. Herbison (2007). "Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice." Endocrinology **148**(9): 4344-4351.

Grattan, D. R. and R. E. Szawka (2019). Kisspeptin and Prolactin. Seminars in Reproductive Medicine, Thieme Medical Publishers.

Greenman, Y., K. Tordjman and N. Stern (1998). "Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels." Clinical endocrinology **48**(5): 547-553.

Grosdemouge, I., A. Bachelot, A. Lucas, N. Baran, P. A. Kelly and N. Binart (2003). "Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression." Reproductive Biology and Endocrinology **1**(1): 12.

Han, S.-K., M. L. Gottsch, K. J. Lee, S. M. Popa, J. T. Smith, S. K. Jakawich, D. K. Clifton, R. A. Steiner and A. E. Herbison (2005). "Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty." Journal of Neuroscience **25**(49): 11349-11356.

Helena, C. V., N. Toporikova, B. Kalil, A. M. Stathopoulos, V. V. Pogrebna, R. O. Carolino, J. A. Anselmo-Franci and R. Bertram (2015). "KNDy neurons modulate the magnitude of the steroid-induced luteinizing hormone surges in ovariectomized rats." Endocrinology **156**(11): 4200-4213.

Hentschel, K., K. E. Moore and K. J. Lookingland (2000). "Effects of prolactin on expression of Fos-related antigens in tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in subdivisions of the arcuate nucleus." Brain research **857**(1-2): 110-118.

Herbison, A. E. (2016). "Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons." Nature Reviews Endocrinology **12**(8): 452.

Herbison, A. E. (2018). "The gonadotropin-releasing hormone pulse generator." Endocrinology **159**(11): 3723-3736.

Herbison, A. E. (2020). "A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion." Frontiers in Neuroendocrinology: 100837.

Herbison, A. E., X. d'Anglemont de Tassigny, J. Doran and W. H. Colledge (2010). "Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons." Endocrinology **151**(1): 312-321.

Herbison, A. E. and J.-R. Pape (2001). "New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons." Frontiers in neuroendocrinology **22**(4): 292-308.

Herde, M. K., K. J. Iremonger, S. Constantin and A. E. Herbison (2013). "GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions." Journal of Neuroscience **33**(31): 12689-12697.

Higo, S., N. Iijima and H. Ozawa (2017). "Characterisation of Kiss1r (Gpr54)-expressing neurones in the arcuate nucleus of the female rat hypothalamus." Journal of neuroendocrinology **29**(2).

Holzbauer, M. and K. Racke (1985). "The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland." Medical biology **63**(3): 97-116.

Hu, M., X. Li, B. McCausland, S. Li, R. Gresham, J. Kinsey-Jones, J. Gardiner, A. Sam, S. Bloom and L. Poston (2015). "Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats." Endocrinology **156**(7): 2619-2631.

Irwig, M. S., G. S. Fraley, J. T. Smith, B. V. Acohido, S. M. Popa, M. J. Cunningham, M. L. Gottsch, D. K. Clifton and R. A. Steiner (2004). "Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat." Neuroendocrinology **80**(4): 264-272.

Jayasena, C. N., A. Abbara, A. N. Comninou, G. M. Nijher, G. Christopoulos, S. Narayanaswamy, C. Izzi-Engbeaya, M. Sridharan, A. J. Mason and J. Warwick (2014). "Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization." The Journal of clinical investigation **124**(8): 3667-3677.

Jayes, F. L., K. A. Burns, K. F. Rodriguez, G. E. Kissling and K. S. Korach (2014). "The naturally occurring luteinizing hormone surge is diminished in mice lacking estrogen receptor beta in the ovary." Biology of reproduction **90**(2): 24, 21-29.

Jones, E. E. and F. Naftolin (1990). "Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain." Brain research **510**(1): 84-91.

Kansra, S., S. Chen, M. L. Y. Bangaru, L. Sneade, J. A. Dunckley and N. Ben-Jonathan (2010). "Selective estrogen receptor down-regulator and selective estrogen receptor modulators differentially regulate lactotroph proliferation." PLoS One **5**(4): e10060.

Kansra, S., S. Yamagata, L. Sneade, L. Foster and N. Ben-Jonathan (2005). "Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release." Molecular and cellular endocrinology **239**(1-2): 27-36.

Kawano, H. and S. Daikoku (1987). "Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study." Journal of Comparative Neurology **265**(2): 242-253.

Kinoshita, M., H. Tsukamura, S. Adachi, H. Matsui, Y. Uenoyama, K. Iwata, S. Yamada, K. Inoue, T. Ohtaki and H. Matsumoto (2005). "Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats." Endocrinology **146**(10): 4431-4436.

Kinsey-Jones, J. S., P. Grachev, X. F. Li, Y. S. Lin, S. R. Milligan, S. L. Lightman and K. T. O'Byrne (2012). "The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat." Endocrinology **153**(1): 307-315.

Kirilov, M., J. Clarkson, X. Liu, J. Roa, P. Campos, R. Porteous, G. Schütz and A. E. Herbison (2013). "Dependence of fertility on kisspeptin–Gpr54 signaling at the GnRH neuron." Nature communications **4**(1): 1-11.

Koike, K., T. Aono, A. Miyake, K. Tasaka, F. Chatani and K. Kurachi (1984). "Effect of pituitary transplants on the LH-RH concentrations in the medial basal hypothalamus and hypophyseal portal blood." Brain research **301**(2): 253-258.

Koike, K., A. Miyake, T. Aono, T. Sakamoto, M. Ohmichi, M. Yamaguchi and O. Tanizaw (1991). "Effect of prolactin on the secretion of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins." Hormone Research in Paediatrics **35**(Suppl. 1): 5-12.

Kokay, I. and D. Grattan (2005). "Expression of mRNA for prolactin receptor (long form) in dopamine and pro-opiomelanocortin neurones in the arcuate nucleus of non-pregnant and lactating rats." Journal of neuroendocrinology **17**(12): 827-835.

Kokay, I. C., S. L. Petersen and D. R. Grattan (2010). "Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility." Endocrinology **152**(2): 526-535.

Kotani, M., M. Detheux, A. Vandenberghe, D. Communi, J.-M. Vanderwinden, E. Le Poul, S. Brézillon, R. Tyldesley, N. Suarez-Huerta and F. Vandeput (2001). "The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54." Journal of Biological Chemistry **276**(37): 34631-34636.

Krajewski, S. J., M. J. Anderson, L. Iles-Shih, K. J. Chen, H. F. Urbanski and N. E. Rance (2005). "Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence." Journal of Comparative Neurology **489**(3): 372-386.

Krajewski, S. J., M. C. Burke, M. J. Anderson, N. T. McMullen and N. E. Rance (2010). "Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat." Neuroscience **166**(2): 680-697.

Kreek, M., J. Schluger, L. Borg, M. Gunduz and A. Ho (1999). "Dynorphin A1-13 causes elevation of serum levels of prolactin through an opioid receptor mechanism in humans: gender differences and implications for modulation of dopaminergic tone in the treatment of addictions." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **288**(1): 260-269.

Krege, J. H., J. B. Hodgin, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J.-Å. Gustafsson and O. Smithies (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β ." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(26): 15677-15682.

Kumar, D., M. Candlish, V. Periasamy, N. Avcu, C. Mayer and U. Boehm (2015). "Specialized subpopulations of kisspeptin neurons communicate with GnRH neurons in female mice." Endocrinology **156**(1): 32-38.

Lee, D. K., T. Nguyen, G. P. O'Neill, R. Cheng, Y. Liu, A. D. Howard, N. Coulombe, C. P. Tan, A.-T. Tang-Nguyen and S. R. George (1999). "Discovery of a receptor related to the galanin receptors." FEBS letters **446**(1): 103-107.

Lee, J.-H., M. E. Miele, D. J. Hicks, K. K. Phillips, J. M. Trent, B. E. Weissman and D. R. Welch (1996). "KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene." JNCI: Journal of the National Cancer Institute **88**(23): 1731-1737.

Lee, J.-H. and D. R. Welch (1997). "Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1." Cancer research **57**(12): 2384-2387.

Lehman, M. N., L. M. Coolen and R. L. Goodman (2010). "Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion." Endocrinology **151**(8): 3479-3489.

Lehman, M. N., S. M. Hileman and R. L. Goodman (2013). Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. Kisspeptin signaling in reproductive biology, Springer: 27-62.

Lehman, M. N., C. M. Merkley, L. M. Coolen and R. L. Goodman (2010). "Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals." Brain research **1364**: 90-102.

Lerant, A. and M. E. Freeman (1998). "Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study." Brain research **802**(1-2): 141-154.

Levine, E. (2015). Chapter 26 - Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Elsevier Inc: 1199-1204.

Levine, J. E. and M. T. Duffy (1988). "Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats." Endocrinology **122**(5): 2211-2221.

Li, X.-F., J. S. Kinsey-Jones, Y. Cheng, A. M. Knox, Y. Lin, N. A. Petrou, A. Roseweir, S. L. Lightman, S. R. Milligan and R. P. Millar (2009). "Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat." PloS one **4**(12): e8334.

Liu, B. and L. A. Arbogast (2008). "Phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in the stalk-median eminence is decreased by progesterone in cycling female rats." Endocrinology **149**(4): 1462-1469.

Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Smithies (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(23): 11162-11166.

Masaoka, K., M. Kitazawa and T. Kumasaka (1988). "Pulsatile secretion of prolactin and luteinizing hormone and their synchronous relationship during the human menstrual cycle." Gynecological Endocrinology **2**(4): 293-303.

Matsuda, F., N. Inoue, N. Manabe and S. Ohkura (2012). "Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells." Journal of Reproduction and Development **58**(1): 44-50.

Matsuzaki, T., K. Azuma, M. Irahara, T. Yasui and T. Aono (1994). "Mechanism of anovulation in hyperprolactinemic amenorrhea determined by pulsatile gonadotropin-releasing hormone injection combined with human chorionic gonadotropin." Fertility and sterility **62**(6): 1143-1149.

McQuillan, H. J., S. Y. Han, I. Cheong and A. E. Herbison (2019). "GnRH pulse generator activity across the estrous cycle of female mice." Endocrinology **160**(6): 1480-1491.

Meador-Woodruff, J. H., A. Mansour, J. R. Bunzow, H. Van Tol, S. J. Watson and O. Civelli (1989). "Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(19): 7625-7628.

Merkley, C. M., K. L. Porter, L. M. Coolen, S. M. Hileman, H. J. Billings, S. Drews, R. L. Goodman and M. N. Lehman (2012). "KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin)

neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe." Endocrinology **153**(11): 5406-5414.

Messenger, S., E. E. Chatzidaki, D. Ma, A. G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, R. R. Thresher, I. Malinge, D. Lomet and M. B. Carlton (2005). "Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(5): 1761-1766.

Millar, R. P., C. Sonigo, R. A. Anderson, J. George, L. Maione, S. Brailly-Tabard, P. Chanson, N. Binart and J. Young (2017). "Hypothalamic-pituitary-ovarian axis reactivation by kisspeptin-10 in hyperprolactinemic women with chronic amenorrhea." Journal of the Endocrine Society **1**(11): 1362-1371.

Mitchell, V., V. Prevot, L. Jennes, J.-P. Aubert, D. Croix and J.-C. Beauvillain (1997). "Presence of μ and κ opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat." Neuroreport **8**(14): 3167-3172.

Mittelman-Smith, M. A., S. J. Krajewski-Hall, N. T. McMullen and N. E. Rance (2016). "Ablation of KNDy neurons results in hypogonadotropic hypogonadism and amplifies the steroid-induced LH surge in female rats." Endocrinology **157**(5): 2015-2027.

Mittelman-Smith, M. A., H. Williams, S. J. Krajewski-Hall, J. Lai, P. Ciofi, N. T. McMullen and N. E. Rance (2012). "Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight." Endocrinology **153**(6): 2800-2812.

Moore, A. M., L. M. Coolen and M. N. Lehman (2019). "Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) cells as integrators of diverse internal and external cues: evidence from viral-based monosynaptic tract-tracing in mice." Scientific reports **9**.

Moore, A. M., L. M. Coolen, D. T. Porter, R. L. Goodman and M. N. Lehman (2018). "KNDy cells revisited." Endocrinology **159**(9): 3219-3234.

Morel, G. R., R. W. Carón, G. M. Cónsole, M. Soaje, Y. E. Sosa, S. S. Rodríguez, G. A. Jahn and R. G. Goya (2009). "Estrogen inhibits tuberoinfundibular dopaminergic neurons but does not cause irreversible damage." Brain research bulletin **80**(6): 347-352.

Morrell, J. I., M. F. Rosenthal, J. T. McCabet, C. A. Harrington, D. M. Chikaraishi and D. W. Pfaff (1989). "Tyrosine hydroxylase mRNA in the neurons of the tuberoinfundibular region and zona incerta examined after gonadal steroid hormone treatment." Molecular Endocrinology **3**(9): 1426-1433.

Moult, P., L. H. REES and G. Besser (1982). "Pulsatile gonadotrophin secretion in hyperprolactinaemic amenorrhoea and the response to bromocriptine therapy." Clinical Endocrinology **16**(2): 153-162.

Muir, A. I., L. Chamberlain, N. A. Elshourbagy, D. Michalovich, D. J. Moore, A. Calamari, P. G. Szekeres, H. M. Sarau, J. K. Chambers and P. Murdock (2001). "AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1." Journal of Biological Chemistry **276**(31): 28969-28975.

Navarro, V., J. Castellano, R. Fernandez-Fernandez, M. Barreiro, J. Roa, J. Sanchez-Criado, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla and M. Tena-Sempere (2004). "Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide." Endocrinology **145**(10): 4565-4574.

Navarro, V. M., M. L. Gottsch, C. Chavkin, H. Okamura, D. K. Clifton and R. A. Steiner (2009). "Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse." Journal of Neuroscience **29**(38): 11859-11866.

Nestor, C. C., J. Qiu, S. L. Padilla, C. Zhang, M. A. Bosch, W. Fan, S. A. Aicher, R. D. Palmiter, O. K. Rønnekleiv and M. J. Kelly (2016). "Optogenetic stimulation of arcuate nucleus Kiss1 neurons reveals a steroid-dependent glutamatergic input to POMC and AgRP neurons in male mice." Molecular Endocrinology **30**(6): 630-644.

Noel, M. B. and B. Woodside (1993). "Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats." Physiology & Behavior **54**(1): 151-154.

Ohtaki, T., Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu and Y. Masuda (2001). "Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor." Nature **411**(6837): 613-617.

Padilla, S. L., J. G. Perez, M. Ben-Hamo, C. W. Johnson, R. E. Sanchez, I. L. Bussi, R. D. Palmiter and O. Horacio (2019). "Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus orchestrate circadian rhythms and metabolism." Current Biology **29**(4): 592-604. e594.

Park, S.-K., M. W. Keenan and M. Selmánoff (1993). "Graded hyperprolactinemia first suppresses LH pulse frequency and then pulse amplitude in castrated male rats." Neuroendocrinology **58**(4): 448-453.

Park, S.-K. and M. Selmánoff (1991). "Dose-dependent suppression of postcastration luteinizing hormone secretion exerted by exogenous prolactin administration in male rats: a model for studying hyperprolactinemic hypogonadism." Neuroendocrinology **53**(4): 404-410.

Paxinos, G. and C. Watson (2009). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Elsevier/Academic.

Pedersen, T. and H. Peters (1968). "Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary." Reproduction **17**(3): 555-557.

Pinilla, L., E. Aguilar, C. Dieguez, R. P. Millar and M. Tena-Sempere (2012). "Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms." Physiological reviews **92**(3): 1235-1316.

Plant, T. M. (2019). "The neurobiological mechanism underlying hypothalamic GnRH pulse generation: the role of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus." F1000Research **8**.

Poletini, M. O., R. E. Szawka, C. R. Franci and J. A. Anselmo-Franci (2004). "Role of the locus coeruleus in the prolactin secretion of female rats." Brain research bulletin **63**(4): 331-338.

Prague, J. K. and W. S. Dhillon (2015). "Potential clinical use of kisspeptin." Neuroendocrinology **102**(3): 238-245.

Qiu, J., C. C. Nestor, C. Zhang, S. L. Padilla, R. D. Palmiter, M. J. Kelly and O. K. Rønnekleiv (2016). "High-frequency stimulation-induced peptide release synchronizes arcuate kisspeptin neurons and excites GnRH neurons." Elife **5**: e16246.

Rance, N. E., S. J. Krajewski, M. A. Smith, M. Cholanian and P. A. Dacks (2010). "Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction." Brain research **1364**: 116-128.

Raymond, V., M. Beaulieu, F. Labrie and J. Boissier (1978). "Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release." Science **200**(4346): 1173-1175.

Ribeiro, A., C. Leite, B. Kalil, C. Franci, J. Anselmo-Franci and R. Szawka (2015). "Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats." Journal of neuroendocrinology **27**(2): 88-99.

Riddle, O., R. W. Bates and S. W. Dykshorn (1933). "The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of the anterior pituitary." American Journal of Physiology-Legacy Content **105**(1): 191-216.

Roa, J., E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla and M. Tena-Sempere (2008). "New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function." Frontiers in neuroendocrinology **29**(1): 48-69.

Romanò, N., S. H. Yip, D. J. Hodson, A. Guillou, S. Parnaudeau, S. Kirk, F. Tronche, X. Bonnefont, P. Le Tissier and S. J. Bunn (2013). "Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release." Journal of Neuroscience **33**(10): 4424-4433.

Rumi, M. K., P. Singh, K. F. Roby, X. Zhao, K. Iqbal, A. Ratri, T. Lei, W. Cui, S. Borosha and P. Dhakal (2017). "Defining the role of estrogen receptor β in the regulation of female fertility." Endocrinology **158**(7): 2330-2343.

Sar, M., A. Sahu, W. R. Crowley and S. P. Kalra (1990). "Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus." Endocrinology **127**(6): 2752-2756.

Sarkar, D. K. and S. S. Yen (1985). "Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: A possible role for β -endorphin as a mediator." Endocrinology **116**(5): 2080-2084.

Sawai, N., N. Iijima, H. Ozawa and T. Matsuzaki (2014). "Neurokinin B-and kisspeptin-positive fibers as well as tuberoinfundibular dopaminergic neurons directly innervate periventricular hypophyseal dopaminergic neurons in rats and mice." Neuroscience research **84**: 10-18.

Sawai, N., N. Iijima, K. Takumi, K. Matsumoto and H. Ozawa (2012). "Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats." Neuroscience research **74**(1): 10-16.

Scully, K. M., A. S. Gleiberman, J. Lindzey, D. B. Lubahn, K. S. Korach and M. G. Rosenfeld (1997). "Role of estrogen receptor- α in the anterior pituitary gland." Molecular Endocrinology **11**(6): 674-681.

Seminara, S. B., S. Messenger, E. E. Chatzidaki, R. R. Thresher, J. S. Acierno Jr, J. K. Shagoury, Y. Bo-Abbas, W. Kuohung, K. M. Schwinof and A. G. Hendrick (2003). "The GPR54 gene as a regulator of puberty." New England Journal of Medicine **349**(17): 1614-1627.

Shamgochian, M. D., C. Avakian, N. H. Truong, S. Stone, K.-T. Tang and W. J. DeVito (1995). "Regulation of prolactin receptor expression by estradiol in the female rat brain." Neuroreport **6**(18): 2537-2541.

Shin, S. and H. Chi (1979). "Unsuppressed prolactin secretion in the male rat is pulsatile." Neuroendocrinology **28**(2): 73-81.

Silva, J. F., P. C. Henriques, A. C. Campideli-Santana, R. Araujo-Lopes, N. S. Aquino, L. Hipolito, C. Lopes-Aguiar, A. M. Reis, D. R. Grattan and R. E. Szawka (2020). "Estradiol potentiates but is not essential for prolactin-induced suppression of LH pulses in female rats." Endocrinology.

Silva, K. S., N. S. Aquino, D. O. Gusmao, P. C. Henriques, A. M. Reis and R. E. Szawka "Reduced dopaminergic tone during lactation is permissive to the hypothalamic stimulus for suckling-induced prolactin release." Journal of Neuroendocrinology: e12880.

Silveira, L. G., S. Noel, A. Silveira-Neto, A. Abreu, V. Brito, M. Santos, S. Bianco, W. Kuohung, S. Xu and M. Gryngarten (2010). "Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **95**(5): 2276-2280.

Smith, J. T., M. J. Cunningham, E. F. Rissman, D. K. Clifton and R. A. Steiner (2005). "Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse." Endocrinology **146**(9): 3686-3692.

Smith, J. T., S. M. Popa, D. K. Clifton, G. E. Hoffman and R. A. Steiner (2006). "Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge." Journal of Neuroscience **26**(25): 6687-6694.

Smith, M. S., M. Freeman and J. Neill (1975). "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 **96**(1): 219-226.

Stafford, L. J., C. Xia, W. Ma, Y. Cai and M. Liu (2002). "Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor." Cancer research **62**(19): 5399-5404.

Stathopoulos, A. M., C. V. Helena, R. Cristancho-Gordo, A. E. Gonzalez-Iglesias and R. Bertram (2016). "Influence of dynorphin on estradiol-and cervical stimulation-induced prolactin surges in ovariectomized rats." Endocrine **53**(2): 585-594.

Steyn, F., G. Anderson and D. Grattan (2007). "Expression of ovarian steroid hormone receptors in tuberoinfundibular dopaminergic neurones during pregnancy and lactation." Journal of neuroendocrinology **19**(10): 788-793.

Szawka, R., G. Rodovalho, P. Monteiro, H. Carrer and J. Anselmo-Franci (2009). "Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation." Journal of neuroendocrinology **21**(7): 629-639.

Szawka, R. E., A. B. Ribeiro, C. M. Leite, C. V. Helena, C. R. Franci, G. M. Anderson, G. E. Hoffman and J. A. Anselmo-Franci (2010). "Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons." Endocrinology **151**(7): 3247-3257.

Takahashi, S., K. Okazaki and S. Kawashima (1984). "Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages." Cell and tissue research **235**(3): 497-502.

Tilly, J. L. (2003). "Ovarian follicle counts—not as simple as 1, 2, 3." Reproductive Biology and Endocrinology **1**(1): 11.

Tolson, K. P., C. Garcia, S. Yen, S. Simonds, A. Stefanidis, A. Lawrence, J. T. Smith and A. S. Kauffman (2014). "Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and

promotes glucose intolerance and obesity." The Journal of clinical investigation **124**(7): 3075-3079.

True, C., M. Kirigiti, P. Ciofi, K. L. Grove and M. S. Smith (2011). "Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat." Journal of neuroendocrinology **23**(1): 52-64.

Tsutsui, K., G. Bentley, L. Kriegsfeld, T. Osugi, J. Y. Seong and H. Vaudry (2010). "Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction." Journal of neuroendocrinology **22**(7): 716-727.

Van Den Pol, A. N., J.-P. Wuarin and F. E. Dudek (1990). "Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation." Science **250**(4985): 1276-1278.

Veldhuis, J. D. and M. L. JOHNSON (1988). "Operating characteristics of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in men: circadian, ultradian, and pulsatile release of prolactin and its temporal coupling with luteinizing hormone." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **67**(1): 116-123.

Wakabayashi, Y., T. Nakada, K. Murata, S. Ohkura, K. Mogi, V. M. Navarro, D. K. Clifton, Y. Mori, H. Tsukamura and K.-I. Maeda (2010). "Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat." Journal of Neuroscience **30**(8): 3124-3132.

Wang, L., W. Guo, X. Shen, S. Yeo, H. Long, Z. Wang, Q. Lyu, A. E. Herbison and Y. Kuang (2020). "Different dendritic domains of the GnRH neuron underlie the pulse and surge modes of GnRH secretion in female mice." Elife **9**: e53945.

Wang, L., C. Vanacker, L. L. Burger, T. Barnes, Y. M. Shah, M. G. Myers and S. M. Moenter (2019). "Genetic dissection of the different roles of hypothalamic kisspeptin neurons in regulating female reproduction." Elife **8**: e43999.

Watson Jr, R. E., S. J. Wiegand, R. W. Clough and G. E. Hoffman (1986). "Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology." Peptides **7**(1): 155-159.

Weems, P. W., L. M. Coolen, S. M. Hileman, S. Hardy, R. B. McCosh, R. L. Goodman and M. N. Lehman (2018). "Evidence that dynorphin acts upon KNDy and GnRH neurons during GnRH pulse termination in the ewe." Endocrinology **159**(9): 3187-3199.

Weems, P. W., C. F. Witty, M. Amstalden, L. M. Coolen, R. L. Goodman and M. N. Lehman (2016). " κ -Opioid receptor is colocalized in GnRH and KNDy cells in the female ovine and rat brain." Endocrinology **157**(6): 2367-2379.

West, A., P. J. Vojta, D. R. Welch and B. E. Weissman (1998). "Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1)." Genomics **54**(1): 145-148.

Wintermantel, T. M., R. E. Campbell, R. Porteous, D. Bock, H.-J. Gröne, M. G. Todman, K. S. Korach, E. Greiner, C. A. Pérez and G. Schütz (2006). "Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility." Neuron **52**(2): 271-280.

Yip, S. H., U. Boehm, A. E. Herbison and R. E. Campbell (2015). "Conditional viral tract tracing delineates the projections of the distinct kisspeptin neuron populations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the mouse." Endocrinology **156**(7): 2582-2594.

Yoshida, M., A. Sanbuisso, S. Hisada, M. Takahashi, Y. Ohno and A. Nishikawa (2009). "Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection." The Journal of toxicological sciences **34**(Special): SP189-SP197.