

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

**REGULAÇÃO DOS NEURÔNIOS KNDY PELO ESTRADIOL: PAPEL DA  
KISSPEPTINA E DINORFINA NO CONTROLE DA SECREÇÃO DE  
PROLACTINA E HORMÔNIO LUTEINIZANTE**

Belo Horizonte – MG

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA**

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

**REGULAÇÃO DOS NEURÔNIOS KNDY PELO ESTRADIOL: PAPEL DA  
KISSPEPTINA E DINORFINA NO CONTROLE DA SECREÇÃO DE  
PROLACTINA E HORMÔNIO LUTEINIZANTE**

**Doutoranda: Roberta Araújo Lopes**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Orientador: Prof. Dr Raphael Escorsim Szawka**

Belo Horizonte – MG

2017

*Dedico este trabalho à minha família e ao meu marido,  
por estarem ao meu lado em todos os momentos,  
mesmo quando a distância ultrapassava os oceanos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a base sólida da minha vida, que preenche meu ser com entusiasmo, sabedoria, força e coragem para percorrer os caminhos trilhados, sejam eles quais forem.

Aos meus pais e minha tia por serem meus anjos na Terra, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, mesmo que muitas vezes estas estejam a milhares de quilômetros. Obrigada pelo colo, palavras, ensinamentos, conselhos e principalmente pelo AMOR!

Ao Gustavo, meu companheiro, meu melhor amigo e meu amor! Obrigada por não medir esforços para estar sempre presente ao meu lado. Obrigada por aceitar as distâncias, as inúmeras ausências e mesmo assim me apoiar, incentivar e principalmente me entender, já que isso é uma tarefa bem complicada! Você me completa! TE AMO MUITO!

Ao professor Raphael, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência, incentivo e apoio nestes 6 anos. Você é bem mais que um 'chefe', é um verdadeiro amigo. Espero poder aprender muito ainda com você.

Ao professor Dave Grattan, por ter proporcionado uma experiência ímpar na minha vida acadêmica. Muito obrigada por todo apoio, paciência, colaborações e ensinamentos.

Ao Joe Yip, por todos os ensinamentos, paciência e principalmente pela sua amizade e seu entusiasmo contagiante.

Aos amigos Bruna e Mauro pela amizade e todo suporte concedido no meu Doutorado Sanduíche na Nova Zelândia.

Aos professores Cândido Celso Coimbra, Adelina Martha dos Reis, Maristela Poletini pelos ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca examinadora, professora Renata Frazão, professora Virgínia Pereira, professor Fernando Reis e professor André Massensini pela disponibilidade e sugestões para o trabalho.

À Raquel, Fernandinha, Patrícia, Nayara e Laísa pela amizade e grande ajuda na realização dos experimentos.

Ao professor Juneo, pela amizade leve e divertida, pela imensa ajuda nos experimentos e todos os ensinamentos.

Ao grupo 'Kisspeptina' pelas inúmeras parcerias, amizades, ensinamentos e aprendizados. Vocês são muito especiais e estarão sempre presentes de alguma forma na minha vida!

Ao Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, vocês foram uma verdadeira família para mim nestes 6 anos, obrigada por todos os momentos divertidos, tensos ou alegres que passei ao lado de vocês! Foram muitas pessoas especiais que aí já estiveram e estão presentes e tenho um carinho muito especial por cada uma! Sinto muita falta de vocês!

À Simone, pela amizade, por toda disponibilidade e ajuda. Obrigada por fazer com tanto capricho tudo que lhe foi encarregado.

Às amigas de república Ana Cândida, Kirla e Beatriz, pelo imenso carinho e companheirismo. Sinto muita falta da nossa convivência diária.

Aos amigos de Formiga e Alfenas, pelo total apoio e amizade independente da distância.

Aos meus tios e primos pela torcida e incentivo.

Aos funcionários do CEBIO/UFMG, por me ajudarem sempre e cuidarem tão bem dos animais.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Cyntia, Nilda e Rodner pela disponibilidade em me ajudar.

Aos animais pelo sacrifício.

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e Programa Ciências Sem Fronteiras por financiarem este trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Padronização do ensaio de ELISA ultrasensível para hormônio luteinizante (LH) de rato (rLH) .....	47
Figura 2: Padronização do ensaio de ELISA ultrasensível para prolactina (PRL) de rato (rPRL) .....	48
Figura 3: Atividade dos neurônios kisspeptina, neurocinina B e dinorfina A (KNDy) em ratas nos dias de diestro, proestro e estro do ciclo estral .....	55
Figura 4: Atividade dos neurônios KNDy em ratos machos às 10:00 h e 18:00 h.....	57
Figura 5: Atividade dos neurônios KNDy em ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (OVX), estradiol (E2) (OVX+E2) ou E2 e tamoxifen (OVX+E2+TX) .....	61
Figura 6: Correlação entre a atividade dos neurônios KNDy e dos neurônios GnRH em ratas OVX e OVX+E2 .....	63
Figura 7: Correlação entre a atividade dos neurônios KNDy e dos neurônios tuberoinfundibular dopaminérgicos (TIDA) em ratas OVX e OVX+E2 .....	65

Figura 8: Efeito do E2 na expressão de *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* no ARC de ratas.....67

Figura 9: Efeito do E2 sobre a expressão de Dyn A e Kp em ratas TH- Cre que expressam proteína fluorescente verde (GFP) .....69

Figura 10: Aposições de Dyn A e Kp em neurônios TIDA de ratas TH- Cre que expressam GFP .....70

Figura 11: Mecanismo proposto da regulação dos neurônios KNDy pelo E2 em ratas.....84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para reação de transcrição reversa em cadeia de polimerase (RT-PCR tempo real) .....46

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de LH em ratas ciclando e ratos machos e peso uterino das fêmeas.....53

Tabela 3: Níveis de LH e peso do útero em ratas OVX tratadas com E2 e tamoxifen.....59

## RESUMO

Os neurônios produtores de kisspeptina, neurocinina e dinorfina (KNDy) do núcleo arqueado (ARC) estão envolvidos na secreção pulsátil de hormônio luteinizante (LH). Evidências anteriores também mostraram que os neurônios KNDy enviam projeções para os neurônios tuberoinfundibular dopaminérgicos (TIDA), que estão envolvidos na secreção de prolactina (PRL). Em roedores, o estradiol (E2) é capaz de induzir picos pré-ovulatórios simultâneos de LH e PRL. Neste trabalho, testamos a hipótese de que os neurônios KNDy participem da regulação da secreção de PRL pelo E2. A atividade dos neurônios KNDy foi avaliada utilizando dupla marcação imunohistoquímica para c-Fos e kisspeptina no ARC. O número de neurônios kisspeptina-*ir* foi menor no proestro e estro comparado com o diestro. No entanto, a porcentagem de neurônios de kisspeptina-*ir* expressando c-Fos foi aumentada na tarde do proestro, momento dos picos de LH e PRL, resultado este confirmado utilizando-se dois anticorpos anti-c-Fos. Os ratos machos, por sua vez, exibiram menor número de neurônios kisspeptina-*ir* no ARC do que fêmeas em diestro, com coexpressão inalterada de c-Fos durante o dia. Os efeitos do E2 foram avaliados no modelo de retroalimentação positiva de ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com E2 (OVX+E2). O número de neurônios kisspeptina-*ir* no ARC foi menor em ratas OVX+E2 em comparação às OVX. De forma semelhante ao proestro, no entanto, a porcentagem de neurônios kisspeptina-*ir* expressando c-Fos foi aumentada em ratas OVX+E2 às 18:00 h. Esta ativação neuronal e o pico de LH, foram bloqueados pelo anti-estrógeno tamoxifen. Além disso, a ativação de neurônios kisspeptinérgicos em ratas OVX+E2 foi diretamente correlacionada com a atividade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e inversamente correlacionada com a expressão de tirosina hidroxilase fosforilada (S<sup>40</sup>pTH) na eminência mediana, utilizada como índice de atividade dos neurônios TIDA. Os efeitos de E2 na expressão dos genes KNDy no ARC foram determinados utilizando-se a reação de transcrição reversa em cadeia de polimerase (RT-PCR tempo real). O

E2 inibiu a expressão de *Kiss1* e não teve efeito sobre o RNAm de *Nkb*. Em contrapartida, ratas OVX+E2 apresentaram um aumento do RNAm de prodinorfina (Pdyn) às 18:00 h, coincidindo com os picos de LH e PRL induzidos por E2. Em um experimento adicional, utilizamos ratas transgênicas que expressam Cre-recombinase sob o controle do promotor da TH, para preencher os corpos celulares e dendritos de neurônios TIDA com GFP, permitindo a investigação de posições de dinorfina e kisspeptina nessas células. As ratas OVX+E2 exibiram maior número de neurônios dinorfina-ir no ARC, em oposição ao menor número de células kisspeptina-ir. O E2 também aumentou o número de posições dinorfina-ir no soma e dendritos de neurônios TIDA, enquanto diminuiu as posições kisspeptina-ir. Assim, fornecemos evidências de um efeito dual do E2 sobre os neurônios KNDy. O E2 reduz a expressão de kisspeptina como parte do efeito de retroalimentação negativa sobre a secreção de LH. Concomitantemente, induz um aumento na atividade de neurônios KNDy durante a tarde, maior expressão de dinorfina e aumento dos contatos de dinorfina em neurônios TIDA. Estes achados revelam um mecanismo pelo qual os neurônios KNDy devem controlar a secreção de PRL induzida por E2.

## ABSTRACT

Kisspeptin, neurokinin and dynorphin (KNDy) neurons in the arcuate nucleus (ARC) are implicated in luteinizing hormone (LH) pulsatility. Previous evidence has also shown that KNDy neurons have extensive projections onto tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) neurons that are involved in prolactin (PRL) secretion. In rodents, estradiol (E2) induces concurrent preovulatory surges of LH and PRL. We aimed to test the hypothesis that KNDy neurons are major player in regulating this release of PRL. The activity of KNDy neurons was evaluated using double-label immunohistochemistry to c-Fos and kisspeptin in the ARC. The number of kisspeptin-immunoreactive (ir) neurons was lower on proestrus and estrus compared with diestrus. Nevertheless, the percentage of kisspeptin-ir neurons expressing c-Fos was increased on proestrous afternoon by the time of LH and PRL surges, confirmed using two anti-c-Fos antibodies. Male rats, in turn, displayed fewer kisspeptin-ir neurons in the ARC than diestrous females with unchanged coexpression of c-Fos during the day. The effects of E2 were evaluated in the positive-feedback model of ovariectomized (OVX) rats treated with E2 (OVX+E2). The number of kisspeptin-ir neurons in the ARC was reduced in OVX+E2 compared with OVX rats. Similarly to proestrus, however, the percentage of kisspeptin-ir neurons expressing c-Fos was increased in OVX+E2 rats at 18:00 h. This response, as well as the LH surge, was blocked by the anti-estrogen tamoxifen. Moreover, the activation of kisspeptin neurons in OVX+E2 rats was positively correlated with the activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and inversely correlated with the expression of phosphorylated tyrosine hydroxylase (S<sup>40</sup>pTH) in the median eminence, used as an index of TIDA neuron activity. The effects of E2 on expression of KNDy genes in the ARC were determined using qPCR. E2 inhibited the expression of *Kiss1* and had no effect on *Nkb* mRNA. In contrast, OVX+E2 rats displayed an increased expression of *prodynorphin* (*Pdyn*) mRNA at 18:00 h, coinciding with the E2-induced LH and PRL surges. We then used transgenic rats expressing Cre-recombinase under the TH promoter to fill the cell bodies and dendrites of TIDA neurons with GFP, allowing

investigation of dynorphin and kisspeptin inputs onto these cells. OVX+E2 rats displayed more dynorphin-ir neurons in the ARC in opposition to less kisspeptin-ir cells. E2 also increased the number of dynorphin inputs on the soma and dendrites of TIDA neurons whereas decreased the kisspeptin ones. Thus, we provide evidence of a dual effect of E2 on the regulation of KNDy neurons. E2 reduces kisspeptin expression as part of the negative-feedback effect on LH. Concurrently, E2 induces an afternoon rise in the activity of KNDy neurons, higher expression of dynorphin and increased dynorphin inputs on TIDA neurons. These findings reveal a novel mechanism through which KNDy neurons may control the E2-induced PRL secretion.

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
1.1. Regulação do eixo hipotálamo-pituitária- gonadal (HPG) pelos esteroides ovarianos .....	15
1.2. Kisspeptina (Kp): regulador-chave do eixo HPG.....	17
1.3. Neurônios KNDy e a regulação da secreção de gonadotrofinas.....	20
1.4. Regulação da atividade dos neurônios KNDy.....	23
1.5. PRL: papel na reprodução e regulação neuroendócrina da sua secreção.....	27
1.6. Envolvimento dos neurônios KNDy no controle da secreção de PRL.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Animais.....	34
3.2. Planejamento experimental.....	34
3.3. Anestésicos, drogas e tratamentos hormonais.....	38
3.4. Processamento do cérebro para imunohistoquímica.....	39
3.5. Imunohistoquímica.....	40
3.6. Obtenção e análise das imagens.....	43
3.7. RT -PCR tempo real.....	44
3.8. ELISA para LH e PRL.....	46
3.9. Injeção estereotáxica de vetor viral adeno- associado (AAV- Brainbow) .....	48
3.10. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Atividade dos neurônios KNDy durante o ciclo estral de ratas e em machos.....	53
4.2. Papel do E2 sobre a atividade dos neurônios KNDy em fêmeas: correlação com a função neuronal dos neurônios GnRH e TIDA.....	58
4.3. Variação temporal de expressão dos genes <i>Kiss1</i> , <i>Nkb</i> e <i>Pdyn</i> no ARC de ratas OVX+E2.....	66
4.4. Modulação de neurónios TIDA pelo E2 em ratas TH-Cre.....	68
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	86

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. Regulação do eixo hipotálamo -pituitária -gonadal (HPG) pelos esteroides ovarianos**

O hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) é responsável pela produção e secreção de gonadotrofinas de origem hipofisária, e constitui uma via neuronal central no controle da reprodução em todas as espécies de mamíferos. A distribuição dos neurônios GnRH varia de acordo com a espécie. Em roedores, a maior densidade de neurônios GnRH localiza-se entre a banda diagonal de Broca e a porção rostral da área preóptica (APO) (Kawano & Daikoku, 1981), enquanto que em humanos estão localizados no hipotálamo médio- basal (King & Anthony, 1984). O GnRH é um decapeptídeo sintetizado em neurônios hipotalâmicos e liberado junto aos capilares do sistema porta-hipofisário na eminência mediana (EM), levando à síntese e liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise (Herbison, 2006; Christian & Moenter, 2010). A secreção pulsátil de GnRH é necessária para manutenção da fertilidade, uma vez que a administração contínua desse hormônio causa redução da atividade da adenohipófise e consequente infertilidade (Belchetz et al., 1978). As gonadotrofinas ativam a gametogênese e a síntese de esteroides pelas gônadas. Estes esteroides são capazes de regular sua própria secreção através de alças de retroalimentação, modulando assim a função dos neurônios GnRH, bem como a resposta da adenohipófise ao GnRH.

Na maior parte do ciclo reprodutivo de mamíferos, o estradiol (E2) atua via retroalimentação negativa ao nível hipotalâmico para reduzir a amplitude e frequência do pulso de GnRH e consequentemente a secreção de LH pela adenohipófise (Shupnik, 1996b, a). Em roedores, a fase do proestro é caracterizada pelos maiores níveis circulantes de E2, e, através do mecanismo de retroalimentação positiva, o E2 estimula a secreção de GnRH culminando no pico de LH e ovulação. Entretanto, os mecanismos neurobiológicos da alteração de retroalimentação negativa para retroalimentação positiva exercidos pelo E2 não são totalmente conhecidos. No momento da ocorrência

do pico pré ovulatório de LH, há maior ativação dos neurônios GnRH, vista a partir da expressão do gene *c-Fos*, um marcador de atividade neuronal (Hoffman et al., 1993a), o que comprova o envolvimento desses neurônios no controle central da reprodução. É descrita a existência de um padrão circadiano que regula a ovulação em muitas espécies de mamíferos, com destaque em roedores e possível influência também em humanos (Kerdelhue et al., 2002; Mahoney et al., 2004). Esse mecanismo circadiano é controlado pelo núcleo supraquiasmático que em ratos e camundongos é responsável pela sincronização do comportamento sexual, pico de LH e ovulação (Herbison, 2008).

Os mecanismos de feedback exercidos pelo E2 sobre a secreção de gonadotrofinas ocorrem principalmente via ativação do receptor clássico para estrógeno (ER) do tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Camundongos *Knockout* para ER $\alpha$  são inférteis, pois são incapazes de promover a gênese do pico de LH, ao passo que em camundongos *Knockout* para o subtipo  $\beta$  (ER $\beta$ ) o pico de LH induzido pelo E2 ocorre normalmente (Wintermantel et al., 2006). Vale notar ainda que, para ocorrência do feedback negativo do E2 também depende de ER $\alpha$ , embora nesse caso a ativação do receptor não demande transcrição gênica via ativação de elemento responsivo ao estrógeno (Glidewell-Kenney et al., 2007).

O tamoxifen é um modulador seletivo de ER e exerce efeitos estrogênicos ou anti-estrogênicos mistos dependendo do tecido -alvo, por meio da ligação à ER $\alpha$  ou ER $\beta$  (Riggs & Hartmann, 2003). Apesar das ações mistas exercidas pelo tamoxifen em diferentes tecidos, esta droga é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, propriedade esta extremamente útil em relação a outros anti-estrógenos puros, os quais não possuem esta característica (Yin et al., 2002). Adicionalmente, o tamoxifen é amplamente utilizado na medicina no tratamento e prevenção de câncer de mama dependente de E2 (Sainsbury, 2013). No entanto, o tamoxifen pode exercer ações estrogênicas no osso e também no útero (Riggs & Hartmann, 2003). Relatos demonstraram que o tratamento com tamoxifen causa redução na secreção de LH, bem como de prolactina (PRL) em ratas (Jordan et al., 1975; Donath & Nishino, 1998; Del

Bianco-Borges & Franci, 2015). Recentemente, dados do nosso grupo revelaram que o tamoxifen atua como antagonista de ER no hipotálamo, uma vez que inibiu os efeitos neurais do feedback positivo do E2, acarretando na redução da secreção de LH e também de PRL (Aquino et al., 2016). Logo, essas evidências denotam a importância do ER no controle da secreção das gonadotrofinas exercido pelo E2.

Sabidamente, os neurônios GnRH expressam somente ER $\beta$  em roedores (Herbison & Pape, 2001), enquanto as ações do E2 sobre o eixo reprodutivo parecem ser principalmente via ER $\alpha$  (Glidewell-Kenney et al., 2007). Isso indica que as ações do E2 sobre os neurônios GnRH devem ocorrer indiretamente, via neurônios intermediários, que expressem a isoforma ER $\alpha$ .

## **1.2. Kisspeptina (Kp): regulador -chave do eixo HPG**

No final da década de 1990, cientistas norte-americanos descreveram a existência de uma família de neuropeptídeos originários da expressão do gene *Kiss*, localizado no cromossomo 1 e, então, denominado *Kiss1* (Lee et al., 1996). A sua expressão foi observada inicialmente em células tumorais, nas quais apresentava a propriedade de suprimir metástase, portanto, o peptídeo codificado por este gene foi inicialmente denominado metastina (Lee et al., 1996; Lee & Welch, 1997). Posteriormente, a expressão do gene *Kiss1* foi também determinada na placenta bem como em outros tecidos, incluindo o sistema nervoso central (Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Mead et al., 2007).

O gene *Kiss1* codifica uma proteína composta por 145 aminoácidos biologicamente inativa, que é clivada proteoliticamente para produzir fragmentos menores biologicamente ativos compostos por 54, 14, 13 e 10 aminoácidos, denominados coletivamente de kisspeptinas (Kp) (West et al., 1998). Esses neuropeptídeos fazem parte de uma ampla família denominada de peptídeos RF amida, haja vista que os

peptídeos desta família compartilham uma sequência comum de arginina-fenilalanina-NH<sub>2</sub> em sua porção C-terminal, indispensáveis à sua atividade biológica (Tsutsui et al., 2010).

Embora a Kp tenha sido descrita inicialmente pela sua ação inibitória sobre células tumorais, ela atua via receptor acoplado à uma proteína G estimulatória, inicialmente denominado Gpr-54 (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001), o qual mais recentemente foi nomeado Kiss1r (Gottsch et al., 2009a). No sistema nervoso central, o Kiss1r é amplamente expresso no hipotálamo, bem como em regiões corticais e subcorticais (Lee et al., 1999; Herbison et al., 2010). Recentemente, foi descrita a expressão deste receptor no núcleo arqueado (ARC) de ratas, principalmente em neurônios proopiomelanocortina (POMC) e em menor proporção em neurônios tuberoinfundibular dopaminérgicos (TIDA) (Higo et al., 2016). Ainda, este receptor é também encontrado em tecidos periféricos tais como placenta e gonadotrofos hipofisários (Muir et al., 2001; Richard et al., 2008; Richard et al., 2009).

A sinalização Kp -Kiss1r é essencial para manutenção das funções reprodutivas em diferentes espécies (Pinilla et al., 2012). Grupos distintos de pesquisadores relataram que mutações que causavam perda de função do Kiss1r estavam associadas à ocorrência de hipogonadismo-hipogonadotrófico em humanos e camundongos, caracterizado pela deficiência na secreção de LH e FSH, retardo na maturação da função reprodutiva e infertilidade (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). Desta forma, aventou-se que a sinalização Kp -Kiss1r seria essencial para o aumento da secreção de gonadotrofinas durante a puberdade e o estabelecimento da função reprodutiva em mamíferos (d'Anglemont de Tassigny & Colledge, 2010).

A Kp exerce potente efeito estimulatório sobre a liberação de LH em diversas espécies (Gottsch et al., 2004; Dhillon et al., 2005; Navarro et al., 2005; Shahab et al., 2005), sendo considerada um regulador -chave do eixo HPG. Sabidamente, os neurônios kisspeptinérgicos enviam projeções para os neurônios GnRH e experimentos

demonstraram que a administração central ou periférica de Kp exerce um potente efeito estimulatório sobre a secreção de gonadotrofinas em roedores (Gottsch et al., 2004; Irwig et al., 2004; Navarro et al., 2004; Navarro et al., 2005). Observações similares foram feitas em ovelhas (Smith et al., 2009), macacos (Shahab et al., 2005) e humanos (Dhillon et al., 2005). Nesse sentido, foi demonstrado que os neurônios GnRH expressam Kiss1r e são altamente responsivos à Kp (Irwig et al., 2004; Han et al., 2005; Messenger, 2005; Messenger et al., 2005).

Assim como a distribuição de neurônios GnRH, a distribuição dos neurônios kisspeptinérgicos no hipotálamo varia de acordo com a espécie. Em roedores, estes neurônios estão localizados majoritariamente no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) da APO e no núcleo ARC do hipotálamo (Gottsch et al., 2004; Clarkson et al., 2009). A população de neurônios kisspeptinérgicos do AVPV é sexualmente dimórfica, sendo maior em fêmeas do que em machos, ao passo que o mesmo parece não ocorrer no núcleo ARC (Kauffman et al., 2007; Xu et al., 2012). Em oposição aos neurônios GnRH, as duas populações de neurônios kisspeptinérgicos expressam tanto ER $\alpha$  quanto ER $\beta$  (Smith et al., 2005a), o que os torna importantes candidatos ao papel de interneurônios na via de ativação dos neurônios GnRH pelo E2. Entretanto, o E2 atua de maneira diferenciada nesses dois núcleos, pois estimula a expressão de *Kiss1* no AVPV e a inibe no ARC (Kauffman et al., 2007; Gottsch et al., 2009b). Essa regulação diferencial tem sido o fator determinante na hipótese vigente que propõe duas populações funcionalmente distintas de neurônios kisspeptinérgicos em relação aos efeitos dos esteroides ovarianos no controle da secreção de LH, i.e., neurônios do AVPV, envolvidos no mecanismo de feedback positivo, e neurônios do ARC, envolvidos no mecanismo de feedback negativo (Pinilla et al., 2012). De fato, uma importante participação dos neurônios do AVPV na gênese do pico de LH induzido pelos esteroides ovarianos, responsável pela deflagração da ovulação em fêmeas tem sido demonstrada (Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2008). Por outro lado, como discutido adiante, existe

ainda grande controvérsia na literatura quanto à regulação dos neurônios kisspeptinérgicos do ARC.

### **1.3. Neurônios KNDy e a regulação da secreção de gonadotrofinas**

Ao contrário dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV, os neurônios do ARC de diversas espécies de mamíferos co -expressam três neuropeptídeos: Kp, Neurocinina B (NKB) e Dinorfina (Dyn) A, e, desta forma, receberam a denominação de neurônios KNDy (Goodman et al., 2007; Navarro et al., 2009; Lehman et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010). Kp e NKB também colocalizam -se no núcleo infundibular em humanos, que é um núcleo correspondente ao núcleo ARC de roedores (Rance, 2009), entretanto, a co -expressão de Dyn nestes neurônios ainda não foi demonstrada em humanos (Hrabovszky et al., 2012; Skrapits et al., 2015). Observações neuroanatômicas identificaram que esses neurônios apresentam alto grau de colocalização com receptor de progesterona (PR) (Foradori et al., 2002), receptor de andrógenos (AR) (Smith et al., 2005b) e também ER $\alpha$  (Smith et al., 2005a; Franceschini et al., 2006).

Fibras kisspeptinérgicas projetam-se aos neurônios GnRH em diferentes espécies de mamíferos como ovelhas, ratos, camundongos, macacos e humanos (Kinoshita et al., 2005; Ciofi et al., 2006; Clarkson & Herbison, 2006). Podem ocorrer aposições entre neurônios KNDy e neurônios GnRH tanto na APO, onde estão os corpos celulares de neurônios GnRH, quanto nos terminais dos GnRH localizados na EM. Entretanto, enquanto em ovinos há descrição de contatos de fibras KNDy com os corpos celulares dos neurônios GnRH (Cernea et al., 2015), em roedores, evidências indicam que os neurônios KNDy se projetam principalmente para os terminais de neurônios GnRH na EM (True et al., 2011; Yip et al., 2015), onde a Kp é capaz de estimular a atividade elétrica dos neurônios GnRH (d'Anglemont et al., 2008; Glanowska & Moenter, 2015). Assim, essas evidências sugerem que os neurônios kisspeptinérgicos tanto do AVPV quanto do ARC podem influenciar a atividade dos neurônios GnRH atuando diretamente

ao nível do corpo celular e/ou terminais neurosecretórios na EM. Entretanto, as funções fisiológicas dos neurônios KNDy são ainda pouco conhecidas. Há evidências de que eles sejam importantes no controle da secreção pulsátil de LH em diversas espécies de mamíferos (Navarro et al., 2009; Jayasena et al., 2014; Han et al., 2015), mas também parecem estar envolvidos na regulação de neurotransmissores não diretamente relacionados aos neurônios GnRH, tais como a dopamina e neuropeptídeos do núcleo ARC (Backholer et al., 2010; Fu & van den Pol, 2010; Szawka et al., 2010).

As taquicininas são uma família de neuropeptídeos, as quais incluem entre outros peptídeos, a substância P, neurocinina A (NKA) e a NKB. A substância P e a NKA são neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso periférico envolvidos em diversas funções fisiológicas e processos fisiopatológicos, tais como processamento da dor e inflamação nos tecidos periféricos, hematopoiese, tromboembolismo venoso, tendinopatia, etc (Onaga, 2014). Estes neuropeptídeos parecem estar envolvidos também no controle central da reprodução, já que são capazes de ativar os neurônios kisspeptinérgicos em camundongos machos (de Croft et al., 2013). Entretanto, esta ação sobre os neurônios kisspeptinérgicos não foi descrita em fêmeas. Por sua vez, a NKB é um dos neuropeptídeos co-expressos nos neurônios KNDy e possui importante função na regulação da secreção de gonadotrofinas em mamíferos (Rance, 2009; Rance et al., 2010; Goodman et al., 2013). A NKB é a única taquicinina sintetizada a partir da preprotaquicinina-B e o gene precursor dessa proteína é nomeado *TAC3* em humanos e *Tac3* ou *Tac2* em primatas não-humanos (Rance et al., 2010) o qual devido a variabilidade nomenclaturas denominaremos de *Nkb* neste trabalho. A NKB exerce suas funções preferencialmente por meio da ligação ao receptor NK3R, codificado pelo gene *TAC3R* (Almeida et al., 2004). Em roedores, o NK3R é expresso tanto nos neurônios KNDy quanto nos terminais dos neurônios GnRH localizados na EM (Krajewski et al., 2005; Burke et al., 2006; Navarro et al., 2009).

De maneira similar à Kp, a NKB tem emergido como importante regulador do

controle central da função reprodutiva. Pesquisadores descreveram que mutações nos genes que codificam a NKB ou seu receptor causam hipogonadismo hipogonadotrófico e infertilidade em humanos (Topaloglu et al., 2009). Efeitos transitórios de perda de função reprodutiva foram identificados em camundongos com mutações no gene *Tac3r* (Yang et al., 2012). Todavia, há trabalhos que descrevem tanto uma ação estimulatória da NKB sobre a secreção de LH em ratos, ovelhas e macacos (Billings et al., 2010; Navarro et al., 2011) quanto uma ação inibitória (Navarro et al., 2009; Kinsey-Jones et al., 2012), o que torna bastante contraditória a função desse neuropeptídeo na regulação da secreção de LH. Importante notar, entretanto, que o efeito da NKB sobre a secreção de LH é modulado pelos esteroides sexuais e parece depender da presença de Kp/Kiss1r (Navarro et al., 2015).

O outro neuropeptídeo co-expresso nos neurônios KNDy é a Dyn A, que é um opioide endógeno originária da expressão do gene prodinorfina (*Pdyn*), o qual codifica também Dyn B e endorfina (Zamir et al., 1984b). Estes peptídeos participam da regulação de diversas funções fisiológicas, tais como reprodução, regulação cardiovascular, balanço hídrico e termorregulação (Smith & Gallo, 1997; Naqvi et al., 1998; Goodman et al., 2004). As Dyn A e B são diferenciadas entre si pela quantidade de aminoácidos, sendo a primeira um fragmento biologicamente ativo com menor comprimento (Zamir et al., 1984b). Este neuropeptídeo está expresso em diversas regiões cerebrais (Weber et al., 1982a; Weber et al., 1982b; Zamir et al., 1984a), incluindo o núcleo ARC, onde residem os neurônios KNDy (Lehman et al., 2010). A Dyn A atua no eixo reprodutivo inibindo a secreção de LH, através da ligação preferencial aos receptores  $\kappa$ -opioides (KOR) (Chavkin et al., 1982), os quais também são expressos nos neurônios KNDy (Navarro et al., 2009). O bloqueio da sinalização Dyn /KOR, por meio da utilização de nor-binaltorphimine (nor-BNI), antagonista de KOR, gera um aumento da amplitude e da frequência dos pulsos de LH em ovelhas (Goodman et al., 2004), durante a gestação de ratas (Gallo, 1990; Zhen & Gallo, 1992) e também

promove a antecipação da puberdade em ratas (Nakahara et al., 2013). As conexões entre Dyn e neurônios GnRH foram visualizadas no hipotálamo médio-basal e APO de ovelhas (Goodman et al., 2004) e de humanos (Dahl et al., 2009). Porém, em roedores, o contato sináptico entre Dyn e neurônios GnRH ocorre somente na EM (True et al., 2011). A expressão de KOR em neurônios GnRH varia de acordo com a espécie. Em roedores, não foi encontrada a expressão de KOR nos terminais dos neurônios GnRH (Mitchell et al., 1997; Sannella & Petersen, 1997), enquanto que em ovinos foi descrita recentemente a expressão de KOR nestes neurônios (Weems et al., 2016).

Desde a década de 1980, vários estudos demonstraram a potente ação estimulatória dos opioides endógenos, dentre eles a Dyn, sobre a secreção de PRL em diferentes espécies de mamíferos (Van Vugt et al., 1981; Leadem & Kalra, 1985; Gilbeau et al., 1986; Bero et al., 1987; Petraglia et al., 1987). Sabidamente, os terminais da Dyn estão próximos aos neurônios TIDA no ARC (Fitzsimmons et al., 1992), região onde é descrita a expressão de KOR (Mansour et al., 1994; Stathopoulos et al., 2016) e secretam dopamina (Ben-Jonathan et al., 1977), neurotransmissor inibitório da via de secreção da PRL. Desse modo, os opioides endógenos, dentre eles a Dyn, reduz a liberação dopamina, via inibição dos neurônios TIDA, o que resulta no aumento da secreção de PRL. A gestação e a lactação são condições fisiológicas conhecidas em que a Dyn reduz a atividade dos neurônios TIDA, o que possibilita o aumento da secreção de PRL em ratas (Hou & Voogt, 1999; Andrews & Grattan, 2003; Zhang et al., 2004). Portanto, a K $\mu$ , NKB e a Dyn A devem agir de modo integrado no controle da secreção de LH e PRL em mamíferos. Entretanto, é necessário elucidar as vias pelas quais estes neuropeptídeos atuam no controle da reprodução, e também esclarecer melhor a regulação neuroendócrina dos neurônios KNDy pelo E2 em ratas.

#### **1.4. Regulação da atividade dos neurônios KNDy**

O E2 é reconhecido como um importante regulador da função dos neurônios KNDy, por meio da ligação aos receptores ER $\alpha$  expressos nesses neurônios (Smith et al., 2005a). Estudos de hibridização *in situ* de diferentes grupos demonstraram que o E2 reduz os níveis de RNAm do gene *Kiss1* no ARC de roedores machos e fêmeas (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b; Kauffman et al., 2007), o que sugere o envolvimento do núcleo ARC no controle da secreção pulsátil das gonadotrofinas e sítio de feedback negativo do E2. Sabe-se que a injeção do antagonista de Kp intra-ARC inibe a secreção pulsátil de LH (Li et al., 2009) e que a ativação optogenética dos neurônios KNDy promove a secreção pulsátil de LH de forma dependente de Kiss1r (Han et al., 2015). Entretanto, os achados são conflitantes quanto ao efeito do E2 sobre a expressão do peptídeo, sendo observados tanto diminuição (Araujo-Lopes et al., 2014) quanto aumento (Brock & Bakker, 2013) da expressão de Kp em fêmeas tratadas com E2. É provável que tais controvérsias estejam relacionadas à difícil interpretação dos resultados de variação da imunoreatividade a peptídeos no sistema nervoso central. Assim um aumento da expressão de Kp pode significar uma maior produção do peptídeo ou, por outro lado, inibição da sua liberação sináptica.

A participação dos neurônios KNDy na gênese do pico de LH induzido pelo E2 permanece controversa na literatura. Foi descrito que durante a tarde de proestro, momento que ocorre o pico pré-ovulatório de LH, ratas apresentaram um aumento na atividade dos neurônios KNDy, determinada pela maior expressão de c-Fos em neurônios kisspeptinérgicos. Desse modo, os neurônios KNDy se projetam para a APO, sítio do feedback positivo do E2, estimulando assim a liberação de Kp e conseqüentemente o pico das gonadotrofinas (Kinoshita et al., 2005). Em contrapartida, foi descrito uma ação estimulatória do E2 sobre a atividade dos neurônios kisspeptinérgicos somente no AVPV de ratas e essa ativação foi temporalmente associada ao pico pré-ovulatório de LH (Smith et al., 2006). Desta forma o papel destes neurônios no feedback positivo do E2 permanece ainda controverso.

Interessantemente, em ovelhas, os neurônios KNDy parecem estar envolvidos na mediação dos efeitos do E2 tanto inibitórios quanto estimulatórios sobre a secreção de LH (Merkley et al., 2012).

Assim como os neurônios kisspeptinérgicos, os neurônios NKB também expressam receptor para ER $\alpha$  em ratos (Burke et al., 2006), ovelhas (Goubillon et al., 2000) e humanos (Rance & Young, 1991), o que indica que o E2 pode atuar diretamente sobre a regulação da expressão deste neuropeptídeo. Estudos em ratos têm documentado a modulação da expressão de *Nkb* pelo E2 durante o ciclo estral (Rance & Bruce, 1994). Adicionalmente, a ovariectomia aumenta a expressão de *Nkb* no ARC de macacos (Sandoval-Guzman & Rance, 2004) e camundongos (Kauffman et al., 2009; Navarro et al., 2009), enquanto que a reposição com E2 reduz a expressão desse gene em diferentes espécies, inclusive em mulheres após a menopausa (Rance & Bruce, 1994; Abel et al., 1999; Pilon et al., 2003; Navarro et al., 2009; Rance, 2009). Entretanto o efeito supressor do E2 sobre a expressão de *Nkb* parece depender dos níveis circulantes deste hormônio, uma vez que em camundongos foi demonstrado efeito para altas doses, mas não baixas doses de E2 (Gill et al., 2012). A supressão da expressão de *Nkb* pelo E2 não ocorre em camundongos *Knockout* para ER $\alpha$ , o que demonstra a importância desse receptor nesse mecanismo (Dellovade & Merchenthaler, 2004). Ainda, há evidências da existência de dimorfismo sexual dos neurônios NKB em ovelhas (Goubillon et al., 2000), ratos (Ciofi et al., 2006; Overgaard et al., 2014) e camundongos (Kauffman et al., 2009). Em ratos, há densas projeções dos neurônios NKB para os vasos sanguíneos na EM em machos, ao passo que essas redes são mais difusas em fêmeas (Ciofi et al., 2006). Em camundongos fêmeas pré-púberes, foi observado um aumento na expressão gênica de *Nkb* após a gonadectomia, porém em machos essa resposta somente ocorreu após o início da puberdade (Dellovade & Merchenthaler, 2004).

Assim como o E2, a progesterona possui uma importante participação no

mecanismo de feedback negativo. Vários estudos apontam a Dyn A como neuropeptídeo responsável por mediar os efeitos inibitórios da progesterona sobre a secreção de gonadotrofinas, principalmente em ovelhas e primatas (Karsch, 1987; Goodman et al., 2004), o que é coerente com o fato de os neurônios KNDy expressarem PR (Foradori et al., 2002). A ação do E2 sobre a expressão de Dyn A é bastante controversa. Em ovelhas castradas, onde níveis plasmáticos de E2 e progesterona são sabidamente baixos, há uma redução do RNAm de *Pdyn* no ARC, os quais não são restaurados pelo tratamento apenas com progesterona (Foradori et al., 2005). De forma correlata, a expressão de *Pdyn* em mulheres após a menopausa é reduzida no núcleo infundibular (Rometo & Rance, 2008). Em camundongos, as expressões gênicas de *Prodyn* e de KOR parecem ser inibidas pelos esteroides ovarianos no ARC (Gottsch et al., 2009b; Navarro et al., 2009), porém ainda é necessário elucidar melhor esse efeito em ratos.

Estudos recentes demonstraram que a lesão dos neurônios KNDy promove um aumento da amplitude do pico de LH induzido pelo E2 em ratas (Helena et al., 2015; Mittelman-Smith et al., 2016). KOR são expressos na APO (Mansour et al., 1988) mas aparentemente não em neurônios GnRH (Mitchell et al., 1997) e a lesão dos neurônios KNDy aumentou a expressão de Kp na APO (Helena et al., 2015). Estes trabalhos fornecem importantes evidências da ação inibitória da Dyn A sobre a secreção de LH em ratas, uma vez que após a lesão desses neurônios supostamente reduziu o *input* de Dyn no AVPV, onde residem os neurônios kisspeptinérgicos responsáveis pelo pico das gonadotrofinas. Além disso, a lesão dos neurônios KNDy causou hipogonadismo hipogonadotrófico em ratas, caracterizado por baixos níveis plasmáticos de LH, aciclicidade, atrofia uterina e ovariana (Mittelman-Smith et al., 2016). Portanto, os neurônios KNDy exercem importantes ações no controle da reprodução e são cruciais para a secreção tônica de LH e ciclicidade estral em ratas.

### **1.5. PRL: papel na reprodução e regulação neuroendócrina da sua secreção**

A PRL é um hormônio polipeptídico secretado pelos lactotrofos adenohipofisários, sendo reconhecida inicialmente pelo seu papel na estimulação do desenvolvimento da glândula mamária e indução da lactação em coelhas (Riddle et al., 1933). No sistema reprodutor feminino, a PRL é responsável por regular funções ovarianas como a esteroidogênese e a formação do corpo lúteo, além de modular a expressão dos receptores para LH e a ação das gonadotrofinas (Kelly et al., 1991). Em machos, a PRL estimula a atividade normal de glândulas secretoras, como a próstata (Costello & Franklin, 1994), e parece estar envolvida na manutenção da morfologia celular dos testículos (Nag et al., 1981) e do número de receptores para LH nas células de Leydig (Dombrowicz et al., 1992).

Os níveis circulantes de PRL aumentam em resposta a diversos fatores estimulatórios, tais como, o estímulo de sucção do mamilo durante a lactação (Terkel et al., 1972), diversos estímulos estressores (Gala, 1990), níveis circulantes de esteroides ovarianos (Neill, 1972) e a estimulação do cérvix uterino durante a cópula (Smith et al., 1976). A maioria das ações biológicas da PRL no eixo reprodutivo se dá mediante ativação de receptores para PRL (PRL-R). A expressão de RNAm para PRL-R no cérebro de ratas aumenta durante as fases de proestro e estro, concomitantemente ao aumento da secreção de PRL. A ovariectomia reduz, enquanto o tratamento com E2 aumenta a expressão desses receptores no cérebro, o que indica ação estimulatória do E2 sobre a secreção de PRL, bem como seu receptor (Sugiyama et al., 1994).

A mutação deletéria do PRL-R em camundongos bloqueia a secreção de progesterona pelo corpo lúteo e, conseqüentemente a implantação do embrião, causando infertilidade (Grosdemouge et al., 2003). Por outro lado, a hiperprolactinemia, condição caracterizada por secreção cronicamente elevada de PRL, é uma das principais causas de infertilidade tanto em mulheres quanto em homens (Molitch, 2010). A etiologia de hiperprolactinemia pode ser fisiológica, farmacológica ou patológica. As

causas fisiológicas incluem estresse crônico, gestação e lactação. A hiperprolactinemia farmacológica resulta da utilização de drogas antipsicóticas ou antidepressivas, enquanto as condições patológicas incluem principalmente tumores hipotalâmicos e hipofisários.

A secreção de PRL é tonicamente inibida pela dopamina liberada por neurônios hipotalâmicos, reconhecidamente o mais importante hormônio regulador da secreção de PRL (Ben-Jonathan et al., 1977). A dopamina está presente em altas concentrações tanto na EM (Fuxe, 1965), quanto no plasma do sistema porta-hipofisário (Ben-Jonathan et al., 1977; Gibbs & Neill, 1978). A dopamina exerce suas funções inibitórias através da ligação aos receptores de dopamina do tipo D2 localizados nos lactotorofos adenohipofisários (Meador-Woodruff et al., 1989). Três populações distintas de neurônios, de acordo com a localização anatômica dos corpos celulares e seus respectivos terminais, fornecem dopamina à adenohipófise. Os neurônios TIDA, estão localizados na porção dorsomedial do ARC e projetam-se para a zona externa da EM (Kawano & Daikoku, 1987); os neurônios do sistema tuberohipofiseal dopaminérgico (THDA), localizados no ARC rostral, com projeções para os lobos intermediário e neural da hipófise (Holzbauer & Racke, 1985), e os neurônios do sistema periventricular hipofiseal dopaminérgico (PHDA), que estão localizados no núcleo periventricular do hipotálamo e projetam-se exclusivamente para o lobo intermediário (Goudreau et al., 1995).

Os neurônios TIDA expressam PRL-R e são os principais fornecedores de dopamina à adenohipófise. Com efeito, a PRL se liga a estes receptores, o que ativa a cascata de sinalização intracelular nestes neurônios (Brown et al., 2010). Dessa forma, a PRL é capaz de regular sua própria secreção por um mecanismo de feedback negativo de alça curta, que aumenta a atividade dos neurônios TIDA (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

O mecanismo envolvido no efeito da PRL sobre a liberação de LH é ainda pouco conhecido, mas aparentemente envolve a supressão da liberação de GnRH (Bouchard et al., 1985; Sarkar & Yen, 1985). Todavia, apenas uma pequena fração dos neurônios GnRH apresenta PRL-R (Kokay et al., 2011). Assim é provável que este efeito inibitório da PRL ocorra através da modulação de neurônios aferentes aos neurônios GnRH, como por exemplo, via inibição dos neurônios KNDy (Araujo-Lopes et al., 2014).

#### **1.6. Envolvimento dos neurônios KNDy no controle da secreção de PRL**

Além do seu papel no controle da secreção das gonadotrofinas, os neurônios KNDy parecem participar também da regulação da secreção de PRL. É sabido que terminais dinorfinérgicos contraem sinapse com neurônios TIDA em ratos (Fitzsimmons et al., 1992) e camundongos (Zhang & van den Pol, 2015), sendo esta via funcionalmente relevante para o controle da secreção de PRL (Arbogast & Voogt, 1998; Andrews & Grattan, 2003; Tavakoli-Nezhad & Arbogast, 2010). Durante a lactação há uma redução da expressão de *Kiss1* no ARC, mas não no AVPV, período que caracteriza -se por alta secreção de PRL (Yamada et al., 2007; Yamada et al., 2012). Neste sentido, dados de nosso grupo demonstram que a injeção intracerebroventricular (icv) de Kp-10 estimula a secreção de PRL em ratos machos e fêmeas via inibição dos neurônios TIDA, os quais apresentam íntimo contato com terminais de neurônios KNDy (Szawka et al., 2010). Demonstramos ainda que a PRL é capaz de reduzir a expressão dos neurônios KNDy, indicando um novo mecanismo de regulação destes neurônios (Araujo-Lopes et al., 2014). Adicionalmente, a conexão sináptica entre terminais dos neurônios KNDy e neurônios TIDA foi, de fato, confirmada através de microscopia eletrônica (Sawai et al., 2012). Estudo recente demonstrou que a lesão neuroquímica parcial da população de neurônios KNDy promoveu redução da magnitude do pico de PRL induzido por E2 em ratas OVX+E2, enquanto este pico de PRL não foi alterado pela injeção icv de nor -BNI, antagonista de KOR (Stathopoulos et al., 2016).

Assim, considerando-se as lacunas existentes quanto ao papel dos neurônios KNDy no controle da secreção de PRL e LH, este trabalho se propôs a investigar o efeito do E2 sobre diferentes parâmetros da função dos neurônios KNDy em ratos machos e fêmeas, como possível mecanismo neuroendócrino de controle da secreção hormonal. Nossa hipótese é que os neurônios KNDy poderiam mediar os efeitos do E2 sobre a atividade dos neurônios TIDA e, desta forma, participar no controle da secreção PRL induzida por E2. As informações obtidas sobre a fisiologia destes neurônios certamente fornecerão informações importantes sobre o controle neuroendócrino da reprodução, e poderão revelar mecanismos com potencial de serem utilizados no controle da fertilidade.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo geral

Considerando-se a importância dos neurônios KNDy no controle da reprodução, este trabalho pretendeu investigar a regulação hormonal da função dos neurônios KNDy pelo E2, bem como avaliar o papel diferencial da Kp e da Dyn A no controle e secreção de PRL em ratas.

## 2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a expressão de c-Fos em neurônios KNDy durante o ciclo estral da rata;
- 2) Avaliar a possível existência de diferença sexual na expressão de c-Fos em neurônios KNDy em ratos;
- 3) Avaliar o efeito do E2 sobre a expressão de c-Fos em neurônios KNDy, GnRH e atividade dos neurônios TIDA no modelo de ratas OVX e OVX+E2;
- 4) Avaliar a participação do ER na ativação dos neurônios KNDy induzida por E2;
- 5) Avaliar os níveis do RNAm de *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* no ARC de ratas OVX+E2 ao longo do dia, e correlacioná-los com a variação nas secreções de PRL e LH;
- 6) Avaliar a expressão de Kp e Dyn A em ratas OVX e OVX+E2 TH-Cre por meio de imunofluorescência;
- 7) Avaliar o efeito do E2 sobre a densidade de *inputs* Kp e Dyn no soma e dendritos dos neurônios TIDA em ratas TH-Cre, após a injeção de um vetor viral que expressa Brainbow (proteínas multi- fluorescentes).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas (2 -3 meses) provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de quatro por caixa (39 x 32 x 17 cm) e mantidos em ambiente de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luz (12:00 h claro / 12:00 h escuro; luzes acesas às 06:00 h) controladas, com água e ração *ad libitum*. No experimento 1, o ciclo estral das ratas foi monitorado através de lavados vaginais diários durante 2 semanas e aquelas que apresentaram ciclo estral regular foram perfundidas nas fases de diestro (D), proestro (P) e estro (E). Nos demais experimentos, somente as ratas que apresentaram pelo menos 2 ciclos regulares foram OVX. No experimento 4, utilizou-se ratas transgênicas TH-Cre adultas (3-5 meses de idade) onde a transcrição da enzima Cre-recombinase é conduzida pelo promotor TH *upstream* ao gene Cre (Witten et al., 2011), para estudar os *inputs* aferentes nos neurônios TIDA. Estes animais foram obtidos da Universidade de Stanford, Califórnia, EUA e criados na Unidade de Recursos Animais Taieri na Universidade de Otago, Dunedin, Nova Zelândia. A linha de rato foi mantida num fundo heterozigoto por retrocruzamento com ratos Long Evans *wild-type*. Os animais foram mantidos em um ambiente com condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e luz (luzes acesas de 6:00 h às 18:00 h), com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG Gerais (Protocolo nº: 83/2014) e University of Otago Animal Ethics Committee. Em todos os experimentos foram estudados 4 -8 animais em cada grupo experimental.

### 3.2. Planejamento Experimental

*Experimento 1: Avaliação da atividade dos neurônios KNDy em ratas ciclando e ratos machos*

O ciclo estral de ratas é controlado por uma cascata de eventos neuroendócrinos onde há ativação do eixo HPG para o controle da atividade gonadal. Sabe-se que em ratas ciclando o pico pré-ovulatório de LH ocorre na tarde do proestro e coincide com um pico de secreção de PRL (Smith et al., 1975). Dados contraditórios são descritos na literatura no que se refere à ativação dos neurônios KNDy no momento da ocorrência do pico- pré-ovulatório de LH (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2006). O mesmo se dá quanto a existência de dimorfismo sexual na população de neurônios KNDy, pois a avaliação dos níveis de RNAm de *Kiss1* sugere não haver diferença entre os sexos (Kauffman et al., 2007), enquanto a expressão do peptídeo para Kp é relatada ser maior em fêmeas do que em machos adultos (Overgaard et al., 2013). Desse modo, este experimento avaliou o efeito dos esteroides ovarianos sobre a atividade dos neurônios KNDy em fêmeas ciclando e em machos. Foram utilizadas ratas que apresentaram pelo menos 2 ciclos regulares consecutivos. As ratas foram perfundidas no período da manhã (entre 10:00 e 12:00 h) nos dias de diestro (D; n = 6), proestro (P-10; n = 6), estro (E; n = 6), e também à tarde (18:00 h) no proestro (P-18; n = 5), momento da ocorrência dos picos LH e PRL (Smith et al., 1975; Szawka et al., 2009). Ratos machos foram perfundidos no período da manhã (entre 10:00 e 12:00 h; M-10; n = 7) e à tarde (18:00 h; M-18; n = 7). Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca imediatamente antes da perfusão para dosagem das concentrações plasmática de LH por ELISA. O útero foi removido e pesado como parâmetro de controle. Os cérebros foram processados para dupla marcação imunohistoquímica de c-Fos (anti-c-Fos Ab-5, Calbiochem) e Kp ou Fos (anti-Fos K-25, Santa Cruz) e Kp no núcleo ARC. A marcação simples de Kp por imunohistoquímica foi utilizada como índice da expressão do peptídeo. A dupla -marcação com c-Fos ou Fos foi utilizada para avaliar a atividade dos neurônios KNDy, fornecendo inferência sobre a liberação de Kp.

*Experimento 2: Avaliação da atividade dos neurônios KNDy em modelo de ratas OVX+E2*

O E2 é sabidamente importante para regular a função dos neurônios KNDy. Entretanto, os achados são conflitantes quanto ao efeito do E2 sobre a expressão do peptídeo, sendo observados tanto diminuição (Araujo-Lopes et al., 2014) quanto aumento (Brock & Bakker, 2013) da expressão de Kp em fêmeas tratadas com E2. Utilizamos no estudo um modelo de ratas OVX+E2 que reproduz os picos de LH e PRL induzidos por E2 (Szawka et al., 2009; Aquino et al., 2016). Assim, este experimento avaliou o efeito do E2 sobre a ativação dos neurônios KNDy e a relação desta com a atividade dos neurônios GnRH e neurônios TIDA em ratas. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com óleo de milho (OVX; n = 8 por grupo) ou E2 (OVX+E2; n = 7 por grupo), diariamente durante três dias, e foram perfundidas às 8:00 ou 18:00 h no quarto dia. Sabe-se que a ação do E2 sobre a secreção pulsátil ou sobre o pico pré-ovulatório de LH é dependente da ativação do ER $\alpha$  em neurônios não -GnRH (Wintermantel et al., 2006; Glidewell-Kenney et al., 2007). Assim, para confirmar o envolvimento de ER sobre a ativação dos neurônios KNDy, um grupo adicional de ratas OVX+E2 foi co-tratado durante 3 dias com tamoxifen (OVX+E2+TX; n = 8) e perfundido às 18:00 h no quarto dia. O tamoxifen é um modulador seletivo de ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Riggs & Hartmann, 2003) e estudos recentes de nosso grupo demonstraram que ele atua como antagonista de ER no hipotálamo (Aquino et al., 2016). As concentrações plasmáticas de LH foram determinadas em amostras de sangue obtidas na perfusão pelo método ELISA. O útero foi removido e pesado para controle da eficácia do tratamento de E2. Os cérebros foram processados para dupla marcação imunohistoquímica de c-Fos e Kp no ARC e c-Fos e GnRH na APO, e marcação simples para tirosina hidroxilase (TH) ou TH fosforilada na serina40 (S<sup>40</sup>p TH) na EM.

*Experimento 3: Avaliação temporal do efeito do E2 sobre a expressão dos genes Kiss1, Nkb e Pdyn no ARC de ratas*

Embora as funções fisiológicas dos neurônios KNDy sejam ainda pouco conhecidas, acredita-se que os três peptídeos produzidos por estes neurônios sejam importantes para o controle da secreção pulsátil de LH (Navarro et al., 2009; Goodman et al., 2013). Em contrapartida, o envolvimento destes neurônios no mecanismo de feedback positivo do E2 sobre o pico de LH e pico secundário de PRL permanece contraditório na literatura (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2006). Desse modo, este experimento avaliou os níveis de RNAm de *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* no ARC em 2 momentos ao longo do dia no modelo de ratas OVX+E2, a fim de se investigar o envolvimento diferencial dos três peptídeos na gênese dos picos de LH e PRL induzidos por E2. Ratas ovariectomizadas foram tratadas com óleo (OVX; n = 8) ou estradiol (OVX+E2; n = 8 por grupo), durante 3 dias, e foram decapitadas às 8:00 ou 18:00 h do quarto dia. Os cérebros foram rapidamente coletados e congelados em gelo seco. O núcleo ARC foi microdissecado utilizando-se a técnica de *punch* (Palkovits, 1973; Szawka et al., 2009) e processado para análise do RNAm de *Kiss-1*, *Nkb* e *Pdyn* por RT-PCR em tempo real. Amostras de sangue foram colhidas para dosagem hormonal de LH e PRL por ELISA.

*Experimento 4: Modulação dos neurônios TIDA pelos inputs de Kp e Dyn A em ratas OVX+E2*

É sabido que os neurônios KNDy enviam projeções aos neurônios TIDA (Szawka et al., 2010; Sawai et al., 2012), e estão envolvidos no controle da secreção de PRL em ratos. Entretanto, ainda não está claramente descrita a participação de cada um dos neuropeptídeos no pico de PRL induzido pelo E2. Assim, este experimento teve como objetivos investigar os efeitos do E2 sobre a expressão de Kp e Dyn no ARC e sobre a densidade de *inputs* de Kp e Dyn em neurônios TIDA. Foram utilizadas ratas fêmeas Long Evans TH-Cre recombinase, nas quais a enzima Cre é expressa exclusivamente

em neurônios TH (Witten et al., 2011). Foi utilizado um vetor viral adeno-associado transportando cassetes EYFP e TagBFP “farneciladas” em orientação reversa entre os sítios loxP mutantes (AAV-Brainbow: AAV9.hEF1a.lox.TagBFP.lox.eYFP.lox.WPRE.hGH-InvBYF;  $2.78 \times 10^{13}$  GC/mL stock; Penn Vector Core, Pennsylvania, EUA) para induzir a expressão destas proteínas fluorescentes exclusivamente em neurônios TH com expressão de Cre (Cai et al., 2013). O AAV-Brainbow foi injetado unilateralmente utilizando-se um estereotáxico (500 nL de estoque viral) no núcleo ARC (Bregma -2,7 mm posterior,  $\pm 0,3$  mm lateral e -9,3 mm ventral para dura) em ratas TH-Cre adultas (n = 4 por grupo) sob 3% de anestesia com isoflurano. Em experimentos pilotos, a especificidade da transfecção para neurônios TIDA foi avaliada pela dupla-marcação com TH, sendo que praticamente todos os neurônios transfectados co-expressaram TH ( $92.8 \pm 1.3\%$ ; n = 2; Yip S.H. e Grattan D.R, dados não publicados). Embora os neurônios TIDA de ratas TH-Cre possam recombinar e expressar os genes de EYFP e/ou TagBFF aleatoriamente, de acordo com os objetivos do presente experimento, apenas o EYFP foi detectado por imunofluorescência. Duas semanas após a cirurgia, as ratas que apresentaram dois ciclos regulares foram ovariectomizadas por laparotomia bilateral e após três dias de recuperação foram tratadas durante três dias com óleo (OVX; n = 4) ou E2 (OVX+E2; n = 4) e perfundidas entre 10:00 – 12:00 h do quarto dia. Os cérebros foram removidos e processados para dupla marcação imunofluorescente para GFP e Kp ou GFP e Dyn A no núcleo ARC.

### **3.3. Anestésicos, drogas e tratamentos hormonais**

Para a realização das cirurgias de castração e perfusão, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Após a cirurgia de castração, os animais receberam tratamento profilático com pentabiótico veterinário (24000 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixin meglumina; 2,5 mg/Kg, s.c.). No

experimento 4, realizado na Universidade de Otago, Nova Zelândia, a injeção viral por estereotaxia e a castração foram realizadas sob anestesia de isoflurano (3-4% de isoflurano + 1 L/min de oxigênio para anestesia inicial e 1,5- 2% de isoflurano + 0,6 L/min de oxigênio para manutenção da anestesia durante todo o procedimento) e o tratamento profilático com carprofeno (5 mg/Kg; s.c.). Para realização das perfusões, os animais foram anestesiados com pentobarbital (100 mg/ Kg; i.p.). Para realização dos tratamentos hormonais, o cipionato de E2 (Pfizer Laboratórios; 10 µg/0,2mL/rata, s.c.) foi diluído em óleo de milho (Szawka et al., 2009), para os experimentos 2 e 3. O 17- β E2 (20 µg/0,2mL per rat, s.c.; Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) foi diluído em óleo de gergelim contendo 1% de etanol para o experimento 4. O tamoxifen (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA; 3 mg/0,2mL/rata, s.c.) foi diluído em óleo de milho contendo 10% de etanol (Aquino et al., 2016). Os tratamentos hormonais foram administrados por via subcutânea (s.c.) diariamente no período da manhã, após três dias de recuperação da cirurgia, com a durante 3 dias e os experimentos, realizados no quarto dia.

#### **3.4. Processamento do cérebro para imunohistoquímica**

Após anestesia, as ratas foram perfundidas através da artéria aorta ascendente, com 50 mL de PBS contendo heparina (10 UI/mL), e, em seguida 400 mL de paraformaldeído 4% (PFA 4%) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, ambos à temperatura ambiente. Os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2 h à 4 °C. Os cérebros foram então crioprotetidos em solução contendo sacarose 30% onde permaneceram até atingir a saturação. O tempo de saturação é de aproximadamente 48 h, verificado pela posição do cérebro que inicialmente flutua na solução e, quando a saturação é atingida, precipita -se no fundo do recipiente. Posteriormente, os cérebros foram congelados em isopentano 99% (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>) a uma temperatura entre -40 e -50°C durante o tempo de 1 min. Depois de congelados, os cérebros foram armazenados à -80 °C até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Quatro séries de secções

coronais de 30 µm da extensão rostrocaudal da APO e cinco séries do ARC foram obtidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007). No experimento 4, foram obtidas somente duas séries da extensão rostrocaudal do ARC. As secções foram armazenadas em solução crioprotetora a -20 °C (Watson et al., 1986) até a realização das imunohistoquímicas.

### **3.5. Imunohistoquímica**

A imunohistoquímica foi realizada pelo método de *free-floating* como previamente descrito (Araujo-Lopes et al., 2014; Aquino et al., 2016). Entre cada passo do processo, as secções foram lavadas em PBS. Exceto quando mencionado, as soluções foram preparadas em PBS. Todos os passos foram realizados a temperatura ambiente, exceto pela incubação com o anticorpo primário, feita a 4 °C. Os anticorpos primário e secundário foram diluídos em PBS contendo Triton X-100 (TX-100) 0,3% e albumina bovina (BSA) 1%. Os cortes foram lavados dez vezes por 6 minutos para remoção da solução crioprotetora. As secções foram lavadas com glicina 0,1 M, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, a fim de bloquear peroxidases endógenas do tecido, por um período de 30 minutos. As secções foram incubadas por 1 hora com albumina bovina (BSA 3%), para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário, utilizados posteriormente. As secções foram então incubadas com um destes anticorpos primários: anti-GnRH produzido em coelho (HU. 60, doação Dr. H. Urbanski, 1:20.000), anti-c-Fos produzido em coelho (Ab-5; PC38, Calbiochem, Darmstadt, Germany; 1: 20.000), anti-Fos (K25, sc-253; Santa Cruz Biotechnology, 1:7.500), anti-Kp-10 produzido em coelho (AB9754;

Millipore; 1:30.000), anti-TH produzido em camundongo (T1299; Sigma-Aldrich; 1:70.000), anti-S<sup>40</sup>pTH produzido em coelho (AB5935; Millipore; California; 1:25.000). Então, as secções foram incubadas com anticorpo anti- IgG de coelho biotilado feito em cavalo ou anticorpo anti-IgG de camundongo biotilado, para a marcação de TH, na concentração de 1:2.000 por 2 horas (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As secções foram incubadas com o complexo avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories) a 1:400 por 1 hora. A marcação foi revelada com solução contendo 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µL/mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão acetato 0,175 M (pH 7,6). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e as lamínulas coladas com Entellan (Merck). Como controle, a omissão do anticorpo primário resultou em nenhuma marcação. A imunorreatividade para o anticorpo anti-Kp foi ausente após pré-adsorção com Kp-10 (Araujo-Lopes et al., 2014). O anticorpo anti -c -Fos foi produzido contra a sequência abrangendo os resíduos 4-17 N-terminal de c -Fos humano. A especificidade deste anticorpo foi confirmada em estudos anteriores, os quais demonstraram a ausência de imunorreatividade após pré-adsorção com o peptídeo imunizante (Schiltz & Sawchenko, 2007; Lai et al., 2010; Kuusio et al., 2013). A omissão do anticorpo anti -Fos K-25 resultou em nenhuma marcação e o teste de pré-adsorção com o peptídeo antigênico aboliu a marcação em estudo anterior (Szawka et al., 2009). O anticorpo anti-TH de rato tem sido amplamente utilizado em outros estudos do nosso grupo (Szawka et al., 2009; Aquino et al., 2016) e promove marcação coerente com estudos anteriores em cérebro de rato (Kawano & Daikoku, 1987). Embora testes de pré-adsorção não tenham sido realizados com o anticorpo anti-S<sup>40</sup>pTH, estudos anteriores utilizando este anticorpo demonstraram a presença de apenas uma banda por western blot em cérebros de roedores (Liu & Arbogast, 2008; Romano et al., 2013). Além disso, de acordo com estes relatos, o nosso grupo demonstrou recentemente que as respostas funcionais da marcação de anti-S<sup>40</sup>pTH diferem das marcações de TH, confirmando a

especificidade da marcação de S<sup>40</sup>pTH (Aquino et al., 2016). A especificidade do anticorpo anti- GnRH (HU.60) foi descrita anteriormente por Urbanski et al. (1990), onde demonstraram por radioimunoensaio que este anticorpo se liga exclusivamente à molécula do GnRH, não apresentando ligação cruzada com outros neuropeptídeos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico utilizando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007).

As duplas -marcações por imunofluorescência de GFP -Kp e GFP -Dyn A no núcleo ARC foram realizadas como previamente descrito (Yip et al., 2015). Embora os neurônios TIDA que expressam Cre recombinem aleatoriamente EYFP e /ou TagBFP, apenas o EYFP foi detectado por meio de imunofluorescência, a fim de reduzir a complexidade da combinação de fluoróforos. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti -Kp -10 de coelho (AB9754; Millipore; 1:1000); anti -Dyn A de coelho (H-021-03; Phoenix Pharmaceuticals, INC; 1:200) e os neurônios TH transfectados foram marcados com um anticorpo policlonal anti -GFP de galinha (GFP-1020; Aves Labs Inc; 1:5000), utilizado para reconhecer o EYFP. Os anticorpos foram diluídos em TBS (Tris 0,05M; NaCl 0,15 M, pH 7,6) contendo 0,3% de Triton X-100, 0,25% de soro bovino, albumina e 2% de soro normal de cabra (pH 7,6) e as secções foram incubadas com essa solução sob agitação por 48 horas à 4°C. As secções foram lavadas em TBS e incubadas com anticorpo secundário por 2 horas à temperatura ambiente. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-IgG de coelho biotilado feito em cabra (B2770; Life Technologies; 1:200) para visualizar Kp e Dyn e anti-IgY (H+L) de galinha feito em cabra conjugado à Alexa Fluor® 488 (A11039; Molecular Probes; 1:200) para reconhecer a marcação para GFP. Por fim, as secções foram incubadas com Cy -5 -streptavidina (434316; Molecular Probe; 1:400), à temperatura ambiente por 3 horas. A especificidade dos anticorpos anti -Dyn A e anti -GFP foram previamente descritas por Goodman et al. (2012) e Weissman and Pan (2015), respectivamente. As secções foram então lavadas, montadas em lâminas gelatinizadas e as lamínulas coladas com

Fluoromount G (Southern Biotech). As lâminas foram analisadas em microscópio Confocal Nikon 1 R e a omissão do anticorpo primário foi utilizado como controle negativo.

### **3.6. Obtenção e análise das imagens**

Foram utilizadas para análise 3 secções coronais referentes à APO e porções médio-posterior do núcleo ARC, correspondentes a distância de  $-2,40$  à  $-3,96$  mm do bregma. Fotomicrografias bilaterais da APO e do ARC foram obtidas utilizando-se a objetiva de 20x e 40x no microscópio óptico. Os neurônios que apresentaram dupla marcação para c-Fos e Kp; c-Fos e GnRH e Fos e Kp foram identificados como neurônios imunorreativos à c-Fos ou Fos por possuírem o núcleo corado em preto e como neurônios Kp e GnRH por possuírem o citoplasma corado em marrom. Posteriormente, os neurônios foram quantificados bilateralmente em cada secção, sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais. Adicionalmente, a área de marcação para TH e S<sup>40p</sup>TH na camada externa da EM foi analisada em 3 secções por rata utilizando-se o software Image J (National Institutes of Health, EUA). Para tanto, as imagens foram capturadas utilizando a objetiva de 40x e caixas (largura, 160; altura, 80  $\mu$ m) foram utilizadas para delimitar a área na qual as análises foram realizadas. As imagens foram convertidas em 1 bit, utilizando-se o mesmo valor de limiar para todos as secções analisadas. Os valores correspondentes aos pixels da imunorreatividade para TH e S<sup>40p</sup>TH foram expressos como a porcentagem da área total analisada.

Após a obtenção de secções coronais do ARC no experimento 4, alguns cortes da porção média do ARC foram colocados em uma lâmina não- gelatinizada e levados rapidamente a um microscópio epifluorescente para verificar se houve transfecção viral dos neurônios TH. Somente os animais que apresentaram uma taxa satisfatória de transfecção foram utilizados no experimento. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio confocal Nikon 1R com laser de 488 ou 633 nm de excitação. Para

quantificação dos números de neurônios-ir à Kp e Dyn, foi analisada a região média do ARC e as fotomicrografias foram obtidas utilizando-se a objetiva de 20x. Os neurônios - ir à Kp e Dyn foram quantificados bilateralmente em todas as camadas z, sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais. Para quantificação dos *inputs* Kp e Dyn A aos neurônios TH, foram escaneados 10-12 neurônios por animal. Foram obtidas imagens em camadas z, no intervalo entre 0,5- 2  $\mu\text{m}$  utilizando-se a objetiva de 40x, com a função de *zoom* ativada (aumento de 3x). As posições foram definidas pela ausência de pixels pretos entre os sinais verde e vermelho em um único plano da camada z, utilizando-se o software ImageJ. Os *inputs* no soma foram normalizados pela medida da circunferência de cada neurônio e os inputs nos dendritos foram quantificados a cada 15  $\mu\text{m}$ , totalizando um comprimento máximo de 45  $\mu\text{m}$  do soma. As sobreposições das camadas z foram obtidas utilizando-se o software Nikon 1R e posterior ajuste de nível de brilho foi realizado por meio do programa Adobe Photoshop CS5.

### 3.7. RT- PCR tempo real

Os cérebros foram rapidamente removidos e congelados em gelo seco e secções coronais foram obtidas na temperatura de  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Szawka et al., 2007). O núcleo ARC do hipotálamo foi dissecado aproximadamente entre  $-1.2$  e  $-3.2$  mm do Bregma, em dois *punches* (Palkovits, 1973), utilizando -se uma agulha de 2 mm de diâmetro, centralizada no terceiro ventrículo e estendendo dorsalmente a partir da base do cérebro. Os *punches* foram homogeneizados em 500  $\mu\text{L}$  TRIzol reagent (Invitrogen), utilizando uma seringa de 1 mL imediatamente após o experimento e então congelados à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O *Gapdh* foi utilizado como gene normalizador. RNAm total do núcleo ARC foi extraído adicionando mais 500  $\mu\text{L}$  TRIzol. O RNA total foi extraído com Tri-Reagent-LS (Life Technologies). A síntese de cDNA foi realizada com 1  $\mu\text{g}$  do RNA total, utilizando-

se oligonucleotídeos randômicos (100ng/μL), dNTP Mix (10mM), tampão de PCR, DTT (10mM), inibidor de ribonuclease (40U/uL), e Superscript III (200U/uL). O cDNA sintetizado foi amplificado utilizando-se 4 μL de cDNA, 600nM de cada primer, 10μL do reagente SYBR Green água DNase e RNase-free conforme descrito pelo fabricante (kit Platinum® SYBR® GREEN qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen Life Technologies). As reações foram realizadas em um termociclador ABI-PRISMA 7900, nas seguintes condições: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C. Em seguida foi realizada análise da curva de dissociação nas seguintes condições: 1 min a 60 °C, 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C e 80 ciclos de 10 segundos a 55 °C, com aumento gradativo de 0,5 °C. A análise da expressão gênica foi feita pela comparação do número de cópias do RNAm entre os grupos experimentais, o qual foi inferido de acordo com o número de ciclos necessário para atingir um sinal de fluorescência superior ao nível basal (CT). A expressão relativa de RNAm foi calculada segundo o método que utiliza a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001), onde o  $\Delta CT$  é determinado pela subtração dos valores de CT do gene de interesse e do respectivo gene normalizador. O  $\Delta\Delta CT$  é obtido pela subtração do valor de  $\Delta CT$  de cada amostra pelo  $\Delta CT$  das amostras do grupo calibrador (grupo OVX 8 h). A exponencial negativa na base 2 do valor de  $\Delta\Delta CT$  fornecerá a medida do número de vezes que o RNAm do gene de interesse varia em relação ao grupo controle. Os primers utilizados para amplificação são apresentados na Tabela 1.

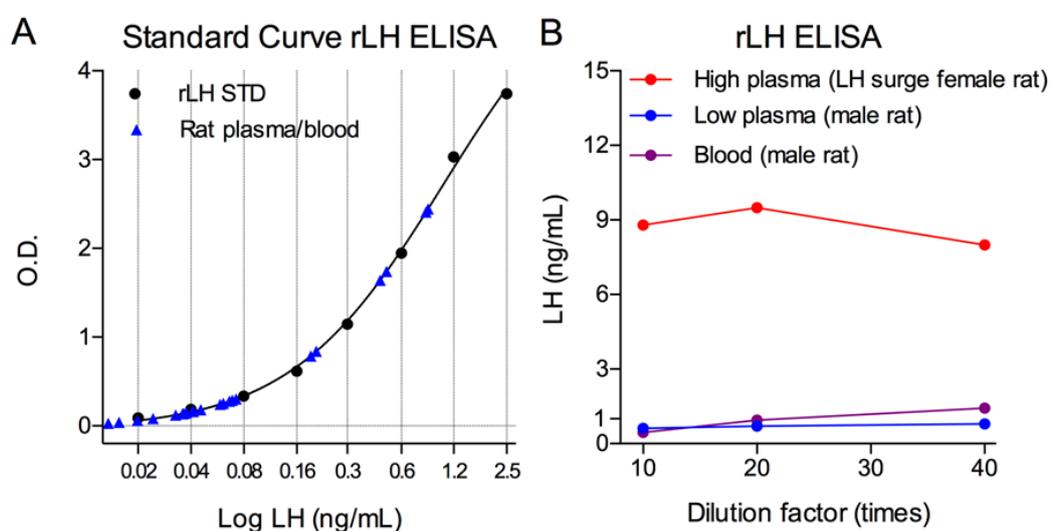
**Tabela 1.** Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Númeo de acesso</b>
<i>Kiss1</i>	Forward primer 5'- GAGCCACTGGCAAAAATGGC-3'	NM_181692.1
	Reverse primer 5'- ATTAACGAGTTCCTGGGGTCC -3'	
<i>Nkb</i>	Forward primer 5'- ATAGGCCAGCAGTGCAGAAA-3'	NM_019162.2
	Reverse primer 5'- AGCCAACAGGAGGACCTTG-3'	
<i>Pdyn</i>	Forward primer 5'- ATGGGGATCAGGTAGGGCAT-3'	NM_019374.3
	Reverse primer 5'- ACCGAGTCACCACCTTGAAC-3'	
<i>Gapdh</i>	Forward primer 5'- ACAGCCGCATCTTCTTGTGC-3'	NM_017008.4
	Reverse primer 5'- GCCTCACCCCATTTGATGTT-3'	

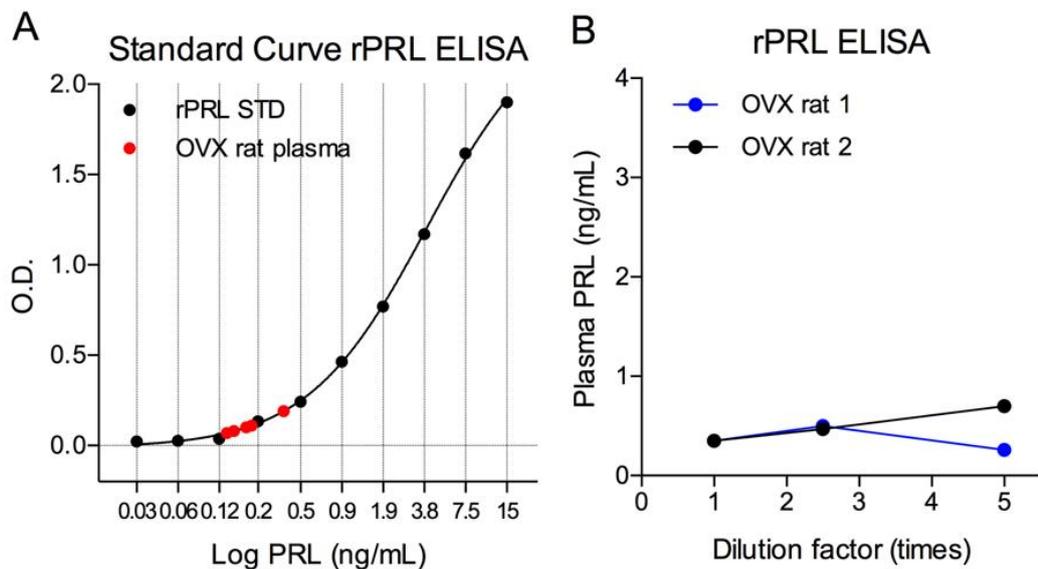
### 3.8. ELISA para LH e PRL

Para dosagem plasmática de LH e PRL foi validado o método de ELISA sanduíche adaptado (Steyn et al., 2013). Inicialmente, a placa para ELISA foi sensibilizada com anticorpo de captura anti-LH bovino a 1:2500 em PBS (bovine LH $\beta$  518B7 monoclonal antibody, University of California, Davis, USA) ou anti- PRL guinea pig a 1:1750 (anti-rPRL-IC; Parlow rat Immunocytochemistry kit) e incubada a 4 °C por 24 horas. Em seguida, para minimizar ligações inespecíficas do anticorpo de captura, a placa foi incubada com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado em PBS-T, 5%) por 2 horas. Após este período, pipetou-se a curva com padrão de rLH ou rPRL de rato, bem como as amostras de plasma dos animais em 0,2% BSA-PBST. Após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, a placa foi incubada com o anticorpo de detecção anti-LH a 1:40.000 ou anti-PRL a 1:25.000 em tampão de bloqueio a 4°C durante 24 horas sob agitação (Rabbit polyclonal LH antibody AFP240580Rb; National Hormone and Peptide Program; Rabbit polyclonal alpha mouse PRL antibody). No último dia, a

placa foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase a 1:1.000 para LH e 1:2.000 para PRL em 50% de tampão de bloqueio e 50% PBS pelo período de 90 minutos em temperatura ambiente sob agitação (Polyclonal goat anti-rabbit IgG/HRP, P0448; Dako, USA). Para revelação da placa, foi utilizado o-fenilenodiamina (OPD, 00-2003; Invitrogen, USA), 1 tablete diluído em 12 mL de tampão citrato, onde adicionou-se 6 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. A placa foi incubada em uma câmara escura, em temperatura ambiente, sob agitação por 45 minutos. A reação foi interrompida com HCL 3M. A leitura da placa foi realizada a 490 e 650 nm usando o leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer; BioTek). As concentrações de LH e PRL foram determinadas por interpolação dos valores das amostras a partir de regressão não linear da curva padrão de LH ou PRL. As curvas de calibração e os testes de diluição das amostras para LH e PRL estão demonstrados nas figuras 1 e 2.



**Figura 1:** Padronização do ensaio de ELISA ultrasensível para LH de rato (rLH). (A) Curva de calibração para rLH em escala semi-logarítmica. Em azul sobreposição de leituras de amostras de plasma e sangue total de rato em diferentes diluições. (B) Teste de diluição e paralelismo de amostras de plasma e sangue total de rato com diferentes concentrações de LH. Em vermelho, amostra de plasma do pico de LH induzido por E2 em ratas. Em azul, amostra de plasma de rato macho. Em roxo, amostras de sangue total de rato macho. O volume de solução padrão de rLH utilizado é 50 µL. Fatores de diluição entre 10 e 40 vezes podem ser utilizados sem acarretar distorção nos valores dosados.



**Figura 2:** Padronização do ensaio de ELISA ultrasensível para PRL de rato (rPRL). (A) Curva de calibração para rPRL em escala semi-logarítmica. Em vermelho sobreposição de leituras de amostras de plasma de ratas OVX em diferentes diluições. (B) Teste de diluição e paralelismo de amostras de plasma de ratas OVX (OVX rat 1; OVX rat 2). O volume de solução padrão de rPRL utilizado é 50  $\mu$ L. Fatores de diluição entre 2,5 e 5 vezes podem ser utilizados para a detecção dos baixos níveis de PRL encontrados em ratas OVX em repouso.

### 3.9. Injeção estereotáxica de vetor viral adeno- associado (AAV- Brainbow)

O Brainbow é um método que facilita a visualização de células, tais como neurônios, quando a área analisada é composta por uma densa rede neuronal (Cai et al., 2013). Essa técnica se baseia na utilização de cores primárias para produzir as demais cores do espectro visual. As combinações resultantes são aleatórias para cada célula que expressa Brainbow e podem, portanto, servir como marcadores celular (*Tags*) e posteriormente serem visualizadas pelo microscópio óptico. A técnica Brainbow utiliza diferentes estratégias para produzirem diferentes cores, tais como a excisão ou inversão da fita de DNA que é mediada pela enzima Cre- recombinase, dependendo da orientação dos sítios de *Lox*. Existem diferentes tipos de *Lox*, como *LoxP*, *Lox2272* e

*LoxN*, que possuem funções idênticas, mas são incompatíveis um com o outro (Weissman & Pan, 2015).

O Brainbow 1.0 é baseado na excisão de DNA, em que três proteínas fluorescentes (PF) são dispostas separadamente ao longo do gene, juntamente com dois pares de sítios de reconhecimento da Cre- recombinase (sítios *Lox*), que envolvem a primeira e a segunda PF. A Cre- recombinase reconhece apenas os pares idênticos de *Lox*, por exemplo, *loxP* com *loxP* e *lox2272* com *lox2272*. Antes da recombinação, apenas a primeira cor da sequência é expressa, e denominada cor "padrão". Após a recombinação de Cre, uma das três PFs serão exclusivamente expressas por essa cópia da fita de DNA. Já o Brainbow 2.0 é baseado na inversão do DNA, onde dois *Lox* correspondentes são posicionados na mesma direção. A enzima Cre- recombinase irá inverter a orientação de uma ou mais PFs na fita de DNA, sendo que a cor expressa será correspondente à PF que não foi invertida (*sense*). Ainda, a Cre- recombinase pode causar tanto a excisão quanto a inversão do DNA, simultaneamente, e essa última variante do método denominada Brainbow 2.1 (Weissman et al., 2011; Weissman & Pan, 2015).

No nosso estudo, foi utilizado a injeção de vetor viral adeno- associado (Brainbow AAV1). O AAV é adequado para a expressão a longo prazo, para se ter melhor controle espacial e temporal da transfecção e pode ser aplicado a uma grande variedade de espécies e tecidos. O AAV persiste como um elemento extra cromossômico e não se integra no genoma, minimizando a mutagênese. O sistema AAV Brainbow consiste em dois tipos de vetores AAV que, em conjunto, podem expressar quatro PFs diferentes (Weissman et al., 2011; Cai et al., 2013). A infecção de múltiplos AAV em uma única célula é muito frequente e resulta em uma elevada diversidade de cor. No nosso estudo, os genes que o AVV transportam derivam de medusas, como a proteína fluorescente amarela (EYFP) (Tsien, 1998) ou de anêmonas, como a proteína fluorescente azul (TagBFP) (Merzlyak et al., 2007) e podem ser aleatoriamente

recombinados e expressos. Pelo fato da fluorescência endógena tornar-se muito fraca após a fixação do tecido, deve-se utilizar marcadores de epítipo para cada PFs, de modo que a fluorescência possa ser amplificada independentemente através da marcação de anticorpos específicos (Weissman & Pan, 2015). Além disso, como a expressão de PFs é dependente de Cre, torna-se a marcação de Brainbow específica para o tipo de célula que expressa a enzima Cre- recombinase (Witten et al., 2011; Tsien, 2016). Isso o torna ideal para análises anatômicas em alta definição, onde é possível visualizar diferentes tipos de neurônios, bem como suas projeções.

Como previamente descrito, no experimento 4 foi utilizado o AAV1 dependente de Cre contendo os genes EYFP e TagBFP, colocado em orientação inversa entre os locus loxP mutantes (AAV-Brainbow: AAV9.hEF1a.lox.TagBFP.lox.eYFP.lox.WPRE.hGH-InvBYF,  $2,78 \times 10^{13}$  GC / ml de estoque, Penn Vector Core, Pensilvânia, EUA). Este vetor foi utilizado para mediar a expressão de PFs localizadas exclusivamente em neurônios TH com expressão de Cre (Cai et al., 2013). Por sua vez, a imunofluorescência foi realizada apenas para YFP, utilizando-se o anticorpo anti- GFP, a fim de se reduzir a complexidade de combinação de fluoróforos. A especificidade da transfecção viral foi testada previamente por Yip et al., (dados não publicados), mostrando que praticamente todos os neurônios transfectados no núcleo ARC foram células que expressam TH.

### **3.10. Análise estatística**

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  EPM. No experimento 1, as diferenças durante o ciclo estral foram determinadas por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Diferenças entre os tempos nos machos foram determinadas pelo teste t de Student. Nos experimentos 2 e 3, os dados das ratas OVX e OVX+E2 foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Holm-Sidak. Diferenças entre ratas OVX+E2 e OVX+E2+TX às 18 h foram determinadas por

teste t de Student. Para análise das correlações foi utilizado o teste de correlação de Pearson. No experimento 4, diferenças entre ratas OVX e OVX+E2 TH-Cre foram determinadas pelo teste t de Student.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Variações na imunorreatividade à c-Fos em neurônios KNDy durante o ciclo estral de ratas e em machos

##### *Variações na secreção de LH e peso do útero durante o ciclo estral de ratas*

Os valores da secreção plasmática de LH, bem como o peso uterino durante o ciclo estral estão indicados na tabela 2. Como determinado por one-way ANOVA, a secreção de LH foi menor no P-10 ( $P < 0,05$ ) e maior no P-18 ( $P < 0,001$ ), nas fêmeas. Adicionalmente, verificou-se que o peso do útero foi maior no P-10 ( $P < 0,05$ ) e no P-18 ( $P < 0,01$ ) versus D e E. Esses dados em conjunto indicam uma ação pronunciada do E2 sobre a secreção de LH em ratas no proestro, como parte do mecanismo de feedback positivo do E2. Ainda, demonstra também o potente efeito trófico do E2, que pôde ser observado pelo maior peso uterino encontrado na tarde de proestro como parte do mecanismo de feedback positivo do E2.

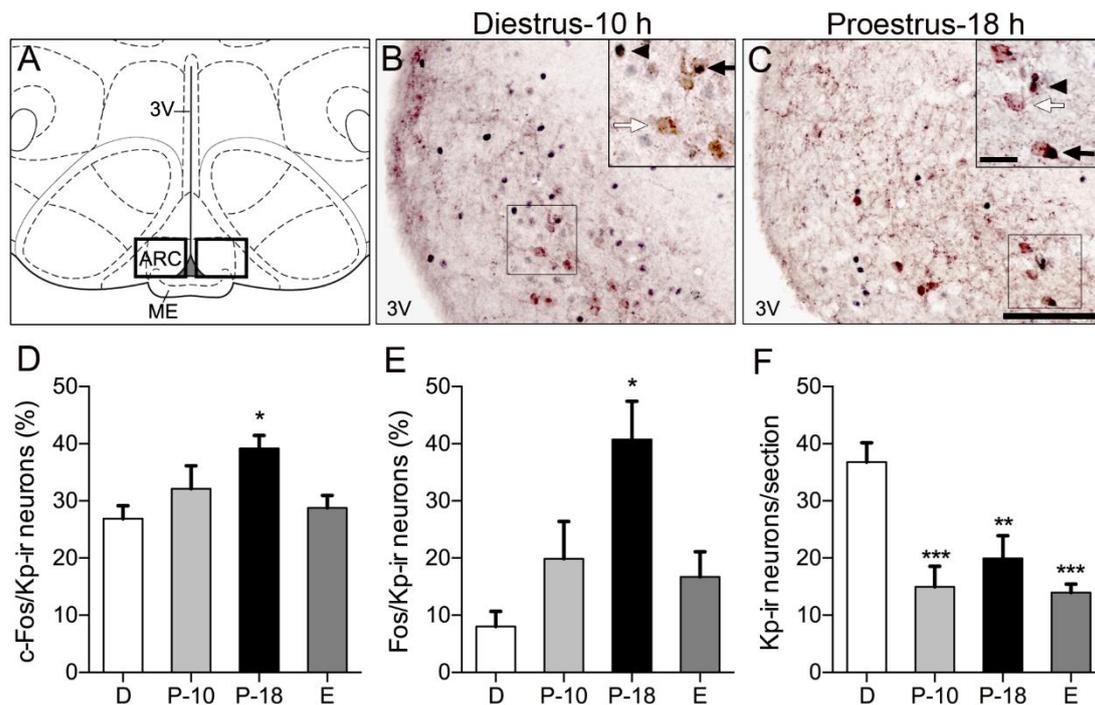
**Tabela 2:** Concentrações plasmáticas de LH em ratas ciclando e ratos machos e peso uterino das fêmeas

	Grupo	Tempo	
		10 h	18 h
LH	D	2,7 ± 0,7	
	P	1,5 ± 0,7*	15,0 ± 6,4***
	E	2,2 ± 1,3	
	Macho	1,2 ± 0,5	0,8 ± 0,6 <sup>#</sup>
Peso do útero	D	177,0 ± 30,0	
	P	324,0 ± 85,0*	417,0 ± 144,0**
	E	187,0 ± 52,0	

Dados do peso do útero foram expressos como Média ± EPM (mg/100g p.c.). Dados dos níveis plasmáticos de LH foram expressos como Média ± EPM (ng/mL). D (Diestro; n = 6), P (Proestro; n = 6), E (Estro; n = 6), M (Macho; n = 7). \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$  versus demais grupos. <sup>#</sup>  $P < 0,05$  versus Macho 10:00 h.

### *Atividade dos neurônios KNDy em ratas cíclicas*

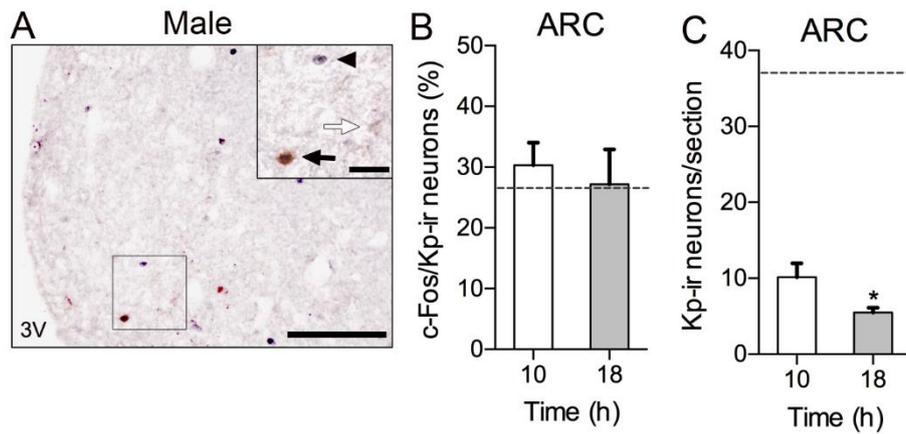
Variações na imunorreatividade à Kp e c-Fos no núcleo ARC são representadas nas fotomicrografias de secções coronais apresentadas na figura 3 A-C. Podemos observar que no P-18, momento da ocorrência dos picos pré -ovulatórios de LH e PRL, houve uma maior porcentagem de neurônios Kp-ir que expressam c-Fos comparado ao D ( $P < 0,05$ ) (Figura 3 D). Esta resposta foi confirmada quando utilizamos outro anticorpo anti-Fos (K-25, Santa Cruz), que compreende imunorreatividade a todos os membros da família Fos (Figura 3 E). Por outro lado, o número de neurônios Kp-ir foi menor nos grupos P-10, P-18 e E comparado ao D ( $P < 0,01$ ) (Figura 3 F). Esses dados em conjunto indicam que a expressão de c -Fos em neurônios KNDy varia durante o ciclo estral. Provavelmente, o aumento dos esteroides sexuais durante o proestro causam redução da expressão de Kp no ARC, como parte do mecanismo de feedback negativo do E2 sobre a secreção de LH. Entretanto, há um aumento da atividade dos neurônios KNDy remanescentes na tarde do proestro, o que deve resultar em uma maior liberação de Kp, sugerindo que estes neurônios participam da geração dos picos pré-ovulatórios de LH e PRL.



**Figura 3:** Atividade dos neurônios KNDy em ratas nos dias de diestro (D; n = 6), proestro (P; n = 6) e estro (E; n = 6) do ciclo estral. (A) Diagrama esquemático representando a área analisada no núcleo arqueado (ARC) (caixa preta). (B–C). Dupla marcação imunohistoquímica para c-Fos e kisspeptina (Kp) no ARC de ratas em D às 10:00 h (B) e P às 18:00 h (C). Setas brancas indicam neurônios imunorreativos (ir) apenas à Kp. Setas pretas indicam neurônios Kp colocalizados com c-Fos. Cabeças de setas indicam neurônios-ir apenas à c-Fos. 3V, terceiro ventrículo, ME, eminência mediana. (D) Porcentagem de neurônios kisspeptinérgicos que coexpressam c-Fos (c-Fos/Kp-ir; anti-c-Fos Ab-5, Calbiochem) no ARC. \* $P < 0,05$  comparado ao D. (E) Porcentagem kisspeptinérgicos que coexpressam Fos (Fos/Kp-ir; anti-Fos K-25, Santa Cruz) no ARC. \*  $P < 0,05$  comparado ao D e E. (F) Número de neurônios Kp-ir/secção. \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*  $P < 0,01$  em relação ao D. Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Escalas = 100  $\mu$ m e 20  $\mu$ m (*inset*).

#### *Imunorreatividade à c-Fos em neurônios KNDy em machos*

A figura 4 demonstra a expressão de c-Fos em neurônios KNDy em ratos machos adultos. Ao contrário das fêmeas, nos machos não houve variação ao longo do dia na porcentagem de neurônios Kp-ir que expressam c-Fos ( $P = 0,79$ ), e os níveis de dupla marcação c-Fos/Kp-ir foram semelhantes aos observados nas fêmeas em diestro (Figura 4 B). Entretanto, os machos exibiram uma variação diária no número de neurônios Kp-ir no ARC, e também nos níveis plasmáticos de LH (tabela 2), com menores níveis durante a tarde ( $P < 0,05$ ). Ademais, o número de neurônios kisspeptinérgicos dos machos foi pelo menos três vezes menor do que o encontrado nas fêmeas em diestro. Isto indica a existência de diferenças sexuais no que se refere à expressão de Kp, com maior expressão nas fêmeas, e imunorreatividade à c-Fos em neurônios KNDy durante a tarde do proestro, que não apresenta fenômeno semelhante em machos.



**Figura 4:** Atividade dos neurônios KNDy em ratos machos às 10:00 h (10; n = 6) e às 18:00 h (18; n = 6). (A). Dupla marcação imunohistoquímica para c-Fos e Kp no ARC de machos. Setas brancas indicam neurônios apenas Kp-ir. Setas pretas indicam neurônios Kp colocalizados com c-Fos. Cabeças de setas indicam neurônios apenas c-Fos-ir. 3V, terceiro ventrículo. (B) Porcentagem de neurônios kisspeptinérgicos que coexpressam c-Fos (c-Fos/Kp-ir) no ARC. (C) Número de neurônios Kp-ir/secção. \*  $P < 0,05$  em relação a 10:00 h. As linhas tracejadas indicam a porcentagem de colocalização c-Fos/Kp-ir (B) e o número de neurônios Kp-ir/secção (C) de ratos em D. Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Escala = 100  $\mu$ m ou 20  $\mu$ m (*inset*).

#### **4.2 Papel do E2 sobre a expressão de c-Fos em neurônios KNDy em fêmeas: correlação com a função neuronal dos neurônios GnRH e TIDA**

##### *Secreção plasmática de LH e peso do útero no modelo de ratas OVX+E2*

Os dados da concentração plasmática de LH e o peso uterino dos diferentes grupos experimentais estudados neste experimento estão apresentados na tabela 3. O E2 promoveu um efeito dual sobre a secreção de LH, ou seja, reduziu a secreção de LH às 8:00 h e aumentou a secreção de LH às 18:00 h em relação ao grupo OVX ( $P < 0,05$ ). Ainda, o grupo OVX+E2 18:00 h apresentou maiores níveis plasmáticos de LH do que no grupo OVX+E2 8:00 h ( $P < 0,05$ ), correspondendo ao pico de LH induzido por E2. Por sua vez, o tratamento adicional com tamoxifen reduziu a concentração plasmática de LH em relação ao grupo OVX+E2 18:00 h ( $P < 0,05$ ), o que indica que o tamoxifen é capaz de bloquear o efeito promovido pelo E2 sobre o aumento dos níveis plasmáticos de LH, no momento do pico de LH induzido pelo E2. Adicionalmente, corroborando com os resultados encontrados durante o ciclo estral, o peso uterino foi maior nos animais OVX+E2 nos dois períodos estudados em comparação ao controle OVX ( $P < 0,001$ ). Além disso, o tratamento com tamoxifen bloqueou o efeito trófico uterino do E2 nas ratas OVX+E2+TX ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 3:** Níveis de LH e peso do útero em ratas OVX tratadas com E2 e tamoxifen

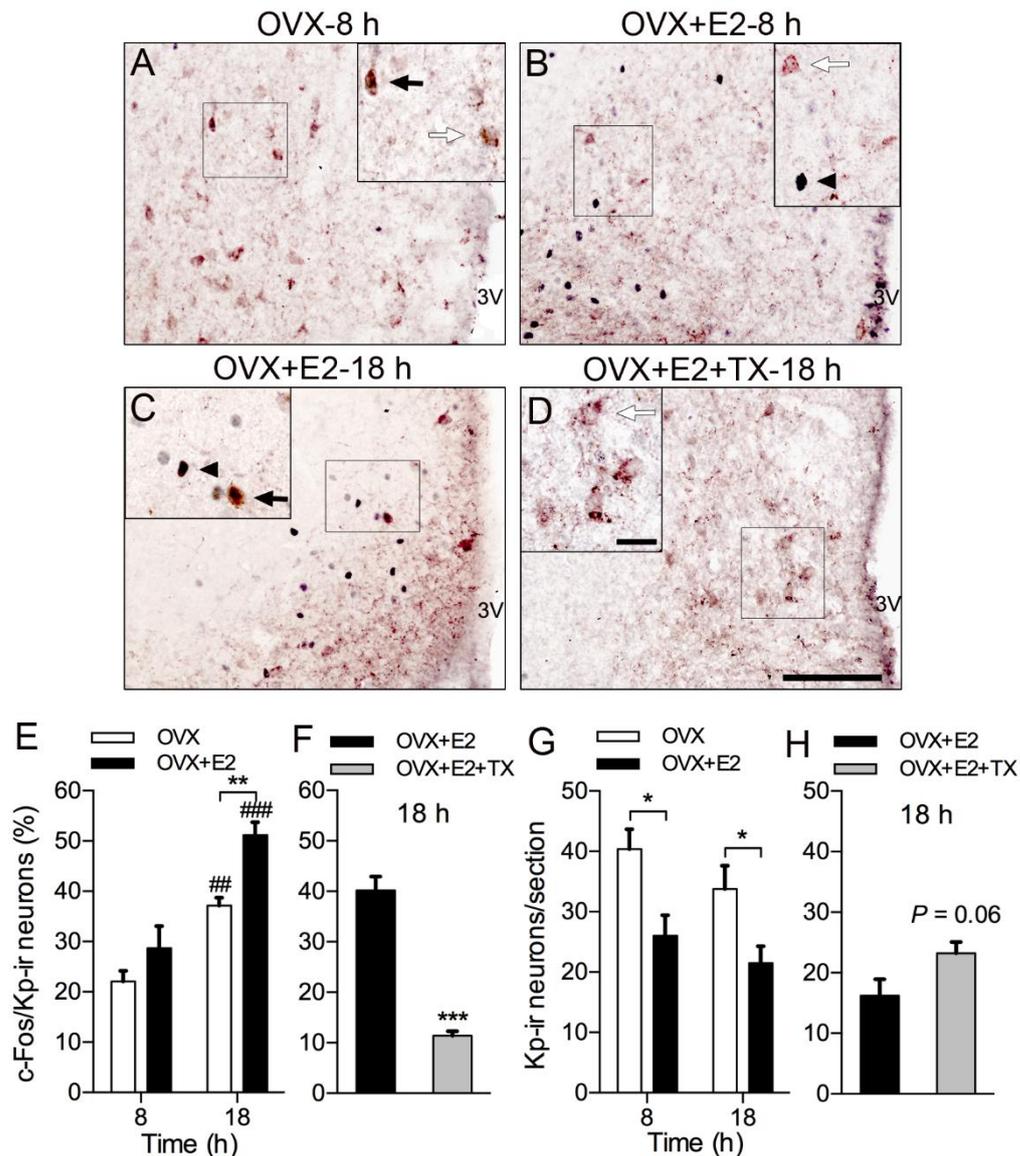
	Grupo	Tempo	
		8 h	18 h
LH	OVX	2,4 ± 1,3	3,3 ± 1,3
	OVX+E2	1,8 ± 0,9*	5,5 ± 2,9*; <sup>#</sup>
	OVX+E2+TX		2,6 ± 1,4 <sup>@</sup>
Peso do útero	OVX	128,0 ± 17,1	107,0 ± 22,0
	OVX+E2	329,0 ± 66,5***	497,0 ± 114,7***; <sup>#</sup>
	OVX+E2+TX		135,2 ± 11,6 <sup>@@</sup>

Dados do peso do útero foram expressos como Média ± EPM (mg/100g p.c.). Dados dos níveis plasmáticos de LH foram expressos como Média ± EPM (ng/mL). OVX, n = 8; OVX+E2, n = 7; OVX+E2+TX, n = 8. \*\*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,05$  versus OVX. #  $P < 0,05$  versus OVX+E2 8:00 h. @  $P < 0,05$ , @@  $P < 0,01$  versus OVX+E2 18:00 h.

#### *Avaliação da expressão de c-Fos em neurônios KNDy no modelo de ratas OVX+E2*

Variações na imunorreatividade à Kp e c-Fos no núcleo ARC de ratas OVX às 8:00 h (A), OVX+E2 às 8:00 h (B), OVX+E2 às 18:00 h (C) e OVX+E2+TX às 18:00 h (D) são representadas nas fotomicrografias de secções coronais apresentadas na figura 5. Os resultados mostram que a porcentagem de neurônios Kp-ir que expressaram c-Fos no ARC foi maior em ratas OVX+E2 às 18:00 h comparado às 8:00 h ( $P < 0,001$ ) e em relação as ratas OVX ( $P < 0,01$ ). A porcentagem de neurônios Kp-ir que expressaram c-Fos também foi maior em ratas OVX às 18:00 h comparado às 8:00 h ( $P < 0,001$ ) (Figura 5 E). A porcentagem de neurônios Kp-ir que expressaram c-Fos às 18:00 h foi marcadamente reduzida pelo tratamento com tamoxifen em ratas OVX+E2+TX em relação ao grupo OVX+E2 ( $P < 0,001$ ) (Figura 5 F). Corroborando os resultados obtidos durante o ciclo estral, o número de neurônios Kp-ir no ARC foi menor em ratas OVX+E2 em comparação ao grupo OVX, tanto às 8:00 h quanto às 18:00 h ( $P < 0,05$ ) (Figura 5 G). O tamoxifen promoveu ainda um leve aumento no número de neurônios Kp-ir ( $P = 0,06$ ) (Figura 3 H) e uma redução significativa do peso uterino em comparação ao grupo OVX+E2 ( $P < 0,01$ ) (tabela 3), o que demonstra efeitos anti-estrogênicos do tamoxifen no ARC e no tecido uterino. Portanto, estes resultados demonstram que há uma

variação na expressão c-Fos em de neurônios Kp-ir no ARC ao longo do dia, com o aumento da atividade ao final da tarde. O tratamento com E2 causa uma redução geral na expressão de Kp no ARC, mas promove um aumento da expressão de c -Fos em neurônios Kp-ir às 18:00 h. Desse modo, estes resultados comprovam que o aumento da atividade dos neurônios KNDy visto nas ratas OVX+E2 às 18:00 h ocorre mediante ativação de ER pelo E2, uma vez que esse efeito foi ausente nas ratas tratadas com tamoxifen, que atua como antagonista de ER no hipotálamo

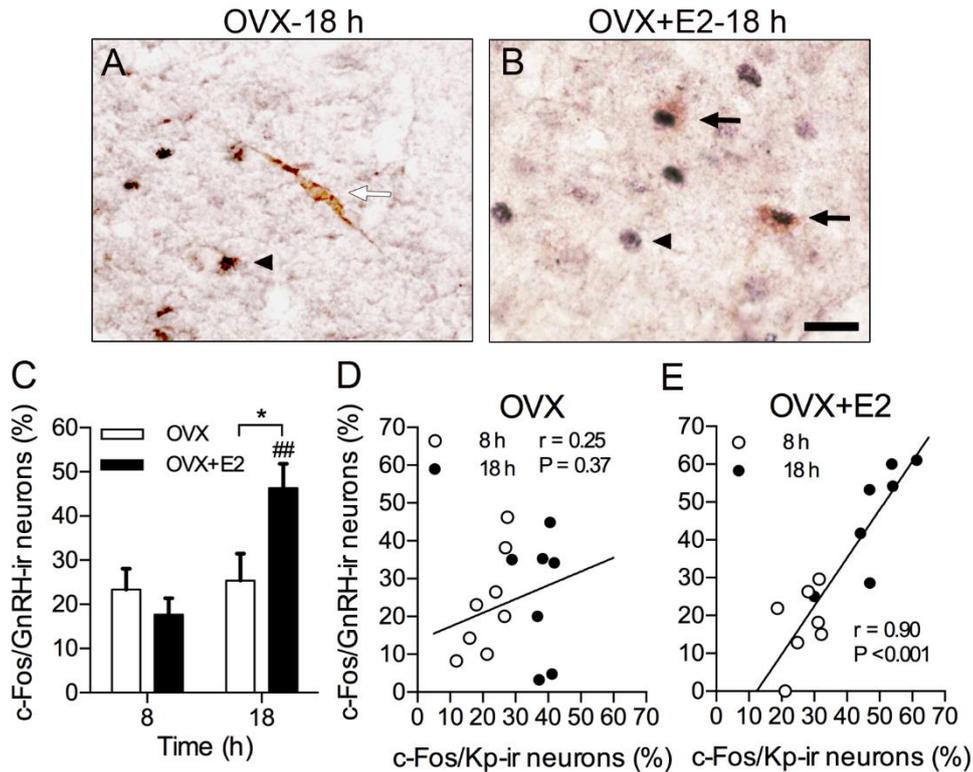


**Figura 5:** Atividade dos neurônios KNDy em ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (OVX; n = 8 por grupo), E2 (OVX+E2; n = 7 por grupo) ou E2 e tamoxifen (OVX+E2+TX; n = 8). Ratas foram tratadas durante 3 dias e perfundidas às 8:00 h ou 18:00 h do quarto dia. (A–C). Dupla marcação imunohistoquímica para c-Fos e Kp no ARC de ratas OVX-8 h (A), OVX+E2-8 h (B), OVX+E2-18 h (C) e OVX+E2+TX (D). Setas brancas indicam neurônios-ir apenas à Kp. Setas pretas indicam neurônios-ir à Kp colocalizados com c-Fos. Cabeças de setas indicam neurônios-ir apenas à c-Fos. 3V, terceiro ventrículo. (E-F) Porcentagem de neurônios Kp-ir que coexpressam c-Fos no ARC. \*\*  $P < 0,01$  OVX versus OVX+E2 às 18:00 h, ###  $P < 0,001$  OVX+E2 18:00 h versus OVX+E2 8:00 h. ##  $P < 0,01$  OVX às 18:00 h versus OVX às 8:00 h. \*\*\*  $P < 0,001$  OVX+E2+TX versus OVX+E2. (F-G) Número de neurônios Kp-ir/secção. \*  $P < 0,05$  OVX comparado ao OVX+E2 às 8:00 h e OVX versus OVX+E2 às 18:00 h. Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Escalas = 100  $\mu$ m e 20  $\mu$ m (inset).

### *Correlação entre atividade dos neurônios KNDy e dos neurônios GnRH no modelo de ratas OVX+E2*

A figura 6 demonstra variações na imunorreatividade à c-Fos e GnRH na APO de ratas OVX (A) e OVX+E2 (B) às 18:00 h. A expressão de c-Fos em neurônios GnRH foi maior em ratas OVX+E2 às 18:00 h comparado tanto às 8:00 h ( $P < 0,01$ ), quanto em relação ao grupo OVX ( $P < 0,05$ ) (Figura 6 C). Por outro lado, não houve alteração significativa entre o número de neurônios GnRH-ir nos diferentes grupos e horários.

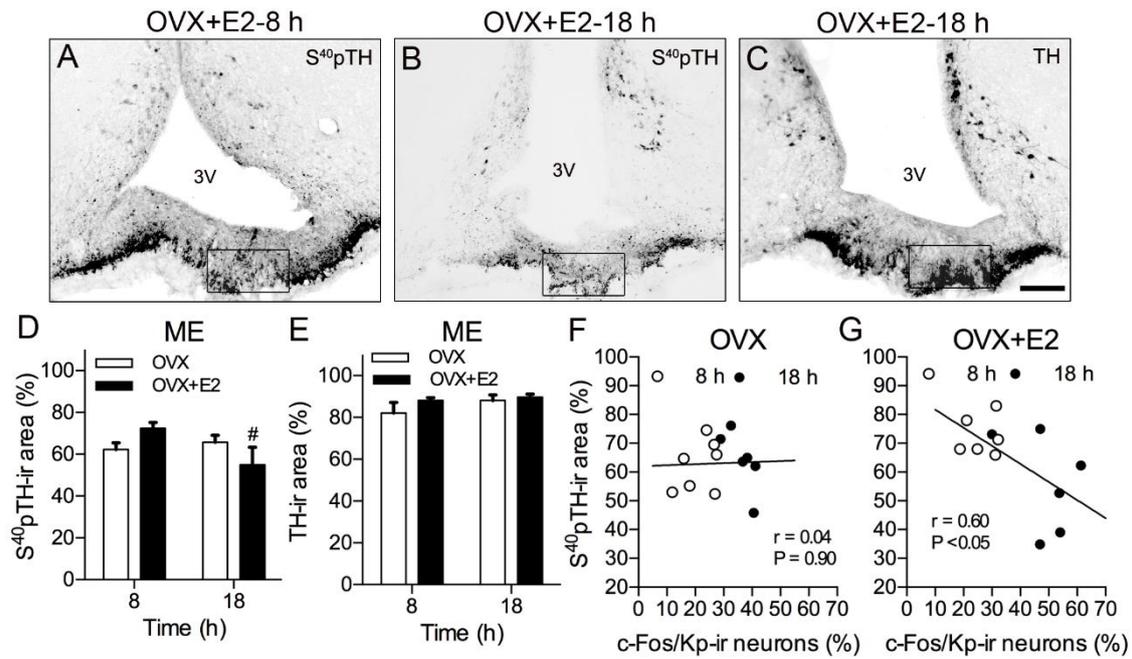
Ratas OVX+E2 apresentaram uma forte correlação entre a expressão de c-Fos em neurônios GnRH-ir e em neurônios Kp-ir ( $r = 0,90$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 6 D). Esta resposta, entretanto, não foi observada em ratas OVX ( $r = 0,25$ ;  $P = 0,37$ ) (Figura 6 E). Esses resultados sugerem que os neurônios KNDy não participam apenas dos efeitos da retroalimentação negativa exercida pelo E2, controlando a secreção pulsátil de gonadotrofinas, mas também podem exercer um papel na gênese do pico de LH induzido por E2.



**Figura 6:** Correlação entre atividade dos neurônios KNDy e neurônios GnRH em ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (OVX; n = 7 por grupo) ou E2 (OVX+E2; n = 7 por grupo). As ratas foram tratadas durante 3 dias e perfundidas às 8:00 h ou 18:00 h do quarto dia. (A-B). Dupla marcação imunohistoquímica para c-Fos e GnRH na área pré-óptica de ratas OVX (A), OVX+E2 (B) às 18:00 h. Setas brancas indicam neurônios-ir apenas ao GnRH. Setas pretas indicam neurônios GnRH colocalizados com c-Fos. Cabeças de setas indicam neurônios-ir à c-Fos. (C) Porcentagem de neurônios GnRH-ir que coexpressam c-Fos. \*  $P < 0,05$  grupo OVX+E2 comparado ao grupo OVX às 18:00 h, ##  $P < 0,01$  OVX+E2 às 18:00 h comparado ao grupo OVX+E2 às 8:00 h. (D-E) Correlação entre atividade dos neurônios KNDy (c-Fos/Kp-ir in the ARC) e neurônios GnRH (c-Fos/GnRH-ir) em ratas OVX (E) e OVX+E2 (F), determinada pela porcentagem de neurônios que expressam c-Fos. Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Escala = 50  $\mu$ m.

### *Correlação entre atividade dos neurônios KNDy e neurônios TIDA no modelo de ratas OVX+E2*

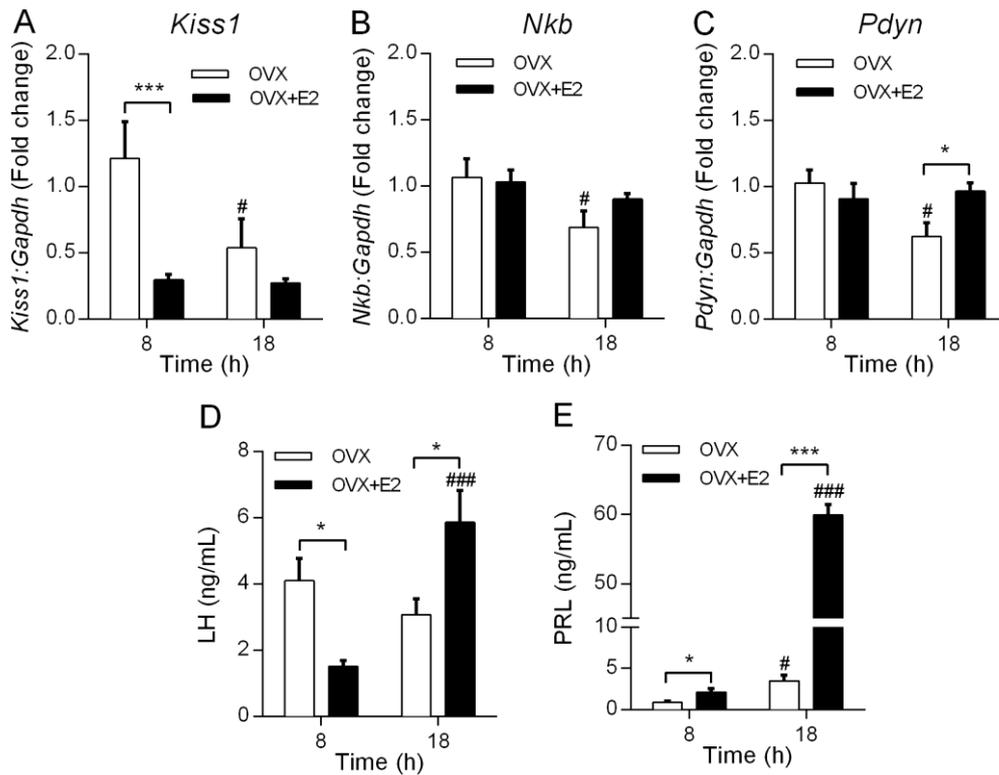
A figura 7 demonstra a variação na imunorreatividade à S<sup>40</sup>p TH e TH na EM, que correspondem aos terminais dos neurônios TIDA, em ratas OVX+E2 às 8:00 h (A) e OVX+E2 às 18:00 h (B, C) e a correlação entre a atividade dos neurônios KNDy e a dos neurônios TIDA. A expressão de S<sup>40</sup>p TH na EM determinada pela porcentagem da área imunorreativa, foi menor no grupo OVX+E2 às 18:00 h comparado ao OVX+E2 às 8:00 h ( $P < 0,05$ ) (Figura 7 D). Por outro lado, a expressão de TH na EM não diferiu entre os grupos (Figura 7 E). Pode-se observar que as ratas OVX+E2 apresentaram correlação inversa entre a expressão de c-Fos em neurônios Kp-ir e a imunorreatividade à S<sup>40</sup>p TH na EM (Figura 7 F) ( $r = 0,6$ ;  $P < 0,05$ ), o que não foi visto nas ratas OVX ( $r = 0,04$ ;  $P = 0,90$ ) (Figura 7 G). Estes resultados indicam que, no momento da ocorrência do pico de PRL induzido pelo E2, há uma redução do tônus inibitório dopaminérgico, demonstrado pela menor fosforilação da TH na EM, o que resulta em maior secreção de PRL. Portanto, nossos achados sugerem que a ativação dos neurônios KNDy deve exercer um papel na gênese do pico de PRL induzido por E2.



**Figura 7:** Correlação entre a atividade dos neurônios KNDy e a dos neurônios TIDA em ratas ovariectomizadas tratadas com óleo (OVX; *n* = 6 por grupo) ou estradiol (OVX+E2; *n* = 6 por grupo). As ratas foram tratadas durante 3 dias e perfundidas às 8:00 h ou 18:00 h do quarto dia. (A - C) Marcação imunohistoquímica na eminência mediana (EM) de S<sup>40</sup>pTH em ratas OVX+E2-8:00 h (A), OVX+E2-18:00 h (B) e de TH em rata OVX+E2-18:00 h (C). As caixas pretas representam a região da EM analisada para a densidade óptica por meio do software Image J. 3V, terceiro ventrículo. (D) Porcentagem de área S<sup>40</sup>pTH-ir na ME. # *P* < 0,05 OVX+E2 – 18:00 h comparado ao OVX+E2 – 8:00 h. (E) Porcentagem de área TH-ir na ME. Correlação entre atividade de neurônios KNDy (c-Fos/Kp-ir in the ARC) e de neurônios TIDA (S<sup>40</sup>pTH-ir na EM) em ratas OVX (F) e OVX+E2 (G). Dados apresentados como média ± SEM. Escala = 200 µm.

### 4.3. Variação temporal de expressão dos genes *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* no ARC de ratas OVX+E2

Corroborando com os resultados da imunorreatividade à Kp, ratas OVX+E2 também apresentaram menores níveis de RNAm de *Kiss1* no ARC em relação ao grupo controle OVX, determinado pelo efeito principal do E2 na análise de ANOVA de duas vias ( $P < 0,01$ ). Na avaliação dos tempos estudados, esta resposta foi marcante às 8:00 h ( $P < 0,001$ ), enquanto não atingiu diferença estatística às 18:00 h. Por sua vez, foi observada uma variação diária na expressão de RNAm para *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* nas ratas OVX, nas quais a expressão dos genes foi menor às 18:00 h ( $P < 0,05$ ) (Fig. 8 A-C). Porém, diferentemente dos demais genes KNDy, os níveis de *Pdyn* apresentaram aumento significativo no grupo OVX+E2 em relação ao grupo OVX às 18:00 h ( $P < 0,05$ ) (Fig. 8 A-C), demonstrando um efeito estimulatório do E2 associado ao horário do dia na expressão deste gene. Coincidentemente, como o esperado devido ao efeito do mecanismo de retroalimentação positiva induzida pelo E2, as ratas OVX+E2 apresentaram uma maior concentração plasmática de LH às 18:00 h em relação às ratas OVX no mesmo horário ( $P < 0,05$ ) e ao período da manhã no grupo OVX+E2 ( $P < 0,001$ ) (Fig. 8 D). Em relação aos níveis plasmáticos de PRL, observou-se que ratas OVX+E2 apresentaram maior secreção deste hormônio em relação ao grupo OVX, tanto às 8:00 h ( $P < 0,05$ ) quanto às 18:00 h ( $P < 0,001$ ). Além disso, os níveis de PRL se mostraram aumentados tanto nas ratas OVX ( $P < 0,05$ ) quanto nas ratas OVX + E2 ( $P < 0,001$ ) às 18:00 h em relação aos respectivos grupos no período da manhã (Fig. 8 E). Portanto, nossos resultados indicam que uma maior expressão de *Pdyn* nos neurônios KNDy pode estar associada à gênese dos picos de secreção de LH e PRL induzidos por E2.

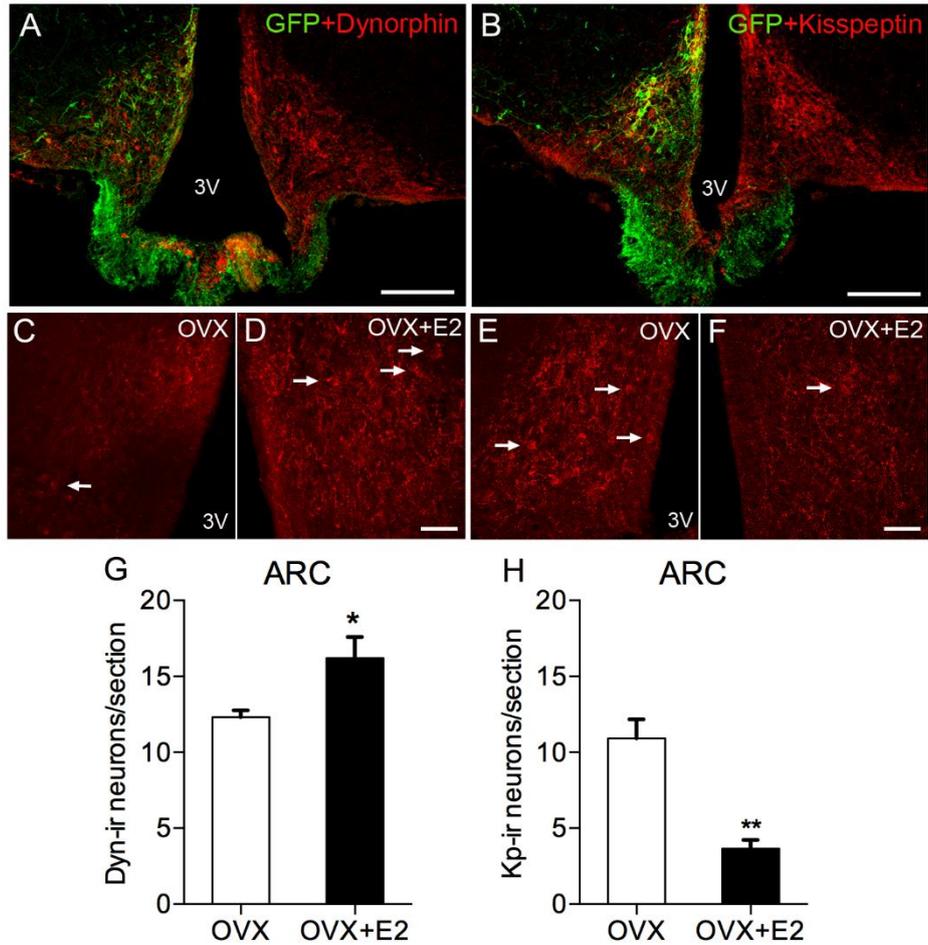


**Figura 8:** Efeito do E2 na expressão de *Kiss1*, *Nkb* e *Pdyn* no ARC de ratas. Ratas nulíparas foram OVX e tratadas diariamente durante 3 dias com E2 s.c. (OVX+E2; n = 7 por grupo) ou veículo (n = 7 por grupo). As ratas foram decapitadas às 8:00 h ou às 18:00 h. O sangue do tronco foi colhido e os cérebros foram rapidamente removidos e processados para qRT-PCR. Dados normalizados pelos níveis de *Gapdh* e expressos relativos aos níveis do grupo OVX-8 h. (A) RNAm de *Kiss1*. \*\*\*  $P < 0,001$  OVX-8 h versus OVX+E2-8 h. #  $P < 0,05$  OVX-18 h versus OVX-8 h. (B) RNAm de *Nkb*. #  $P < 0,05$  OVX-18 h versus OVX-8 h. (C) RNAm de *Pdyn*. \*  $P < 0,05$  OVX+E2-18 h versus OVX-18 h. #  $P < 0,05$  OVX-18 h versus OVX-8 h. (D) Níveis plasmáticos de LH. \*  $P < 0,05$  OVX versus OVX+E2 às 8:00 h e 18:00 h; ###  $P < 0,001$  OVX+E2-18 h versus OVX+E2-8 h. (E) Níveis plasmáticos de PRL. \*  $P < 0,05$  OVX-8 h versus OVX+E2-8 h. \*\*\*  $P < 0,001$  OVX+E2-18 h versus OVX-18 h. #  $P < 0,05$  OVX-18 h versus OVX-8 h. ###  $P < 0,001$  OVX+E2-18 h versus OVX+E2-8 h. Dados apresentados como média  $\pm$  SEM.

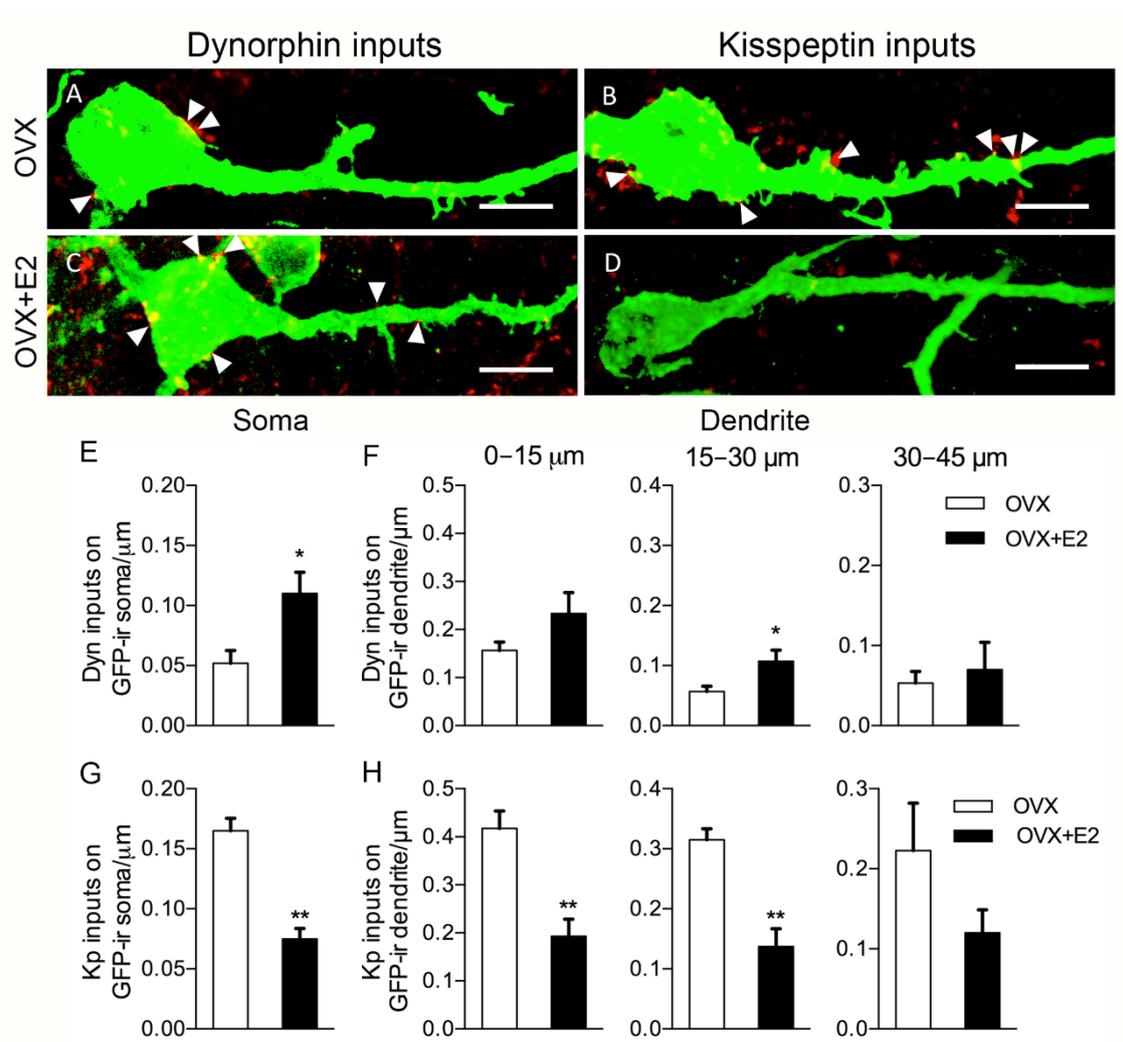
#### 4.4. Modulação de neurônios TIDA pelo E2 em ratas TH-Cre

A fotomicrografia 9 apresenta imagens representativas do núcleo ARC de ratas TH-Cre após injeção de vetor AAV1 -Brainbow dependente de Cre e expressando GFP e com dupla -marcação imunofluorescente para Dyn ou Kp (Fig. 9 A, B). Marcações simples para Dyn e Kp também estão apresentadas na figura 9 C e F. Por meio da análise por confocal, verificamos que ratas OVX+E2 apresentaram um aumento no número de neurônios Dyn-ir em comparação ao grupo controle OVX ( $P < 0,05$ ) (Fig. 9 G). Por outro lado, corroborando com os resultados da imunohistoquímica para Kp, a imunofluorescência confirmou o efeito inibitório de E2 sobre o número de neurônios Kp-ir em ratas OVX+E2 ( $P < 0,01$ ) (Fig. 9 H).

Adicionalmente, este experimento avaliou o número de *inputs* de Dyn-ir e Kp-ir no soma e dendritos de neurônios TIDA de ratas TH-Cre (Figura 10). Os neurônios transfectados no núcleo ARC foram células que expressam TH ( $92,85 \pm 1,35\%$ ;  $n = 2$ ), o que comprova a especificidade da transfecção viral (dados não-publicados de Yip S.H. e Grattan D.R). Ratas OVX+E2 apresentaram maior quantidade de *inputs* Dyn-ir tanto ao nível do soma quanto do dendrito proximal (15-30  $\mu\text{m}$ ) ( $P < 0,05$ ) de neurônios TH do ARC que expressam GFP. Em contrapartida, o tratamento com E2 reduziu as posições Kp-ir nos neurônios TH que expressam GFP nessas mesmas regiões analisadas ( $P < 0,01$ ) (Fig. 10 A - H). Esses dados sugerem a participação da Dyn A como o principal peptídeo KNDy envolvido no controle da secreção de PRL induzida por E2.



**Figura 9:** Efeito do E2 sobre a expressão de Dyn A e Kp em ratas TH- Cre que expressam GFP. Ratas TH-Cre foram submetidas à injeção unilateral (esquerda) com vetor AAV- Brainbow Cre-dependente expressando GFP. Após duas semanas de recuperação da cirurgia, as ratas foram tratadas durante 3 dias com óleo (OVX; n = 4) ou E2 s.c. (OVX+E2; n = 4) e perfundidas entre 8:00 -12:00 h do quarto dia. (A - B) Imagens representativas de confocal em menor aumento do ARC mostrando a expressão neurônios GFP- TH (verde) e Dyn A e Kp (vermelho). Marcação imunofluorescente simples para Dyn A e Kp no ARC de ratas OVX (C, E) E OVX+E2 (D, F), respectivamente. Setas brancas indicam exemplos de neurônios-ir à Dyn A ou à Kp. 3 V, terceiro ventrículo. (G) Número de neurônios- ir à Dyn. \*  $P < 0,05$  versus OVX. (H) Número de neurônios- ir à Kp. \*\*  $P < 0,01$  versus OVX. Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Escala A, B = 200  $\mu$ m. Escala C-F = 50  $\mu$ m.



**Figura 10:** Aposições de Dyn e Kp em neurônios TIDA de ratas TH-Cre que expressam GFP. Após duas semanas de recuperação da cirurgia, as ratas foram tratadas durante 3 dias com óleo (OVX; n = 4) ou E2 s.c. (OVX+E2; n = 4) e perfundidas entre 8:00 -12:00 h do quarto dia. (A - D) Imagens representativas da aposição entre terminais imunorreativos à Dyn (A, C) e Kp (B, D) em neurônios GFP-TH de ratas OVX e OVX+E2, respectivamente. Cabeça de seta indica local de aposição entre terminal de Dyn ou Kp e neurônio TH-GFP. (E) Aposições de Dyn A ao soma dos neurônios TH-GFP. \*  $P < 0,05$ . (F) Aposições de Dyn A ao longo de dendritos dos neurônios TH-GFP. \*  $P < 0,05$ . (G) Aposições de Kp ao soma dos neurônios TH-GFP. \*\*  $P < 0,01$ . (H) Aposições de Kp ao longo de dendritos dos neurônios TH-GFP. \*\*  $P < 0,01$  versus OVX nos comprimentos de dendritos correspondentes a 0-15  $\mu\text{m}$  e 15-30  $\mu\text{m}$ . Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

## **5. Discussão**

Os resultados deste trabalho fornecem evidências da ação dupla do E2 sobre a regulação dos neurônios KNDy em ratas. O E2 reduziu a expressão de Kp, como parte do efeito de feedback negativo sobre a secreção de LH e concomitantemente induziu o aumento na atividade dos neurônios KNDy no período da tarde. Ademais, o E2 promoveu maior síntese e expressão de Dyn A e também aumento das posições de Dyn A em neurônios TIDA, o que revela uma nova perspectiva onde os neurônios KNDy, mais especificamente as projeções de Dyn A, estão envolvidos no controle dos neurônios TIDA e da secreção de PRL induzida por E2.

Embora seja amplamente descrito na literatura a ação estimulatória do E2 sobre os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV, o efeito deste hormônio no ARC ainda é bastante controverso (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b; Smith et al., 2006; Adachi et al., 2007; Clarkson et al., 2008). Sabe-se que durante o ciclo menstrual de mulheres e estral de ratas há variações cíclicas nos níveis dos estrógenos ovarianos necessários para a secreção pulsátil das gonadotrofinas, pico de LH e consequente ovulação (Smith et al., 1975; Knobil, 1980; Fink, 1988; Freeman, 2006; Christian & Moenter, 2010). Assim sendo, a maior secreção de LH, bem como hipertrofia uterina vistas em ratas em proestro, foram ações causadas pelos altos níveis circulantes de E2, característicos da fase do proestro na rata, que corresponde ao período pré-ovulatório em mulheres. Além disso, observamos também que a atividade dos neurônios KNDy varia durante o ciclo estral. O E2 foi capaz de promover um aumento de 45% na atividade dos neurônios KNDy na tarde do proestro em relação ao diestro, momento da ocorrência do pico pré-ovulatório de LH. Estes dados corroboram com os achados de Kinoshita et al. (2005), e vão em direção oposta aos resultados encontrados por Smith et al. (2006). Este último relata que somente os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV estão ativados no momento do pico pré-ovulatório de LH. Entretanto, nossos achados apontam para a participação dos neurônios KNDy no mecanismo de feedback do E2 sobre a secreção de LH, já que a ativação desses neurônios foi confirmada utilizando -

se dois anticorpos distintos que avaliam ativação neuronal. Um anticorpo seletivo para c-Fos e outro que denominamos de anti-Fos, porque compreende imunorreatividade a todos os membros da família Fos, i.e., c-Fos, Fos B, Fra1 e Fra 2 (Hoffman et al., 1993b; Hoffman et al., 1993a). A maior expressão de c-Fos em neurônios KNDy no final da tarde do proestro indica que esses neurônios devem estar liberando mais os neuropeptídeos co-expressos por eles, apesar de não ser possível identificar através desse método quais sejam esses neuropeptídeos. Todavia, uma maior produção/liberação de Kp encontra suporte em um estudo recente que demonstra um aumento da concentração de Kp no ARC de ratas OVX+E2 no período da tarde (Kalil et al., 2016). Ainda, nossos resultados confirmam que o E2 atua sobre o ARC inibindo a expressão de Kp pelos neurônios KNDy nas fases do proestro e estro, refletido pelo menor número de neurônios Kp-ir, ação esta amplamente descrita na literatura, a qual acredita-se faz parte do mecanismo de feedback negativo do E2 sobre a secreção de LH (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b; Pinilla et al., 2012; Araujo-Lopes et al., 2014).

Ao contrário das fêmeas, ratos machos não apresentaram variação na imunorreatividade de c-Fos em neurônios KNDy ao longo do dia. Além disso, a atividade destes neurônios foi semelhante à uma fêmea em diestro, fase caracterizada por apresentar baixos níveis plasmáticos de E2. Sabe-se que os níveis de E2 em machos são mais baixos e não variam ao longo do dia, como em fêmeas (Dohler & Wuttke, 1975), o que faz destes animais bons controles da ação do E2 sobre a atividade dos neurônios KNDy. Com relação à expressão de Kp no ARC, os machos apresentaram cerca de 3 vezes menor expressão quando comparados à uma fêmea em diestro. Este dado demonstra que, assim como o AVPV (Kauffman et al., 2007), a população de neurônios Kp do núcleo ARC também é sexualmente dimórfica, sendo maior em fêmeas do que em machos. Estes achados estão de acordo com um estudo prévio que também encontrou maior número de neurônios Kp em ratas em diestro em comparação a ratos

machos adultos (Overgaard et al., 2013; Overgaard et al., 2014). Ainda, a expressão de Kp no ARC de ratos machos foi menor à tarde, associada com uma redução da secreção de LH nesse período. Desse modo, essas variações devem ser causadas pela existência de um padrão diário de expressão de Kp nos neurônios KNDy, bem como de secreção de LH, ainda não descrito em machos ou fêmeas. Estudo recente não encontrou variação diária na expressão de *Kiss1* no ARC de camundongos fêmeas em diestro (Yap et al., 2016). De todo modo, em machos, os neurônios KNDy devem participar somente do controle da secreção pulsátil das gonadotrofinas, uma vez que nestes animais não ocorrem os picos de LH ou PRL induzidos pelo E2.

Para comprovar o efeito do E2 em aumentar a atividade dos neurônios KNDy, utilizamos o modelo de feedback positivo, onde ratas OVX foram tratadas diariamente com E2. Neste modelo experimental, a dose utilizada de E2 é capaz de induzir picos diários de secreção de LH e PRL, semelhante ao que ocorre durante a tarde do proestro (Legan & Karsch, 1975; Mai et al., 1994; Poletini et al., 2004; Szawka et al., 2013). Como controle da eficácia do tratamento com E2, o útero foi pesado e, como o verificado no proestro, o E2 promoveu aumento do peso uterino. Ainda, os animais OVX apresentaram pronunciada atrofia uterina, pois após a ovariectomia há uma redução brusca dos níveis de E2 circulantes, haja vista que o ovário é a principal fonte de E2.

Neste modelo de ratas OVX+E2, também observa-se um efeito dual do E2 sobre a secreção de LH. O E2 foi capaz de reduzir a secreção de LH às 8:00 h, como parte do mecanismo de feedback negativo sobre a secreção de gonadotrofinas, ao passo que induziu um pico de LH às 18:00 h, à semelhança do ocorrido na tarde do proestro, como parte do feedback positivo induzido pelo E2. Corroborando com os resultados obtidos no proestro, ratas OVX+E2 apresentaram aumento na atividade dos neurônios KNDy às 18:00 h, visto que os neurônios Kp-ir apresentaram maior porcentagem de colocalização de c-Fos, o que deve resultar em uma maior liberação de Kp. Surpreendentemente, embora de menor amplitude que em ratas OVX+E2, ratas OVX apresentaram maior

imunorreatividade à c-Fos em neurônios KNDy no período da tarde. Sabe-se que os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV de camundongos apresentam um ritmo diário modulado por E2. A expressão de c-Fos nestes neurônios é aumentada no período da tarde em ratas OVX e esta resposta é amplificada pelo tratamento com E2 (Williams et al., 2011). Também, é descrito um aumento na síntese de *Kiss1*, bem como uma redução transitória da expressão de Kp no AVPV duas horas antes do pico de LH no proestro, e essa resposta é ausente nos animais em diestro (Chassard et al., 2015). Porém, ainda não está descrita a existência de um padrão circadiano da atividade dos neurônios KNDy, dependente ou não de E2, o que seria responsável pelo aumento da atividade dos neurônios KNDy em ambos grupos. Em concordância aos dados prévios da literatura, o E2 reduziu o número de neurônios KNDy tanto de manhã quanto à tarde, devido ao efeito inibitório deste hormônio sobre a expressão de Kp no ARC, como observamos em estudo prévio (Araujo-Lopes et al., 2014). Estes resultados são coerentes com a visão do ARC como sítio do feedback negativo do E2, responsável então pelo controle da secreção pulsátil das gonadotrofinas (Herbison, 2006; Beale et al., 2014; Yeo et al., 2014).

Embora o E2 causou inibição dos neurônios KNDy nos dois períodos avaliados, os neurônios remanescentes apresentaram maior ativação à tarde. Essa resposta foi fortemente correlacionada com a ativação dos neurônios GnRH em ratas OVX+E2. Apesar do aumento na atividade dos neurônios KNDy também ter sido observado no grupo OVX às 18 h, não houve correlação com a atividade dos neurônios GnRH nestes animais. Este achado sugere que os neurônios KNDy remanescentes são ativados pelo E2. Assim poderiam atuar conjuntamente aos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV na gênese do pico de LH. Dessa maneira, sugerimos que o ARC não deva ser somente sítio do feedback negativo, mas também possa participar do feedback positivo do E2 sobre a secreção de LH, embora os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV sejam os principais envolvidos nesse evento (Adachi et al., 2007; Herbison, 2008). Entretanto, o

papel dos neurônios KNDy na gênese do pico de LH parece ser inibitório, uma vez que a lesão química destes resultou em maiores níveis de LH durante o pico (Helena et al., 2015; Stathopoulos et al., 2016), o que dependeria de uma maior liberação de Dyn. Assim, a ativação dos neurônios KNDy durante o feedback positivo do E2 parece ter a função de controlar a magnitude do pico de LH, evitando uma secreção excessiva deste hormônio.

Sabe-se que o E2 é um potente estimulador da secreção de PRL e que esta é tonicamente inibida pela dopamina proveniente principalmente dos neurônios TIDA localizados no ARC e que se projetam para a EM (Grattan & Kokay, 2008). Dados prévios do nosso grupo demonstraram que a injeção central de Kp promove um aumento significativo da secreção de PRL em ratos machos e fêmeas (Szawka et al., 2010; Ribeiro et al., 2015). Adicionalmente, demonstramos também que altos níveis de PRL levam à redução da expressão de Kp nos neurônios KNDy e da secreção de LH em fêmeas (Araujo-Lopes et al., 2014). Desse modo, estes trabalhos fornecem fortes evidências da participação dos neurônios KNDy no controle da secreção de PRL. Neste presente estudo notou-se uma correlação inversa entre atividade dos neurônios KNDy e dos terminais dos neurônios TIDA na EM de ratas OVX+E2, dado pela menor expressão da enzima ativa S<sup>40p</sup> TH, passo limitante da síntese de dopamina. Ao contrário, o E2 não causou alteração na imunorreatividade à enzima TH na EM, uma vez que neste caso a imunorreatividade não corresponde exclusivamente à forma ativa da enzima. Os neurônios TIDA apresentam um ritmo endógeno de atividade, controlado pelo núcleo supraquiasmático (Mai et al., 1994). Ademais, os esteroides ovarianos não só aumentam a secreção de PRL via ação direta nos lactotrofos, mas também atuam nas três populações de neurônios dopaminérgicos, inibindo a liberação de dopamina (DeMaria et al., 2000). Nossos resultados são consistentes com o efeito do E2 em reduzir a atividade dos neurônios TIDA na EM (Arbogast & Voogt, 1993; Yen & Pan, 1998). Logo, nossos resultados demonstram uma redução no tônus dopaminérgico às

18:00 h desencadeada pelo E2 e que esse fato está correlacionado com a ativação dos neurônios KNDy, estando estes possivelmente envolvidos no aumento da secreção de PRL. De fato, um estudo recente demonstrou que a lesão parcial dos neurônios KNDy reduziu a magnitude do pico de PRL em ratas OVX+E2 (Stathopoulos et al., 2016).

Grande parte das ações do E2 são dadas através da ligação aos seus receptores clássicos: ER $\alpha$  ou ER $\beta$ . Sabe-se que os neurônios GnRH expressam somente a isoforma  $\beta$  do receptor (Hrabovszky et al., 2000; Hrabovszky et al., 2001) e que os mecanismos de feedback positivo e negativo do E2 são dependentes de ER $\alpha$  (Wintermantel et al., 2006). Ainda, o feedback negativo parece ser dependente da ativação da via não -clássica de ER $\alpha$  (Glidewell-Kenney et al., 2007). Todavia, foi descrito que tanto os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV quanto os neurônios KNDy expressam as duas isoformas de ERs, estando estes neurônios diretamente envolvidos no controle da secreção das gonadotrofinas (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Desse modo, utilizamos o tratamento adicional com tamoxifen, que é um modulador seletivo dos ERs (Riggs & Hartmann, 2003), para verificar a participação desses receptores na ativação dos neurônios KNDy durante o feedback positivo induzido pelo E2. Após o tratamento com tamoxifen, observamos o bloqueio da resposta de ativação dos neurônios KNDy induzida pelo E2 no período da tarde. Associado a essa resposta, o tamoxifen foi capaz de reduzir a secreção de LH, bem como o peso uterino, o que demonstra a eficácia do tratamento com o tamoxifen em antagonizar os efeitos estimulatórios do E2 nos diferentes parâmetros estudados. Estes resultados estão de acordo com dados prévios da literatura que demonstram falha na ovulação e redução dos níveis plasmáticos de LH e PRL em ratas no proestro após tratamento com tamoxifen (Jordan et al., 1975; Donath & Nishino, 1998; Del Bianco-Borges & Franci, 2015). Ainda, nosso grupo demonstrou recentemente que o tamoxifen é capaz de inibir o efeito do feedback positivo do E2, assim como os efeitos do E2 sobre os neurônios TIDA e conseqüentemente secreção de PRL, indicando sua ação como antagonista de

ER no hipotálamo (Aquino et al., 2016). O tamoxifen apresentou também capacidade parcial em reverter o efeito inibitório do E2 sobre a expressão de Kp pelos neurônios KNDy. Estes dados são consistentes com os obtidos por Aquino et al. (2016), que verificou uma reversão parcial pelo tamoxifen do efeito inibitório do E2 sobre a expressão de Kp no ARC de ratas OVX+E2. Assim, estes achados comprovam que as ações do E2 sobre os neurônios KNDy aqui descritas são dependentes da ativação clássica de ER, uma vez que o tratamento com tamoxifen foi eficaz em bloquear a expressão de c-Fos por estes neurônios.

Os neurônios KNDy co -expressam Kp, NKB e Dyn A e acredita -se que sejam essenciais para a regulação da secreção pulsátil de GnRH em diferentes espécies (Goodman et al., 2007; Navarro et al., 2009; Hrabovszky et al., 2010; Kunimura et al., 2016). Porém, ainda não está claro o papel diferencial de cada um desses neuropeptídeos no controle da secreção de LH e PRL e também como estes genes são regulados pelo E2. Como o esperado, a secreção de PRL foi maior nas ratas OVX+E2 nos dois períodos estudados, devido ao efeito estimulatório do E2 sobre a secreção de PRL (Grattan & Kokay, 2008). Embora ratas OVX tenham apresentado um aumento significativo da secreção de PRL às 18:00 h, o pico de PRL foi visto somente no grupo OVX+E2, o que ressalta o efeito estimulatório do E2 para a ocorrência do pico de PRL às 18:00 h. O leve aumento da sua secreção vista nas ratas OVX às 18:00 h deve-se, provavelmente, a uma variação diária da atividade dos neurônios TIDA (DeMaria et al., 2000; Liang & Pan, 2000). Esta variação diária da secreção de PRL foi descrita em ratas tanto na presença quanto na ausência de E2, porém, a secreção de PRL é potencializada pelo E2 (Mai et al., 1994). Além disso, foi claramente observada a ação dual do E2 sobre a secreção de LH, visto que inibiu a secreção de LH no período da manhã, como parte do feedback negativo, e gerou um robusto aumento na secreção deste hormônio à tarde, como parte do feedback positivo induzido pelo E2. Associado aos dados hormonais, a análise do RNAm por RT-PCR revelou que o tratamento com

E2 reduziu a síntese do RNAm para *Kiss1* no ARC, de acordo com o observado na expressão do peptídeo, que também foi reduzido pelo E2 no ARC. O fato de não termos encontrado diferença significativa na redução da expressão de *Kiss1* no ARC à tarde pode estar relacionado ao horário em que as ratas foram eutanasiadas, sugerindo o envolvimento de um fator temporal associado à ação do E2. De fato, notamos uma redução na expressão dos três genes às 18:00 h nos animais OVX em relação ao período da manhã, indicando a existência de um padrão diário de variação de expressão dos genes KNDy.

De forma semelhante à Kp, humanos que apresentam mutações tanto no gene quanto no receptor para NKB são inférteis (Topaloglu et al., 2009) e a injeção de agonista seletivo de NK3R causa um aumento na secreção de LH em ratos, ovelhas e macacos (Ramaswamy et al., 2009; Billings et al., 2010; Navarro et al., 2011). Por sua vez, também existem trabalhos que relatam uma ação inibitória do NKB sobre a secreção de LH (Navarro et al., 2009), o que torna bastante contraditório a função deste gene na regulação do LH. No nosso presente trabalho, não observou-se nenhuma alteração da expressão do RNAm para *Nkb* após tratamento com E2. Em contrapartida, outros pesquisadores relataram um aumento na expressão do RNAm para NKB após a ovariectomia e durante a menopausa em mulheres (Rance & Young, 1991; Rance & Bruce, 1994). O E2 pode reverter o aumento de *Nkb* causado pela ovariectomia, entretanto, isto parece depender dos níveis circulantes deste hormônio, pois em camundongos foi demonstrado efeito para altas doses, mas não baixas doses de E2 (Overgaard et al., 2014).

Ao contrário da Kp e NKB, a Dyn exerce efeitos inibitórios sobre a secreção pulsátil de GnRH e consequentemente sobre o LH (Wakabayashi et al., 2010), através da ligação aos receptores KOR expressos no núcleo ARC (Goodman et al., 2004). Porém, este neuropeptídeo atua diretamente na regulação da secreção de PRL, estimulando a secreção deste hormônio em mamíferos (Van Vugt et al., 1981; Leadem

& Kalra, 1985; Gilbeau et al., 1986, 1987; Zhang et al., 2004). Com efeito, ratas OVX+E2 apresentaram um aumento na expressão gênica de *Pdyn* no ARC às 18:00 h, coincidindo com os picos de LH e PRL visto nesses animais. Em camundongos, dados de hibridização *in situ* sugerem uma inibição da expressão de *Pdyn* pelo E2 (Navarro et al., 2009). Isto está em contradição com nossos dados de qPCR que demonstram que o E2 estimula a expressão de *Pdyn* no ARC de ratas. Esta discrepância pode estar relacionada ao uso de diferentes metodologias para análise da expressão de *Pdyn*. Outra explicação, é decorre do fato deste efeito do E2 ser tempo -dependente, uma vez que ocorreu apenas no período da tarde, o que pode ter impedido a sua observação no estudo de Navarro et al. (2009). Ademais, é sabido que ratos e camundongos apresentam diferenças genuínas na imunorreatividade à Kp, bem como expressão do gene *Kiss1* no hipotálamo (Overgaard et al., 2013), talvez o mesmo possa acontecer com a *Pdyn* do ARC. Importante notar, todavia, que corroborando com os resultados da expressão de *Pdyn*, ratas OVX+E2 apresentaram também um aumento do número de neurônios Dyn-ir no ARC, o que indica uma ação estimulatória do E2 em promover o aumento tanto do gene quando do peptídeo de Dyn no ARC de ratas.

É sugerido que os neurônios KNDy participem do controle da secreção de PRL via projeções inibitórias aos neurônios TIDA, o que reduz o tônus dopaminérgico (Szawka et al., 2010; Sawai et al., 2012). Sabe-se que há expressão de receptores para Dyn A no ARC (Mansour et al., 1994; Stathopoulos et al., 2016). Aproximadamente 15% dos neurônios TIDA expressam *Kiss1r* (Higo, et al., 2016), e estes são responsivos à injeção icv de Kp (Szawka et al., 2010). Ademais, os neurônios TIDA também recebem contatos de fibras Dyn -ir (Fitzsimmons et al., 1992) e respondem com aumento da atividade elétrica em resposta à Dyn *in vitro* (Zhang & van den Pol, 2015). Assim, para entender melhor o controle da secreção de PRL pelos neurônios KNDy, é necessário identificar isoladamente as projeções de Kp e Dyn A enviadas aos neurônios TIDA. Entretanto, o cérebro apresenta uma complexa rede de circuitos, sendo difícil identificar

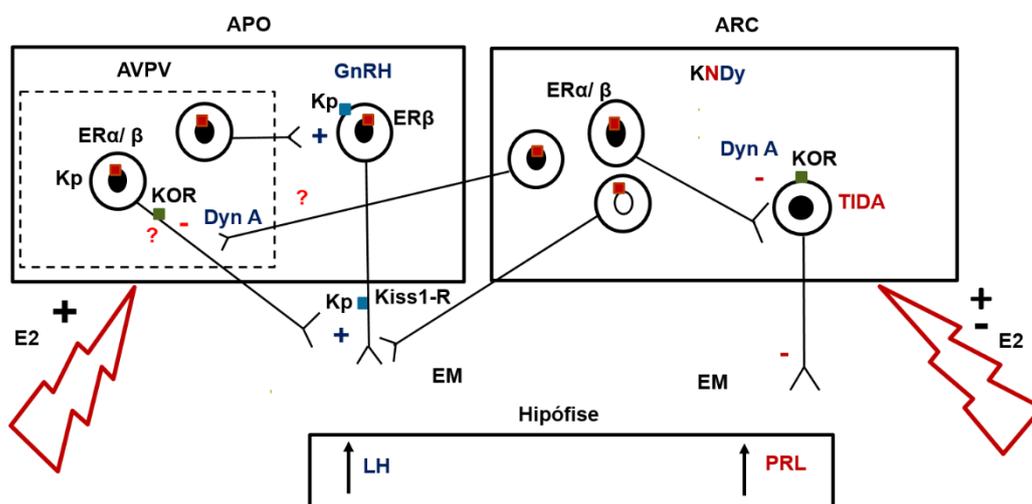
precisamente cada projeção neuronal. Desse modo, utilizamos o método AAV - Brainbow, onde um vetor viral expressa proteínas fluorescentes de forma Cre-recombinase dependente, a qual é expressa nos neurônios TIDA de ratas TH-Cre (Witten et al., 2011). Assim, os neurônios TIDA transfectados em nosso experimento passaram a expressar EYFP, a qual foi detectada por um anticorpo anti-GFP (Weissman & Pan, 2015). A especificidade da transfecção viral foi testada previamente por Yip et al., (dados não publicados), mostrando que praticamente todos os neurônios transfectados no núcleo ARC foram células que expressam TH. Logo, o AAV -Brainbow nos permitiu quantificar as projeções de Kp e Dyn A para os processos de neurônios TIDA. Com efeito, ratas OVX+E2, apresentaram aumento dos *inputs* de Dyn A aos neurônios TIDA, tanto no soma do neurônio quanto nos dendritos, ao passo que foi notada uma redução dos *inputs* de Kp nas mesmas regiões neuronais. Esses dados sugerem que a Dyn A, seja o principal neuropeptídeo KNDy envolvido no controle da secreção de PRL. O aumento da expressão de Dyn no ARC correlacionou-se com o maior número de *inputs* de Dyn A nos neurônios TIDA. Uma vez que a Dyn tem efeito inibitório sobre os neurônios TIDA (Stathopoulos et al., 2016), isto poderia levar à inibição do sistema de dopaminérgico, conduzindo, portanto, ao aumento da PRL induzido por E2.

Sabe-se que a lesão parcial dos neurônios KNDy promove um aumento da amplitude do pico de LH em ratas. Estes achados reforçam a ação inibitória da Dyn A sobre a secreção de LH, uma vez que os neurônios KNDy se projetam para a APO e a liberação de Dyn limita a magnitude do pico de LH (Helena et al., 2015; Mittelman-Smith et al., 2016). Entretanto, embora a lesão parcial dos neurônios KNDy tenha reduzido a magnitude do pico de PRL induzido por E2, o tratamento icv com o antagonista de KOR, Nor-BNI, não apresentou efeito sobre este evento hormonal (Stathopoulos et al., 2016). Pode-se especular que a dose de Nor-BNI utilizada neste estudo não tenha sido adequada para bloquear o pico de PRL, o que precisa ser melhor investigado em futuros

estudos. Não obstante, nossos resultados sugerem que haja uma alteração de fenótipo dos neurônios KNDy induzida pelo E2, que passam a produzir e expressar mais Dyn A em relação aos demais neuropeptídeos. Ainda, demonstramos que o controle da secreção de PRL pelos neurônios KNDy durante o mecanismo de feedback positivo do E2 é via aumento dos *inputs* inibitórios de Dyn A aos neurônios TIDA. Portanto, nosso trabalho fornece importantes evidências do envolvimento da Dyn no pico de PRL induzido pelo E2. Por conseguinte, revelamos um novo aspecto da regulação estrogênica dos neurônios KNDy em ratas, o que sugere a existência de duas populações funcionalmente distintas de neurônios KNDy, relacionadas aos mecanismos de feedback negativo e positivo do E2. Os resultados encontrados neste trabalho expande o nosso conhecimento acerca do controle neural da secreção das gonadotrofinas e fertilidade.

## **6. Conclusões**

O E2 exerce duplo efeito sobre a regulação dos neurônios KNDy: reduz a expressão de Kp como parte do efeito de feedback negativo sobre a secreção de LH e, por outro lado, induz o aumento da imunorreatividade de c-Fos em neurônios KNDy remanescentes no período da tarde, horário dos picos pré-ovulatórios de LH e PRL. Este efeito do E2 depende da ativação dos receptores para estrógeno, pois é revertido pelo tamoxifen. Ainda, a ativação dos neurônios KNDy em ratas OVX+E2 apresentou relação inversa com a fosforilação da TH na EM e forte correlação positiva com a expressão de c-Fos nos neurônios GnRH. Estes achados sugerem a participação dos neurônios KNDy no controle da ativação dos neurônios GnRH e dos neurônios TIDA, que são responsáveis pelos picos de secreção de LH e PRL, respectivamente. A maior expressão tanto do gene quanto do peptídeo para Dyn no ARC, bem como, o aumento dos *inputs* de Dyn em neurônios TIDA de ratas OVX+E2, coincide com o aumento da atividade dos neurônios KNDy, indicando o envolvimento da Dyn dos neurônios KNDy na gênese do pico de PRL. O mecanismo proposto da regulação dos neurônios KNDy pelo E2 em ratas está exemplificado na figura 11.



**Figura 11:** Mecanismo proposto da regulação dos neurônios KNDy pelo E2 em ratas. O E2 atua de duas maneiras no ARC: inibe a expressão de Kp como parte do mecanismo de feedback negativo e ativa os neurônios kisspeptinérgicos remanescentes, sendo esses efeitos dependentes de ER. Os neurônios ativados no momento dos picos de LH e PRL induzidos pelo E2 se projetam para a APO, onde suprimem a magnitude da secreção de LH via sinalização Dyn/KOR. Ainda, o E2 promove o aumento da síntese e expressão de Dyn e consequentemente

há um aumento dos *inputs* de Dyn A aos neurônios TIDA, reduzindo o tônus dopaminérgico, resultando no aumento da secreção de PRL. E2, estradiol. TIDA, neurônios tuberoinfundibular dopaminérgico. KOR, receptor de dinorfina. Pdyn: prodinorfina. Dyn A: dinorfina A. ER: receptor de estrógeno. ARC: núcleo arqueado. APO: área préptica. AVPV: núcleo anteroventral periventricular. Kp, kisspeptina. Kiss1R: receptor de Kp. EM: eminência mediana. LH: hormônio luteinizante. PRL: prolactina.

## REFERÊNCIAS

1. Abel TW, Voytko ML, Rance NE (1999) The effects of hormone replacement therapy on hypothalamic neuropeptide gene expression in a primate model of menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2111-2118.
2. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K (2007) Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J ReprodDev* 53:367-378.
3. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martin JD, Candenias ML (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem* 11:2045-2081.
4. Andrews ZB, Grattan DR (2003) Opioid receptor subtypes involved in the regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol* 15:227-236.
5. Aquino NS, Araujo-Lopes R, Batista IA, Henriques PC, Poletini MO, Franci CR, Reis AM, Szawka RE (2016) Hypothalamic Effects of Tamoxifen on Oestrogen Regulation of Luteinising Hormone and Prolactin Secretion in Female Rats. *J Neuroendocrinol* 28.
6. Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, Franci CR, Grattan DR, Szawka RE (2014) Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. *Endocrinology* 155:1010-1020.
7. Arbogast LA, Voogt JL (1993) Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 58:501-510.

8. Arbogast LA, Voogt JL (1998) Endogenous opioid peptides contribute to suckling-induced prolactin release by suppressing tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid levels in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology* 139:2857-2862.
9. Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ (2010) Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 151:2233-2243.
10. Beale KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, Sleeth ML, Sam AH, Greenwood HC, McGavigan AK, Dhillo WS, Mora JM, Li XF, Franks S, Bloom SR, O'Byrne KT, Murphy KG (2014) The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology* 155:1091-1098.
11. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202:631-633.
12. Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22:724-763.
13. Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC (1977) Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 100:452-458.
14. Bero LA, Lurie SN, Kuhn CM (1987) Early ontogeny of kappa-opioid receptor regulation of prolactin secretion in the rat. *Brain Res* 465:189-196.
15. Billings HJ, Connors JM, Altman SN, Hileman SM, Holaskova I, Lehman MN, McManus CJ, Nestor CC, Jacobs BH, Goodman RL (2010) Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 151:3836-3846.

16. Bouchard P, Lagoguey M, Brailly S, Schaison G (1985) Gonadotropin-releasing hormone pulsatile administration restores luteinizing hormone pulsatility and normal testosterone levels in males with hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 60:258-262.
17. Brock O, Bakker J (2013) The two kisspeptin neuronal populations are differentially organized and activated by estradiol in mice. *Endocrinology* 154:2739-2749.
18. Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR (2010) Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 518:92-102.
19. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE (2006) Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 498:712-726.
20. Cai D, Cohen KB, Luo T, Lichtman JW, Sanes JR (2013) Improved tools for the Brainbow toolbox. *Nat Methods* 10:540-547.
21. Cernea M, Padmanabhan V, Goodman RL, Coolen LM, Lehman MN (2015) Prenatal Testosterone Treatment Leads to Changes in the Morphology of KNDy Neurons, Their Inputs, and Projections to GnRH Cells in Female Sheep. *Endocrinology* 156:3277-3291.
22. Chassard D, Bur I, Poirel VJ, Mendoza J, Simonneaux V (2015) Evidence for a Putative Circadian Kiss-Clock in the Hypothalamic AVPV in Female Mice. *Endocrinology* 156:2999-3011.
23. Chavkin C, James IF, Goldstein A (1982) Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 215:413-415.
24. Christian CA, Moenter SM (2010) The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 31:544-577.

25. Ciofi P, Leroy D, Tramu G (2006) Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141:1731-1745.
26. Clarkson J, Herbison AE (2006) Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817-5825.
27. Clarkson J, d'Anglemont dTX, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *JNeurosci* 28:8691-8697.
28. Clarkson J, d'Anglemont dTX, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE (2009) Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21:673-682.
29. Costello LC, Franklin RB (1994) Effect of prolactin on the prostate. *Prostate* 24:162-166.
30. d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH (2010) The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology* 25:207-217.
31. d'Anglemont dTX, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH (2008) Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926-3932.
32. Dahl SK, Amstalden M, Coolen L, Fitzgerald M, Lehman M (2009) Dynorphin immunoreactive fibers contact GnRH neurons in the human hypothalamus. *Reprod Sci* 16:781-787.
33. de Croft S, Boehm U, Herbison AE (2013) Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology* 154:2750-2760.

34. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10972-10976.
35. Del Bianco-Borges B, Franci CR (2015) Estrogen-dependent post-translational change in the nitric oxide system may mediate the leptin action on LH and prolactin secretion. *Brain Res* 1604:62-73.
36. Dellovade TL, Merchenthaler I (2004) Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 145:736-742.
37. DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME (2000) Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 879:139-147.
38. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6609-6615.
39. Dohler KD, Wuttke W (1975) Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97:898-907.
40. Dombrowicz D, Sente B, Closset J, Hennen G (1992) Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology* 130:695-700.
41. Donath J, Nishino Y (1998) Effects of partial versus pure antiestrogens on ovulation and the pituitary-ovarian axis in the rat. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, pp 247-254. England.
42. Fink G (1988) Gonadotropin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil E, Neill JD, eds), pp 1349-1377. New York: Raven Press.

43. Fitzsimmons MD, Olschowka JA, Wiegand SJ, Hoffman GE (1992) Interaction of opioid peptide-containing terminals with dopaminergic perikarya in the rat hypothalamus. *Brain Res* 581:10-18.
44. Foradori CD, Goodman RL, Adams VL, Valent M, Lehman MN (2005) Progesterone increases dynorphin a concentrations in cerebrospinal fluid and preprodynorphin messenger ribonucleic Acid levels in a subset of dynorphin neurons in the sheep. *Endocrinology* 146:1835-1842.
45. Foradori CD, Coolen LM, Fitzgerald ME, Skinner DC, Goodman RL, Lehman MN (2002) Colocalization of progesterone receptors in parvicellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology* 143:4366-4374.
46. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *NeurosciLett* 401:225-230.
47. Freeman ME (2006) The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Neill JD, ed), pp 2327-2388. San Diego: Academic Press.
48. Fu LY, van den Pol AN (2010) Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci* 30:10205-10219.
49. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *BiochemBiophysResCommun* 312:1357-1363.
50. Fuxe K (1965) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 64:SUPPL.

51. Gala RR (1990) The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci* 46:1407-1420.
52. Gallo RV (1990) Kappa-opioid receptor involvement in the regulation of pulsatile luteinizing hormone release during early pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* 2:685-691.
53. Gibbs DM, Neill JD (1978) Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology* 102:1895-1900.
54. Gilbeau PM, Hosobuchi Y, Lee NM (1986) Dynorphin effects on plasma concentrations of anterior pituitary hormones in the nonhuman primate. *J Pharmacol Exp Ther* 238:974-977.
55. Gilbeau PM, Hosobuchi Y, Lee NM (1987) Consequence of dynorphin-A administration on anterior pituitary hormone concentrations in the adult male rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 45:284-289.
56. Gill JC, Navarro VM, Kwong C, Noel SD, Martin C, Xu S, Clifton DK, Carroll RS, Steiner RA, Kaiser UB (2012) Increased Neurokinin B (Tac2) Expression in the Mouse Arcuate Nucleus Is an Early Marker of Pubertal Onset with Differential Sensitivity to Sex Steroid-Negative Feedback than Kiss1. *Endocrinology*.
57. Glanowska KM, Moenter SM (2015) Differential regulation of GnRH secretion in the preoptic area (POA) and the median eminence (ME) in male mice. *Endocrinology* 156:231-241.
58. Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL (2007) Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8173-8177.
59. Goodman RL, Coolen LM, Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Connors JM, Fitzgerald ME, Lehman MN (2004) Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* 145:2959-2967.

60. Goodman RL, Maltby MJ, Millar RP, Hileman SM, Nestor CC, Whited B, Tseng AS, Coolen LM, Lehman MN (2012) Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrus ewes. *Endocrinology* 153:5918-5927.
61. Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL, Millar RP, Cernea M, Coolen LM, Lehman MN (2013) Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology* 154:4259-4269.
62. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ (2007) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752-5760.
63. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA (2009a) From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides* 30:4-9.
64. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077.
65. Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, Clifton DK, Levine JE, Steiner RA (2009b) Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci* 29:9390-9395.
66. Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE (2000) Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 141:4218-4225.

67. Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE (1995) Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 62:147-154.
68. Grattan DR, Kokay IC (2008) Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20:752-763.
69. Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA, Binart N (2003) Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod Biol Endocrinol* 1:12.
70. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349-11356.
71. Han SY, McLennan T, Czielesky K, Herbison AE (2015) Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13109-13114.
72. Helena CV, Toporikova N, Kalil B, Stathopoulos AM, Pogrebna VV, Carolino RO, Anselmo-Franci JA, Bertram R (2015) KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 156:4200-4213.
73. Herbison AE (2006) Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Neill JD, ed), pp 1415-1482. San Diego: Academic Press.
74. Herbison AE (2008) Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev* 57:277-287.
75. Herbison AE, Pape JR (2001) New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22:292-308.

76. Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH (2010) Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 151:312-321.
77. Higo S, Iijima N, Ozawa H (2016) Characterization of Kiss1r (Gpr54)-expressing neurons in the arcuate nucleus of the female rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*.
78. Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993a) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 14:173-213.
79. Hoffman GE, Lee WS, Smith MS, Abbud R, Roberts MM, Robinson AG, Verbalis JG (1993b) c-Fos and Fos-related antigens as markers for neuronal activity: perspectives from neuroendocrine systems. *NIDA Res Monogr* 125:117-133.
80. Holzbauer M, Racke K (1985) The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 63:97-116.
81. Hou Y, Voogt JL (1999) Effects of naloxone infusion on nocturnal prolactin secretion and Fos/FRA expression in pregnant rats. *Endocrine* 10:145-152.
82. Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL (2000) Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 141:3506-3509.
83. Hrabovszky E, Steinhäuser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z (2001) Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 142:3261-3264.
84. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z, Kallo I (2010) The kisspeptin system of the human

- hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 31:1984-1998.
85. Hrabovszky E, Sipos MT, Molnar CS, Ciofi P, Borsay BA, Gergely P, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z (2012) Low degree of overlap between kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin immunoreactivities in the infundibular nucleus of young male human subjects challenges the KNDy neuron concept. *Endocrinology* 153:4978-4989.
  86. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264-272.
  87. Jayasena CN, Abbara A, Veldhuis JD, Comninou AN, Ratnasabapathy R, De Silva A, Nijher GM, Ganiyu-Dada Z, Mehta A, Todd C, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS (2014) Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of Kisspeptin-54. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E953-961.
  88. Jordan VC, Koerner S, Robison C (1975) Inhibition of oestrogen-stimulated prolactin release by anti-oestrogens. *J Endocrinol* 65:151-152.
  89. Kalil B, Ribeiro AB, Leite CM, Uchoa ET, Carolino RO, Cardoso TS, Elias LL, Rodrigues JA, Plant TM, Poletini MO, Anselmo-Franci JA (2016) The Increase in Signaling by Kisspeptin Neurons in the Preoptic Area and Associated Changes in Clock Gene Expression That Trigger the LH Surge in Female Rats Are Dependent on the Facilitatory Action of a Noradrenaline Input. *Endocrinology* 157:323-335.
  90. Karsch FJ (1987) Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Annu Rev Physiol* 49:365-382.

91. Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton DK, Steiner RA (2009) Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1212-1221.
92. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M (2007) Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148:1774-1783.
93. Kawano H, Daikoku S (1981) Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32:179-186.
94. Kawano H, Daikoku S (1987) Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 265:242-253.
95. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M (1991) The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 12:235-251.
96. Kerdelhue B, Brown S, Lenoir V, Queenan JT, Jr., Jones GS, Scholler R, Jones HW, Jr. (2002) Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human. *Neuroendocrinology* 75:158-163.
97. King JC, Anthony EL (1984) LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides* 5 Suppl 1:195-207.
98. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146:4431-4436.
99. Kinsey-Jones JS, Grachev P, Li XF, Lin YS, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT (2012) The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. *Endocrinology* 153:307-315.

100. Knobil E (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36:53-88.
101. Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR (2011) Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology* 152:526-535.
102. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le PE, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636.
103. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE (2005) Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 489:372-386.
104. Kunimura Y, Iwata K, Ishigami A, Ozawa H (2016) Age-related alterations in hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons and in pulsatile LH release in female and male rats. *Neurobiol Aging* 50:30-38.
105. Kuusio H, Heponiemi T, Vanska J, Aalto AM, Ruskoaho J, Elovainio M (2013) Psychosocial stress factors and intention to leave job: differences between foreign-born and Finnish-born general practitioners. *Scand J Public Health* 41:405-411.
106. Lai CH, Yiu CN, Lai SK, Ng KP, Yung KK, Shum DK, Chan YS (2010) Maturation of canal-related brainstem neurons in the detection of horizontal angular acceleration in rats. *J Comp Neurol* 518:1742-1763.
107. Leadem CA, Kalra SP (1985) Effects of endogenous opioid peptides and opiates on luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 41:342-352.

108. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107.
109. Lee JH, Welch DR (1997) Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57:2384-2387.
110. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737.
111. Legan SJ, Karsch FJ (1975) A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology* 96:57-62.
112. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL (2010) Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479-3489.
113. Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP, O'Byrne KT (2009) Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* 4:e8334.
114. Liang SL, Pan JT (2000) An endogenous serotonergic rhythm acting on 5-HT(2A) receptors may be involved in the diurnal changes in tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion in female rats. *Neuroendocrinology* 72:11-19.
115. Liu B, Arbogast LA (2008) Phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in the stalk-median eminence is decreased by progesterone in cycling female rats. *Endocrinology* 149:1462-1469.

116. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
117. Mahoney MM, Sisk C, Ross HE, Smale L (2004) Circadian regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons and the preovulatory surge in luteinizing hormone in the diurnal rodent, *Arvicanthis niloticus*, and in a nocturnal rodent, *Rattus norvegicus*. *Biol Reprod* 70:1049-1054.
118. Mai LM, Shieh KR, Pan JT (1994) Circadian changes of serum prolactin levels and tuberoinfundibular dopaminergic neuron activities in ovariectomized rats treated with or without estrogen: the role of the suprachiasmatic nuclei. *Neuroendocrinology* 60:520-526.
119. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ (1988) Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 11:308-314.
120. Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350:412-438.
121. Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2007) Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology* 148:140-147.
122. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr., Civelli O (1989) Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7625-7628.
123. Merkley CM, Porter KL, Coolen LM, Hileman SM, Billings HJ, Drews S, Goodman RL, Lehman MN (2012) KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. *Endocrinology* 153:5406-5414.

124. Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, Lukyanov KA, Lukyanov S, Gadella TW, Chudakov DM (2007) Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4:555-557.
125. Messenger S (2005) Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *JNeuroendocrinol* 17:687-688.
126. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1761-1766.
127. Mitchell V, Prevot V, Jennes L, Aubert JP, Croix D, Beauvillain JC (1997) Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* 8:3167-3172.
128. Mittelman-Smith MA, Krajewski-Hall SJ, McMullen NT, Rance NE (2016) Ablation of KNDy Neurons Results in Hypogonadotropic Hypogonadism and Amplifies the Steroid-Induced LH Surge in Female Rats. *Endocrinology* 157:2015-2027.
129. Molitch ME (2010) Pituitary gland: can prolactinomas be cured medically? *Nat Rev Endocrinol* 6:186-188.
130. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276:28969-28975.
131. Nag S, Sanyal S, Ghosh KK, Biswas NM (1981) Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. *Horm Res* 15:72-77.

132. Nakahara T, Uenoyama Y, Iwase A, Oishi S, Nakamura S, Minabe S, Watanabe Y, Deura C, Noguchi T, Fujii N, Kikkawa F, Maeda K, Tsukamura H (2013) Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev* 59:479-484.
133. Naqvi T, Haq W, Mathur KB (1998) Structure-activity relationship studies of dynorphin A and related peptides. *Peptides* 19:1277-1292.
134. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA (2009) Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859-11866.
135. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, Clifton DK, Tena-Sempere M, Steiner RA (2011) Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E202-210.
136. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (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* 145:4565-4574.
137. Navarro VM, Bosch MA, Leon S, Simavli S, True C, Pinilla L, Carroll RS, Seminara SB, Tena-Sempere M, Ronnekleiv OK, Kaiser UB (2015) The integrated hypothalamic tachykinin-kisspeptin system as a central coordinator for reproduction. *Endocrinology* 156:627-637.
138. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla

- L, Tena-Sempere M (2005) Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146:156-163.
139. Neill JD (1972) Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 90:1154-1159.
140. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617.
141. Onaga T (2014) Tachykinin: recent developments and novel roles in health and disease. *Biomol Concepts* 5:225-243.
142. Overgaard A, Ruiz-Pino F, Castellano JM, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD (2014) Disparate changes in kisspeptin and neurokinin B expression in the arcuate nucleus after sex steroid manipulation reveal differential regulation of the two KNDy peptides in rats. *Endocrinology* 155:3945-3955.
143. Overgaard A, Tena-Sempere M, Franceschini I, Desroziers E, Simonneaux V, Mikkelsen JD (2013) Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice. *Peptides* 45:85-90.
144. Palkovits M (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59:449-450.
145. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
146. Petraglia F, Vale W, Rivier C (1987) Beta-endorphin and dynorphin participate in the stress-induced release of prolactin in the rat. *Neuroendocrinology* 45:338-342.

147. Pillon D, Caraty A, Fabre-Nys C, Bruneau G (2003) Short-term effect of oestradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibular nucleus of ewes. *J Neuroendocrinol* 15:749-753.
148. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M (2012) Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 92:1235-1316.
149. Poletini MO, Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA (2004) Role of the locus coeruleus in the prolactin secretion of female rats. *Brain Res Bull* 63:331-338.
150. Ramaswamy S, Gibbs RB, Plant TM (2009) Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones. *J Neuroendocrinol* 21:795-804.
151. Rance NE (2009) Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 30:111-122.
152. Rance NE, Young WS, 3rd (1991) Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalamus of postmenopausal women. *Endocrinology* 128:2239-2247.
153. Rance NE, Bruce TR (1994) Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 60:337-345.
154. Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA (2010) Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 1364:116-128.
155. Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE (2015) Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 27:88-99.

156. Richard N, Corvaisier S, Camacho E, Kottler ML (2009) KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides* 30:123-129.
157. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML (2008) KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 20:381-393.
158. Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW (1933) The preparation, identification and assay of prolactin - A hormone of the anterior pituitary. *Am J Physiol* 105:191-216.
159. Riggs BL, Hartmann LC (2003) Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 348:618-629.
160. Romano N, Yip SH, Hodson DJ, Guillou A, Parnaudeau S, Kirk S, Tronche F, Bonnefont X, Le Tissier P, Bunn SJ, Grattan DR, Mollard P, Martin AO (2013) Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci* 33:4424-4433.
161. Rometo AM, Rance NE (2008) Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women. *J Neuroendocrinol* 20:1376-1381.
162. Sainsbury R (2013) The development of endocrine therapy for women with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 39:507-517.
163. Sandoval-Guzman T, Rance NE (2004) Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1026:307-312.
164. Sannella MI, Petersen SL (1997) Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize

- messenger ribonucleic acid for mu, kappa, or delta opiate receptors. *Endocrinology* 138:1667-1672.
165. Sarkar DK, Yen SS (1985) Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: a possible role for beta-endorphin as a mediator. *Endocrinology* 116:2080-2084.
  166. Sawai N, Iijima N, Takumi K, Matsumoto K, Ozawa H (2012) Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. *Neurosci Res*.
  167. Schiltz JC, Sawchenko PE (2007) Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. *J Comp Neurol* 502:455-467.
  168. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627.
  169. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2129-2134.
  170. Shupnik MA (1996a) Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 54:279-286.
  171. Shupnik MA (1996b) Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *Trends Endocrinol Metab* 7:272-276.
  172. Skrapits K, Borsay BA, Herczeg L, Ciofi P, Liposits Z, Hrabovszky E (2015) Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. *Front Neurosci* 9:29.

173. Smith JT, Saleh SN, Clarke IJ (2009) Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the ewe. *Neuroendocrinology* 90:283-291.
174. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA (2005a) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686-3692.
175. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA (2006) Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26:6687-6694.
176. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA (2005b) Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976-2984.
177. Smith MJ, Gallo RV (1997) The effect of blockade of kappa-opioid receptors in the medial preoptic area on the luteinizing hormone surge in the proestrous rat. *Brain Res* 768:111-119.
178. Smith MS, Freeman ME, Neill JD (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* 96:219-226.
179. Smith MS, McLean BK, Neill JD (1976) Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 98:1370-1377.
180. Stathopoulos AM, Helena CV, Cristancho-Gordo R, Gonzalez-Iglesias AE, Bertram R (2016) Influence of dynorphin on estradiol- and cervical stimulation-induced prolactin surges in ovariectomized rats. *Endocrine* 53:585-594.
181. Steyn FJ, Wan Y, Clarkson J, Veldhuis JD, Herbison AE, Chen C (2013) Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing

- hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology* 154:4939-4945.
182. Sugiyama T, Minoura H, Kawabe N, Tanaka M, Nakashima K (1994) Preferential expression of long form prolactin receptor mRNA in the rat brain during the oestrous cycle, pregnancy and lactation: hormones involved in its gene expression. *J Endocrinol* 141:325-333.
  183. Szawka RE, Rodovalho GV, Helena CV, Franci CR, Anselmo-Franci JA (2007) Prolactin secretory surge during estrus coincides with increased dopamine activity in the hypothalamus and preoptic area and is not altered by ovariectomy on proestrus. *Brain Res Bull* 73:127-134.
  184. Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA (2009) Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J Neuroendocrinol* 21:629-639.
  185. Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA (2010) Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 151:3247-3257.
  186. Szawka RE, Poletini MO, Leite CM, Bernuci MP, Kalil B, Mendonca LB, Carolino RO, Helena CV, Bertram R, Franci CR, Anselmo-Franci JA (2013) Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. *Endocrinology* 154:363-374.
  187. Tavakoli-Nezhad M, Arbogast LA (2010) Mu and kappa opioid receptor expression in the mediobasal hypothalamus and effectiveness of selective antagonists on prolactin release during lactation. *Neuroscience* 166:359-367.
  188. Terkel J, Blake CA, Sawyer CH (1972) Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 91:49-53.

189. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK (2009) TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41:354-358.
190. True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS (2011) Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* 23:52-64.
191. Tsien JZ (2016) Cre-Lox Neurogenetics: 20 Years of Versatile Applications in Brain Research and Counting. *Front Genet* 7:19.
192. Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509-544.
193. Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Seong JY, Vaudry H (2010) Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol* 22:716-727.
194. Urbanski HF, Kim SO, Connolly ML (1990) Influence of photoperiod and 6-methoxybenzoxazolinone on the reproductive axis of inbred LSH/Ss Lak male hamsters. *J Reprod Fertil* 90:157-163.
195. Van Vugt DA, Sylvester PW, Aylsworth CF, Meites J (1981) Comparison of acute effects of dynorphin and beta-endorphin on prolactin release in the rat. *Endocrinology* 108:2017-2018.
196. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H (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. *J Neurosci* 30:3124-3132.

197. Watson RE, Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE (1986) Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides* 7:155-159.
198. Weber E, Roth KA, Barchas JD (1982a) Immunohistochemical distribution of alpha-neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain: evidence for colocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3062-3066.
199. Weber E, Roth KA, Evans CJ, Chang JK, Barchas JD (1982b) Immunohistochemical localization of dynorphin (1-8) in hypothalamic magnocellular neurons: evidence for absence of proenkephalin. *Life Sci* 31:1761-1764.
200. Weems PW, Witty CF, Amstalden M, Coolen LM, Goodman RL, Lehman MN (2016) kappa-Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology* 157:2367-2379.
201. Weissman TA, Pan YA (2015) Brainbow: new resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics* 199:293-306.
202. Weissman TA, Sanes JR, Lichtman JW, Livet J (2011) Generating and imaging multicolor Brainbow mice. *Cold Spring Harb Protoc* 2011:763-769.
203. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE (1998) Chromosome localization and genomic structure of the KISS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 54:145-148.
204. Williams WP, 3rd, Jarjisian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ (2011) Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 152:595-606.
205. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE (2006) Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52:271-280.

206. Witten IB, Steinberg EE, Lee SY, Davidson TJ, Zalocusky KA, Brodsky M, Yizhar O, Cho SL, Gong S, Ramakrishnan C, Stuber GD, Tye KM, Janak PH, Deisseroth K (2011) Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* 72:721-733.
207. Xu Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi S, Sakai T, Inoue K, Adachi AA (2012) Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. *Endocr J* 59:161-171.
208. Yamada S, Uenoyama Y, Deura C, Minabe S, Naniwa Y, Iwata K, Kawata M, Maeda KI, Tsukamura H (2012) Oestrogen-dependent suppression of pulsatile luteinising hormone secretion and kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus during late lactation in rats. *J Neuroendocrinol* 24:1234-1242.
209. Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H (2007) Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 148:2226-2232.
210. Yang JJ, Caligioni CS, Chan YM, Seminara SB (2012) Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men. *Endocrinology* 153:1498-1508.
211. Yap CC, Wharfe MD, Mark PJ, Waddell BJ, Smith JT (2016) Diurnal regulation of hypothalamic kisspeptin is disrupted during mouse pregnancy. *J Endocrinol* 229:307-318.
212. Yen SH, Pan JT (1998) Progesterone advances the diurnal rhythm of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the prolactin surge in ovariectomized, estrogen-primed rats and in intact proestrous rats. *Endocrinology* 139:1602-1609.

213. Yeo SH, Clarkson J, Herbison AE (2014) Kisspeptin-gpr54 signaling at the GnRH neuron is necessary for negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion in female mice. *Neuroendocrinology* 100:191-197.
214. Yin P, Kawashima K, Arita J (2002) Direct actions of estradiol on the anterior pituitary gland are required for hypothalamus-dependent lactotrope proliferation and secretory surges of luteinizing hormone but not of prolactin in female rats. *Neuroendocrinology* 75:392-401.
215. Yip SH, Boehm U, Herbison AE, Campbell RE (2015) Conditional Viral Tract Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. *Endocrinology* 156:2582-2594.
216. Zamir N, Palkovits M, Brownstein MJ (1984a) Distribution of immunoreactive dynorphin A1-8 in discrete nuclei of the rat brain: comparison with dynorphin A. *Brain Res* 307:61-68.
217. Zamir N, Weber E, Palkovits M, Brownstein M (1984b) Differential processing of prodynorphin and proenkephalin in specific regions of the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6886-6889.
218. Zhang B, Hou Y, Voogt JL (2004) Effects of opioid antagonism on prolactin secretion and c-Fos/TH expression during lactation in rats. *Endocrine* 25:131-136.
219. Zhang X, van den Pol AN (2015) Dopamine/Tyrosine Hydroxylase Neurons of the Hypothalamic Arcuate Nucleus Release GABA, Communicate with Dopaminergic and Other Arcuate Neurons, and Respond to Dynorphin, Met-Enkephalin, and Oxytocin. *J Neurosci* 35:14966-14982.
220. Zhen S, Gallo RV (1992) The effect of blockade of kappa-opioid receptors in the medial basal hypothalamus and medial preoptic area on luteinizing hormone release during midpregnancy in the rat. *Endocrinology* 131:1650-1656.