

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

**PAPEL DA PROLACTINA NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
KISSPEPTINA E SECREÇÃO DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE
EM FÊMEAS**

Roberta Araújo Lopes

Belo Horizonte – MG

2012

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

**PAPEL DA PROLACTINA NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
KISSPEPTINA E SECREÇÃO DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE
EM FÊMEAS**

Roberta Araújo Lopes

Dissertação de mestrado apresentada 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 Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Raphael E. Szawka

Belo Horizonte- MG

2012

*Dedico este trabalho à minha mãe Celi,
meu pai Raimundo e minha tia Rosária,
pelo apoio e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu porto seguro, por me abençoar e sempre reservar o melhor para minha vida.

Aos meus pais e minha tia pelas orações e por nunca terem medido esforços para me proporcionar sempre o melhor, principalmente na minha educação. Vocês são meus exemplos! Amo muito vocês!

Ao Gustavo, pelo amor, paciência, compreensão, otimismo e por nunca me deixar desistir frente às dificuldades. Amo você!

Ao professor Raphael, pela orientação, paciência e dedicação durante estes 2 anos.

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

Aos membros da banca examinadora, professora Maristela Poletini e professor Fernando Reis, pela disponibilidade e sugestões para o trabalho.

Ao professor Celso Franci, pela colaboração e por ter cedido gentilmente seu laboratório.

À Marina, pela disponibilidade para dosar as minhas amostras.

À Nayara pela amizade, cumplicidade, aprendizados, você será sempre minha irmãzinha!

À Roberta Magalhães, pela amizade e grande ajuda na realização dos experimentos.

À grande família do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Izadora, Dimitri, Iuri, Paulo, Frederico, Juliana, Daniela, Daniel, Henrique, Laura, Samuel, Fernanda, Carina, Luciana, Mauro, Cristina, Fernandinha, Sophia, Paulinha, Talita, João, Quézia, Larissa, pela ótima recepção no laboratório, pela amizade, risadas e por tornarem minha rotina de trabalho mais leve e feliz!

Às amigas de república Ana Cândida, Kirla e Hévila, pelo imenso carinho.

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

Aos meus tios e primos pelo amor e carinho sempre.

Ao Sílvio, Marden, Patrícia e todos os funcionários do CEBIO/UFMG, por me ajudarem sempre e cuidarem tão bem dos animais.

Às funcionárias da secretaria de Pós- Graduação, Cyntia e Nilda, pela disponibilidade em me ajudar.

Aos animais pelo sacrifício.

Ao CNPq e FAPEMIG por financiarem este trabalho.

À Pró- Reitoria de Pós- Graduação pelos auxílios concedidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ganho de peso da ninhada em 24 horas de tratamento com bromocriptina.....	33
Figura 2: Peso da ninhada durante a primeira metade da lactação.....	34
Figura 3: Concentrações plasmáticas de PRL após administração de bromocriptina durante a lactação.....	36
Figura 4: Concentrações plasmáticas de LH após administração de bromocriptina durante a lactação.....	37
Figura 5: Imunoreatividade à kisspeptina no ARC durante a lactação.....	37
Figura 6: Efeito do bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina sobre a expressão de kisspeptina no ARC durante a lactação.....	39
Figura 7: Imunoreatividade à kisspeptina no AVPV durante a lactação.....	41

Figura 8: Porcentagem de área imunorreativa à kisspeptina (Kp-ir) no AVPV durante a lactação.....	42
Figura 9: Citologia vaginal de ratas submetidas à ovariectomia de curto prazo.....	43
Figura 10: Peso do útero de ratas OVX tratadas com PRL ou estradiol.....	44
Figura 11: Efeito da PRL sobre a secreção de LH em ratas OVX.....	45
Figura 12: Imunorreatividade à kisspeptina no ARC de ratas OVX tratadas com PRL e estradiol	47
Figura 13: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC de ratas OVX....	48
Figura 14: Imunorreatividade à kisspeptina no AVPV de ratas OVX tratadas com PRL e estradiol.....	49
Figura 15: Expressão de kisspeptina no AVPV de ratas OVX tratadas com PRL e estradiol.....	50
Figura 16: Modulação do eixo reprodutivo de ratas OVX pela PRL.....	59

RESUMO

A prolactina (PRL) exerce um efeito inibitório sobre a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG). A kisspeptina (Kp) apresenta papel crucial na regulação da fertilidade, devido a sua potente ação estimulatória sobre a secreção das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Em roedores, os neurônios kisspeptinérgicos estão localizados majoritariamente nos núcleos anteroventral periventricular (AVPV) da área preóptica (APO) e núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo. Estes neurônios apresentam alta expressão de receptores para PRL. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da PRL sobre a expressão de Kp e a secreção de LH em ratas lactantes e ratas virgens ovariectomizadas (OVX). Ratas lactantes perfundidas no oitavo dia da lactação apresentaram altos níveis plasmáticos de PRL, redução da expressão de Kp no ARC e das concentrações plasmática de LH. O bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina resultou em aumento da expressão de Kp no ARC, efeito este revertido pela coadministração de PRL ovina (PRL_o). Entretanto, a bromocriptina promoveu apenas um leve aumento nas concentrações de LH. Estes dados indicam que a PRL inibe a expressão de Kp durante a lactação, entretanto, este efeito é apenas parcialmente responsável pela inibição da secreção de LH. Ratas OVX apresentaram alta expressão de Kp no ARC. O tratamento com PRL_o nas ratas OVX, tanto por via subcutânea quanto intracerebroventricular, inibiu significativamente a expressão de Kp no ARC e a secreção plasmática de LH. Este efeito da PRL_o foi muito semelhante ao efeito clássico de retroalimentação negativa do estradiol, reforçando a relevância fisiológica deste mecanismo inibitório. Adicionalmente, a quantidade de fibras imunorreativas à Kp no AVPV foi estimulada pelo tratamento com estradiol, mas não alterada pela PRL_o. Os dados demonstram que a PRL exerce importante efeito inibitório sobre a expressão de Kp no ARC, sugerindo um novo mecanismo pelo qual a Kp é capaz de modular a secreção de LH e, conseqüentemente, a atividade do eixo reprodutivo.

ABSTRACT

Prolactin (PRL) exerts an inhibitory effect on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Kisspeptin (Kp) has a pivotal role in the regulation of fertility, due to its potent stimulatory action on the secretion of gonadotropin, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). In rodents, kisspeptin neurons are located mainly in anteroventral periventricular nucleus (AVPV) of the preoptic area (POA) and in arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus, and are known to express PRL receptors. This study aimed to evaluate the effect of PRL on the expression of kisspeptin and LH secretion in lactating and virgin ovariectomized (OVX) rats. Lactating rats perfused on the lactation day 8 displayed high plasma levels of PRL, and reduced expression of Kp in the ARC and concentration of plasma LH. Blockade of PRL release with bromocriptine resulted in increased expression of Kp in the ARC, which was reversed by co-administration of ovine PRL (oPRL). Bromocriptine caused a significant but only slight increase in LH levels. Thus, PRL decreases Kp expression in the ARC during lactation, but this effect is only partially responsible for the inhibition of LH secretion. OVX rats showed high expression of Kp in the ARC. Both subcutaneous and intracerebroventricular treatment with oPRL in OVX rats significantly decreased Kp expression in ARC and plasma LH levels. This effect of PRL was similar to the classical negative-feedback effect of estradiol, reinforcing the physiological relevance of this inhibitory mechanism. Additionally, the expression Kp-immunoreactive fibers in the AVPV was stimulated by estradiol but not altered by oPRL. Thus, PRL effectively suppresses the expression of Kp in ARC, which is associated with inhibition of LH secretion. Our findings suggest a new mechanism through which PRL is able to regulate the secretion of LH.

Sumário

1. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1. Kisspeptina: descoberta e estrutura.....	12
1.2. Kisspeptina e seu receptor.....	12
1.3. Regulação do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) pela kisspeptina.....	13
1.4. Prolactina: funções e receptor.....	15
1.5. Controle neuroendócrino da secreção de prolactina.....	17
1.6. Kisspeptina e secreção de DA e PRL.....	17
1.7. Lactação e inibição do eixo HPG.....	19
1.8. Objetivos.....	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1. Animais.....	24
2.2. Planejamento experimental.....	25
2.3. Anestésicos e drogas.....	25
2.4. Processamento do cérebro para imunohistoquímica.....	27
2.5. Imunohistoquímica para kisspeptina.....	28
2.6. Obtenção e análise das imagens.....	29
2.7. Análise Estatística.....	30
3. RESULTADOS.....	31
3.1. Experimento 1: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH em ratas lactantes.....	32
3.2. Experimento 2: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH em ratas OVX.....	42
4. DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	60

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Kisspeptina: descoberta e estrutura

Na década de 1990, foi descrita a existência de uma família de neuropeptídeos originários da expressão do gene *KiSS*, localizado no cromossomo 1 e, então, denominado *KiSS1*. Esta nomenclatura deve-se ao fato da expressão deste gene ter sido inicialmente identificada por um grupo de pesquisadores em Hershey (PA, EUA), local conhecido pelo famoso chocolate 'kisses'. A terminologia 'SS' indica sequência supressora, uma vez que sua expressão foi primeiramente observada 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, como testículos, ovários, sistema nervoso central, hipófise, fígado, pâncreas, intestino, aorta, artéria coronária e veia umbilical (Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Mead et al., 2007).

O gene *KiSS1* codifica uma proteína composta por 145 aminoácidos, que é clivada proteoliticamente para produzir um peptídeo de 54 aminoácidos, então denominado de kisspeptina-54 (West et al., 1998). A kisspeptina-54 pode ser ainda clivada em outros fragmentos menores também biologicamente ativos, kisspeptina-14, 13 e 10. Coletivamente estes peptídeos são denominados de kisspeptinas. As kisspeptinas 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-NH₂ em sua porção C-terminal, indispensáveis à sua atividade biológica (Tsutsui et al., 2010).

1.2. Kisspeptina e seu receptor

O GPR54 foi descoberto por Lee e colaboradores (1999), ao identificarem um receptor acoplado à proteína G que apresentava 49% de similaridade com receptores de

galanina, sem que, no entanto, apresentasse ligação à galanina. Posteriormente, a kisspeptina foi identificada como o ligante natural do GPR54 (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001), o qual mais recentemente passou a ser denominado de KiSS1R (Gottsch et al., 2009). No sistema nervoso central, o KiSS1R é amplamente expresso no hipotálamo, bem como em regiões corticais e subcorticais (Lee et al., 1999). 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).

As primeiras evidências relacionando kisspeptina-KiSS1R com o controle da reprodução vêm de estudos recentes de dois grupos de pesquisadores distintos, os quais relataram que mutações que causavam perda de função do KiSS1R estavam associadas à ocorrência de hipogonadismo-hipogonadotrófico em humanos, caracterizado pela deficiência na secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), retardo na maturação da função reprodutiva e infertilidade (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Efeitos correlatos de perda da função reprodutiva também foram observados em camundongos com deleção do GPR54 (Seminara et al., 2003). Desta forma, aventou-se que a sinalização kisspeptina-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).

1.3. Regulação do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) pela kisspeptina

A secreção de gonadotrofinas pela pituitária é primariamente regulada pela ação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), decapeptídeo sintetizado em neurônios hipotalâmicos e liberado junto aos capilares do sistema porta-hipofisário na eminência mediana (Herbison, 2006). Em ratos, a maior densidade de neurônios GnRH está localizada entre a banda diagonal de Broca e a porção rostral da área preóptica (APO) (Kawano & Daikoku, 1981).

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 arqueado (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. Por outro lado, o mesmo não ocorre no núcleo ARC, onde a expressão de kisspeptina não difere entre os sexos (Kauffman et al., 2007).

Sabidamente, os neurônios kisspeptinérgicos enviam projeções para os neurônios GnRH e experimentos demonstraram que a administração central ou periférica de kisspeptina exerce um potente efeito estimulatório sobre a secreção de gonadotrofinas. Doses consideravelmente baixas de kisspeptina intracerebroventricular (i.c.v.) aumentam de forma marcante a secreção de LH e FSH em roedores (Gottsch et al., 2004; Navarro et al., 2004; Navarro et al., 2005). Isto se dá aparentemente por meio da ativação dos neurônios GnRH, os quais expressam KiSS1R (Irwig et al., 2004; Han et al., 2005; Messenger et al., 2005). Observações similares foram feitas em ovelhas (Smith et al., 2009), macacos (Shahab et al., 2005) e humanos (Dhillon et al., 2005). Também foi demonstrado que a kisspeptina exerce importante papel estimulatório na gênese do pico pré-ovulatório de LH (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2008), responsável pela deflagração da ovulação nas fêmeas. Estes achados comprovam o importante papel desempenhado pela kisspeptina na regulação fisiológica do eixo HPG em mamíferos.

Os neurônios kisspeptinérgicos do ARC e AVPV expressam receptores intracelulares para estrógeno (ER). Os efeitos clássicos do estradiol resultam da ativação de duas isoformas do receptor, ER α e ER β . Sabidamente, os neurônios GnRH expressam somente o ER β (Hrabovszky et al., 2000). Entretanto, sabe-se que o mecanismo de retroalimentação positiva do estradiol, responsável pela geração do pico pré-ovulatório de

LH, depende da ativação do ER α em neurônios não-GnRH (Wintermantel et al., 2006; Glidewell-Kenney et al., 2007). Por outro lado, as duas populações de neurônios kisspeptinérgicos expressam tanto ER α quanto ER β (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Todavia, estes neurônios são regulados de maneira diferenciada pelo estradiol, pois o mesmo estimula a expressão de *KISS1* no AVPV, enquanto a inibe no ARC (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Tal fato tem embasado a hipótese que prevê a existência de duas populações funcionalmente distintas de neurônios kisspeptinérgicos. Os neurônios do AVPV estariam relacionados ao mecanismo de retroalimentação positiva, processo pelo qual os esteroides ovarianos promovem a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH. Por sua vez, os neurônios do ARC estariam relacionados ao mecanismo de retroalimentação negativa, que consiste na inibição da secreção de gonadotrofinas pelos esteroides ovarianos (Pinilla et al., 2012). De fato, como já descrito, evidências experimentais indicam uma importante participação dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV na gênese do pico pré-ovulatório de LH. Por outro lado, há carência de evidências experimentais contundentes quanto à função dos neurônios kisspeptinérgicos do ARC e, portanto, a relevância fisiológica dos mesmos ainda não está esclarecida.

1.4. Prolactina: funções e receptor

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico (197- 199 aminoácidos), secretado pelos lactotrofos adenohipofisários, sendo reconhecida inicialmente pelo seu papel na estimulação do desenvolvimento da glândula mamária e indução da lactação em coelhos (Riddle et al., 1933). Além da adenohipófise, a expressão do gene para PRL foi também identificada em várias regiões do organismo como sistema nervoso central, células do sistema imunológico, células do epitélio mamário, entre outros (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001)

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). Além dessas funções, a PRL possui inúmeras outras que incluem participação na osmorregulação, comportamento, metabolismo e controle do sistema imunológico (Bole-Feysot et al., 1998; Bouilly et al., 2011).

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). Os receptores para PRL (PRL-R) são membros da classe de uma superfamília de receptores de citocinas e possuem diferentes isoformas, de acordo com *splicing* alternativo do gene (Bole-Feysot et al., 1998). Tanto a isoforma curta como a longa possuem porções extracelulares idênticas e são expressas no plexo coroide e no hipotálamo (Pi & Grattan, 1998b, a), mas se diferem pela habilidade de ativar vias celulares (Grattan, 2002). A maioria das ações biológicas exercidas pela PRL é mediante ativação da forma longa do PRL-R. Esta isoforma é acoplada a uma proteína *Janus kinase* (JAK) e o PRL-R quando ativado, promove a fosforilação de fatores de transcrição da via *STAT*, especificamente o *STAT5b*, o qual é aceito como marcador da via de sinalização celular do PRL-R (Ma et al., 2005; Anderson et al., 2006; Anderson et al., 2008). Os níveis do RNAm para a forma longa do PRL-R aumentam durante as fases de proestro e estro em ratas ciclando, concomitantemente ao aumento da secreção de PRL, ao passo que a expressão da isoforma curta permanece inalterada. Por sua vez, a

ovariectomia reduz, enquanto o tratamento com estradiol aumenta a expressão de ambas as isoformas de PRL-R (Sugiyama et al., 1994).

Camundongos fêmeas que não expressam PRL-R apresentam redução da taxa ovulatória, e falha no desenvolvimento e implantação do embrião (Bole-Feysot et al., 1998). Por outro lado, a secreção cronicamente aumentada de PRL, i.e., hiperprolactinemia, é uma causa bastante conhecida de infertilidade em mamíferos, principalmente devido à inibição da secreção pulsátil de LH (Cohen-Becker et al., 1986; Fox et al., 1987; Matsuzaki et al., 1994). Desta forma, a hiperprolactinemia em mulheres está associada com ocorrência de hipofunção gonadal, amenorreia e diminuição da fertilidade, sendo que o tratamento com agonistas dopaminérgicos é capaz de reduzir a secreção de PRL e restaurar a fertilidade (Ono et al., 2010; Molitch, 2011).

1.5. Controle neuroendócrino da secreção de prolactina

A secreção de PRL é tonicamente inibida pela dopamina (DA) liberada por neurônios hipotalâmicos, reconhecidamente o mais importante hormônio regulador da secreção de PRL (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). A DA está presente em altas concentrações tanto na eminência mediana (EM) (Fuxe, 1965), quanto no plasma do sistema porta-hipofisário (Ben-Jonathan et al., 1977; Gibbs & Neill, 1978). A DA 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 DA à adenohipófise. Os neurônios do sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA), estão localizados na porção dorsomedial do ARC e projetam-se para a zona externa da eminência mediana (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 são os principais fornecedores de DA à adenohipófise e expressam a forma longa do PRL-R. Com efeito, a PRL se liga a estes receptores, o que ativa a cascata de sinalização JAK-STAT e aumenta a expressão do STAT5b, resultando na liberação de DA (Brown et al., 2010). Dessa forma, a PRL é capaz de regular sua própria secreção por um mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta, que aumenta a atividade dos neurônios TIDA (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

1.6. Kisspeptina e secreção de DA e PRL

Foi recentemente demonstrado que os neurônios kisspeptinérgicos do ARC em roedores e ovelhas coexpressam neurocinina B e dinorfina (Goodman et al., 2007; Navarro et al., 2009) os quais passaram a ser denominados de neurônios kisspeptina-neurocinina-dinorfina (KNDy). Estes três neuropeptídeos possuem importante função na regulação da secreção pulsátil de GnRH, desempenhando função chave no controle da reprodução (Lehman et al., 2010; Navarro, 2012). Ainda, é sabido que terminais dinorfinérgicos contraem sinapse com neurônios TIDA (Fitzsimmons et al., 1992), sendo esta via funcionalmente relevante para o controle da secreção de PRL (Arbogast & Voogt, 1998; Andrews & Grattan, 2003). Evidências sugerem que a população de neurônios kisspeptinérgicos do ARC deva também participar do controle da secreção de PRL, pois 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, estudo recente de nosso grupo demonstrou que a injeção i.c.v. de kisspeptina-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

kisspeptinérgicos (Szawka et al., 2010). Recentemente, a conexão sináptica entre terminais kisspeptinérgicos e neurônios TIDA foi, de fato, confirmada através de microscopia eletrônica (Sawai et al., 2012). Desta forma, os neurônios kisspeptinérgicos do ARC parecem exercer um papel importante na regulação da secreção de PRL com possíveis implicações nas funções reprodutivas.

1.7. Lactação e inibição do eixo HPG

A lactação é um estado fisiológico caracterizado por diversas alterações hormonais, metabólicas e comportamentais. Dentre estas alterações, destaca-se o aumento da secreção de PRL, balanço energético negativo, hiperfagia, menor responsividade ao estresse, e desenvolvimento de comportamento materno, dentre outras. Alterações estas que permitem adaptação a esta condição de alta demanda energética (Bridges & Ronsheim, 1990; Woodside, 2007; Melo et al., 2009). O balanço energético negativo observado durante a lactação é refletido pela diminuição dos níveis sistêmicos de insulina e leptina, e alteração da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos responsáveis pelo controle da ingestão alimentar (Xu et al., 2009; Smith et al., 2010).

A secreção de PRL aumenta marcadamente durante a gestação e lactação, devido principalmente ao estímulo de sucção do mamilo associado à redução da inibição dopaminérgica (Arbogast & Voogt, 1996). Entre os dias 7 e 14 da gestação, há um aumento na expressão das isoformas longa e curta do PRL-R no sistema nervoso central. Isso proporciona maior transporte de PRL para o sistema nervoso central, o que promove alterações neuroendócrinas e neurobiológicas no cérebro materno (Grattan, 2002).

Na maioria dos mamíferos, inclusive em humanos, ocorre redução da fertilidade durante a lactação, o que está, pelo menos em parte, relacionado à alta demanda energética necessária para a produção de leite (Tsukamura & Maeda, 2001). Acredita-se que esta baixa fertilidade deva-se à inibição da secreção pulsátil de LH e,

consequentemente, redução da função ovariana e ausência de ovulação (Lu et al., 1976; Smith & Neill, 1977; Smith, 1978; Taya & Greenwald, 1982). Aparentemente, durante a primeira metade da lactação, a inibição da pulsatilidade do LH é dependente de fatores não metabólicos como o estímulo neurogênico produzido pela sucção do mamilo. Em contrapartida, a inibição da fertilidade durante a segunda metade parece depender de fatores metabólicos, relacionados à síntese de leite (Tsukamura & Maeda, 2001). Entretanto, os mecanismos determinantes de tais efeitos são ainda pouco conhecidos.

As vias neuronais hipotalâmicas ativadas pelo estímulo de sucção durante a primeira metade da lactação ainda são pouco conhecidas. Peptídeos opioides endógenos como a β -endorfina, encefalina e dinorfina são responsáveis pela elevação da secreção de PRL induzida pela sucção durante a lactação, através da inibição dopaminérgica (Callahan et al., 1996; Callahan et al., 2000). Além disso, vários neuropeptídeos também são apontados como possíveis responsáveis pela inibição do eixo HPG durante a lactação. A expressão do neuropeptídeo Y (NPY) encontra-se aumentada no ARC durante este período e pode estar envolvida no controle da secreção de GnRH, através da modulação da atividade dos neurônios TIDA (Li et al., 1999). Tem sido demonstrado também que terminações dos neurônios produtores de ácido gama-aminobutírico (GABA) no hipotálamo estão envolvidas no controle da secreção de LH e PRL. Durante a lactação, a atividade dos neurônios GABAérgicos encontra-se aumentada no hipotálamo e córtex cerebral, sugerindo que este aminoácido seja responsável pela inibição da fertilidade neste período (Kornblatt & Grattan, 2001). A ocitocina é um hormônio hipotalâmico responsável pela ejeção de leite e controle fisiológico da secreção de PRL durante a lactação (Samson & Schell, 1995; Buhimschi, 2004) e pode estar associada à PRL no controle da fertilidade.

Recentemente, estudos de diferentes grupos têm demonstrado que há inibição da expressão de kisspeptina no ARC, mas não no AVPV, durante a lactação, sugerindo um provável mecanismo responsável pela supressão do LH (Yamada et al., 2007; True et al.,

2011). Ademais, sabe-se que a inibição da expressão de kisspeptina durante a lactação não se deve aos baixos níveis circulantes de insulina ou leptina (Xu et al., 2009), estando o mecanismo responsável pela supressão da kisspeptina ainda por ser revelado.

Apesar da PRL ser um hormônio polipeptídico de elevado peso molecular, ela pode ser encontrada no sistema nervoso central. A PRL atravessa a barreira hematoencefálica provavelmente pela ligação aos PRL-R no plexo coroide ou através de fenestrações dos capilares nas regiões desprovidas de barreira, como por exemplo a eminência mediana (Sjoeholm et al., 2011). Ademais, há evidências que sugerem também a existência de PRL sintetizada por neurônios no sistema nervoso central (Dutt et al., 1994).

Sabe-se que a PRL em altos níveis é capaz de inibir a secreção de LH (Cohen-Becker et al., 1986; Matsuzaki et al., 1994; Grattan, 2002), por meio de um mecanismo que envolve a inibição da atividade dos neurônios GnRH (Grattan et al., 2007). Em mulheres, há evidências de que a PRL possa estar envolvida na inibição da secreção de LH durante a lactação, no entanto, existem muitos dados controversos na literatura, de forma que o papel da PRL neste fenômeno não está esclarecido (McNeilly, 2001). Em roedores, as evidências sugerem uma ação inibitória da PRL sobre a liberação de LH em lactantes, entretanto, os resultados divergem quanto ao momento em que ocorreria o efeito, i.e., se durante todo o período de lactação ou apenas na segunda metade (Smith, 1978; Tsukamura & Maeda, 2001). Com efeito, foi descrito recentemente que os neurônios kisspeptinérgicos do ARC e AVPV expressam PRL-R, sugerindo um papel da PRL no controle da expressão deste neuropeptídeo (Kokay et al., 2011).

Desta forma, aventamos a hipótese de que os altos níveis de PRL durante a lactação exercem uma ação inibitória sobre a expressão de kisspeptina. Do mesmo modo, investigamos se a administração de PRL a ratas virgens ovariectomizadas (OVX) promoveria um efeito semelhante sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH.

Assim, buscamos descrever um possível mecanismo responsável pelo efeito inibitório da PRL sobre a secreção de LH.

1.8 Objetivos

Considerando-se que a PRL exerce um efeito inibitório sobre a secreção de LH, e que os neurônios kisspeptinérgicos são importantes reguladores deste hormônio e possuem PRL-R, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC e AVPV, e sobre a secreção de LH, em ratas lactantes e ratas OVX.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Ratas Wistar virgens com peso corporal de 250–300 g foram obtidas do CEBIO-ICB. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de quatro por caixa (39 x 32 x 17 cm), em um ambiente de temperatura (22 ± 2 °C) e luz (14 h claro/10 h escuro; luzes acesas às 05:00 h) controladas, com água e ração *ad libitum*. Para obtenção das ratas prenhes, 4 fêmeas foram colocadas para acasalar com machos experientes. Após o dia da cópula, determinado pela presença de espermatozoides na citologia vaginal, as ratas gestantes foram mantidas em caixas individuais (30 x 20 x 19 cm). O dia de parturição foi considerado o dia 0 da lactação. Os filhotes das ninhadas foram ajustados para 8 (4 machos, 4 fêmeas) ou totalmente removidos. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação. Durante o período de tratamento, a ninhada foi pesada diariamente para verificar se os filhotes estavam se alimentando e, portanto, realizando sucção do mamilo, sendo este estímulo essencial para liberação de PRL durante a primeira metade da lactação. A cada 12 horas, foram feitas trocas entre os filhotes das ratas lactantes tratadas com veículo e os filhotes das ratas lactantes tratadas bromocriptina, garantindo-se assim um mesmo nível de sucção do mamilo e alimentação adequada entre todos os grupos experimentais. No dia 3 da lactação, as ratas lactantes foram ovariectomizadas com o objetivo de se evitar a influência dos efeitos da PRL sobre a secreção de progesterona (Tomogane et al., 1975). Vale ressaltar que a ovariectomia não exerce efeito relevante sobre a expressão de kisspeptina ou secreção de LH nos períodos da lactação a serem estudados (Yamada et al., 2007). Os procedimentos experimentais utilizados foram submetidos para aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 257/2010)

2.2. Planejamento experimental

Experimento 1: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH em ratas lactantes

Este experimento teve por objetivo avaliar o efeito do bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina, agonista de receptor D2 dopaminérgico (Seeman & Van Tol, 1993), e do tratamento de reposição com PRL ovina (PRL_o), sobre a expressão de kisspeptina no ARC e AVPV e secreção de LH durante a lactação. Para estabelecer o melhor modelo de utilização de bromocriptina em ratas lactantes, a fim de promover o bloqueio eficaz da secreção de PRL, foi desenvolvido um projeto piloto em que ratas lactantes tiveram seus filhotes ajustados para 8 (4 machos e 4 fêmeas) no dia 2 e foram ovariectomizadas no dia 3 da lactação. No dia 4 da lactação, as ratas receberam duas injeções diárias de veículo (Vei; n = 5), ou bromocriptina nas doses de 0,3 mg/0,2/injeção (0,3 B; n = 3) ou 0,5 mg/0,2 mL/injeção (0,5 B; n = 5). A ninhada foi pesada antes e 24 horas após o início do tratamento, na manhã do dia 5 de lactação quando os filhotes foram eutanasiados por decapitação e foi verificada a presença de leite na cavidade abdominal.

Após estabelecer a dose de bromocriptina a ser administrada, ratas lactantes tiveram seus filhotes ajustados para 8 (Lac) ou removidos (N-Lac) no dia 2, e foram ovariectomizadas no dia 3 da lactação. Os tratamentos com drogas foram realizados 2 vezes ao dia entre os dias 5–7 (8:00 h e 18:00 h), e às 8:00 h no dia 8 da lactação. Ratas Lac receberam injeções de bromocriptina s.c. (Lac+B; n = 7), bromocriptina e PRL_o (Lac+B+P; n = 8), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; n = 7). Ratas N-Lac receberam injeções de veículo (N-Lac; n = 7) ou bromocriptina (N-Lac+ B; n = 6). As ninhadas foram pesadas diariamente a partir do início dos tratamentos. As ratas foram perfundidas entre 10:00–12:00 h do dia 8 da lactação. Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca no momento da perfusão para dosagem das concentrações plasmáticas de PRL e LH por radioimunoensaio. Os cérebros foram

processados para marcação imunohistoquímica de kisspeptina no ARC e AVPV. O número de neurônios imunorreativos à kisspeptina (kisspeptina-ir) e a porcentagem de área marcada para kisspeptina foram quantificados bilateralmente.

Experimento 2: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH em ratas OVX

Este experimento teve por objetivo avaliar o efeito da administração de PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC e AVPV e secreção de LH em ratas OVX não lactantes (nulíparas). Adotou-se um protocolo de ovariectomia de curto prazo, i.e., experimentos realizados 3 dias após a cirurgia, a fim de se reduzir o efeito inibitório da ovariectomia sobre a expressão de PRL-R no sistema nervoso central (Sugiyama et al., 1994). Entre 7–10 dias antes do experimento, ratas virgens apresentando ciclo estral regular tiveram uma cânula guia implantada no ventrículo lateral direito. Após o período de recuperação, as ratas foram anestesiadas com tribromoetanol e ovariectomizadas. A partir do dia seguinte, os tratamentos com as drogas foram realizados 2 vezes ao dia durante 2 dias (8:00 h e 18:00 h), e às 8:00 h do terceiro dia. Ratas OVX receberam tratamento com PRL s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRL i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 5), estradiol s.c. (OVX+E2; n = 5) ou dos respectivos veículos (OVX; n = 7). As ratas foram perfundidas entre 10:00–12:00 h do 3º dia de tratamento. As concentrações plasmáticas de LH foram determinadas em amostras de sangue colhidas no momento da perfusão. Os cérebros foram processados para marcação imunohistoquímica de kisspeptina no ARC e AVPV. O número de neurônios kisspeptina-ir e a porcentagem de área marcada para kisspeptina foram quantificados bilateralmente.

2.3 Anestésicos e drogas

A cirurgia de estereotaxia e o procedimento de perfusão foram realizados sob anestesia com solução de ketamina (Cloridrato de cetamina; 80 mg/Kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). A cirurgia de ovariectomia foi realizada sob anestesia com solução de ketamina (Cloridrato de cetamina; 80 mg/Kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.) no experimento 1, e com tribromoetanol (2,2,2 tribromoetanol 99%, Aldrich 250 mg/Kg) no experimento 2. Após as cirurgias, os animais receberam tratamento profilático com pentabiótico (24000 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixinina meglumina; 2,5 mg/Kg, s.c.). A bromocriptina (mesilato de bromocriptina; Novartis, Brasil) foi utilizada na dose de 0,5 mg/0,2 mL/rata, s.c., por injeção (Li et al., 1999; Chen & Smith, 2004), diluída em salina (NaCl) contendo 10% de etanol. A PRL α (Sigma, EUA) foi utilizada na doses de 0,5 mg/0,2 mL/rata, s.c., por injeção (Bridges & Ronsheim, 1990) ou 4 μ g/4 μ L/rata, i.c.v., por injeção (Anderson et al., 2006; Sapsford et al., 2012) diluída em tampão fosfato salina (PBS; NaCl 145 mM, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Para o tratamento com estradiol foi utilizado cipionato de estradiol (Pfizer Laboratórios; 10 μ g/0,2 mL/rata, s.c.) diluído em óleo de milho, conforme previamente descrito (Szawka et al., 2009).

2.4. 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, polyvinilpirrolidona (PVP) em etilenoglicol e PBS (PBS; NaCl 145 mM, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4), à 4°C, onde permaneceram até atingir a saturação (Watson et al., 1986). o tempo de saturação é de aproximadamente 48 horas, 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% (C₅H₁₂) a uma temperatura entre -40 e -50°C durante o tempo de 1

min. Depois de congelados, os cérebros foram armazenados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Quatro séries de secções coronais de $30\text{ }\mu\text{m}$ da extensão rostrocaudal da APO e ARC foram obtidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007). As secções foram armazenadas em solução crioprotetora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Watson et al., 1986) até a realização da imunohistoquímica para kisspeptina.

2.5. Imunohistoquímica para kisspeptina

A imunohistoquímica para kisspeptina foi realizada pelo método de *free-floating* como previamente descrito (Szawka et al., 2010). 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 min. O TX-100 atua permeabilizando a membrana celular, o que possibilita a posterior difusão dos anticorpos. Foi realizada a incubação das secções com H_2O_2 1%, a fim de bloquear peroxidases endógenas do tecido, por um período de 30 minutos. As secções foram incubadas por 1 h com albumina bovina (BSA 3%), para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário, utilizados posteriormente. As secções foram então incubadas com anticorpo anti-kisspeptina-10 produzido em coelho (doação A.C. Caraty, Université de Tours, Nouzilly, França) a 1:30.000 por 40 h, com anti-IgG de coelho biotilado produzido em cabra (ABC Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) a 1:600 por 2 h, com o complexo avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories) a 1:400 por 1 h. 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 H₂O₂ (1 µL/mL de solução de H₂O₂ 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 da especificidade do anticorpo primário, a pré-adsorção do anticorpo com 1 µg/mL e kisspetina-10 *overnight* resultou na ausência de imunorreatividade à kisspetina (Figura 5F). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico utilizando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007).

2.6. Obtenção e análise das imagens

Foram utilizadas para análise 4 secções coronais referentes às porções medial e posterior do núcleo ARC, correspondentes a distância de -2,40 à -3,96 mm do bregma. Foram avaliadas 3 secções coronais entre +0,12 e -0,24 mm do bregma para análise do núcleo AVPV (Paxinos & Watson, 2007). Fotomicrografias bilaterais do ARC e AVPV foram obtidas utilizando-se a objetiva de 20x no microscópio óptico. Os neurônios imunorreativos à kisspetina no ARC foram identificados por possuírem o núcleo corado em preto e, posteriormente, quantificados bilateralmente em cada secção, sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais. A porcentagem de área marcada para kisspetina no ARC e AVPV foi quantificada utilizando-se o software *Image J* (National Institutes of Health, EUA). Para tanto, as fotomicrografias foram convertidas em imagens preto e branco de 1 bit, utilizando-se o mesmo valor de limiar (threshold = 205) para todas as secções analisadas. Os valores referentes aos pixels das áreas marcadas de cada animal foram expressos em porcentagem em relação à área total analisada, e representam a área imunorreativa à kisspetina. No ARC a área marcada foi constituída por corpos celulares e fibras, enquanto no AVPV, praticamente, apenas por fibras de neurônios kisspeptinérgicos.

2.7. Radioimunoensaio

Os níveis plasmáticos de PRL e LH foram determinados por radiomuniensaio de duplo anticorpo como previamente descrito (Szawka et al., 2007; Szawka et al., 2010). Os anticorpos foram fornecidos pelo Programa Nacional de Peptídeos e Hormônios (Harbor- UCLA). O anticorpo para prolactina foi PRL-S9 e o padrão de referência PRL-RP3, respectivamente, e o anticorpo para LH foi LH-S10 e LH-RP3. O limite mínimo de detecção foi de 0,7 ng/mL e 0,16 ng/mL para PRL e LH, respectivamente. Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas no mesmo ensaio para se evitar variações inter-ensaio. O erro intra-ensaio foi de 3,9 e 4% para PRL e LH, respectivamente.

2.8. Análise Estatística

Os dados são apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. O ganho de peso das ninhadas no experimento 1 foi analisado por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH em ratas lactantes

Padronização da dose de bromocriptina

Na figura 1 é apresentado o ganho de peso no período de 24 horas das ninhadas de ratas tratadas com duas doses de bromocriptina, a fim de se averiguar qual a mais eficiente no bloqueio da secreção de PRL. As ninhadas das ratas tratadas com a dose de 0,3 mg não apresentaram redução significativa de peso em relação às ninhadas das ratas tratadas somente com veículo. Entretanto, as ninhadas das ratas tratadas com bromocriptina na dose de 0,5 mg apresentaram uma redução média no peso, em 24 horas, de 66% em relação ao controle ($P < 0,01$) e de 60% em relação ao grupo tratado com bromocriptina na dose de 0,3 mg ($P < 0,05$). Após 24 horas de tratamento, também foi observado que os filhotes das ratas tratadas com a dose de 0,5 mg não possuíam leite na sua cavidade abdominal, quando comparados às ninhadas das ratas controles ou tratadas com 0,3 mg. Assim, a dose 0,5 mg bloqueou eficientemente a síntese de leite, o que provavelmente deve-se a inibição da secreção de PRL. Portanto, esta foi a dose de bromocriptina selecionada para ser utilizada no experimento 1.

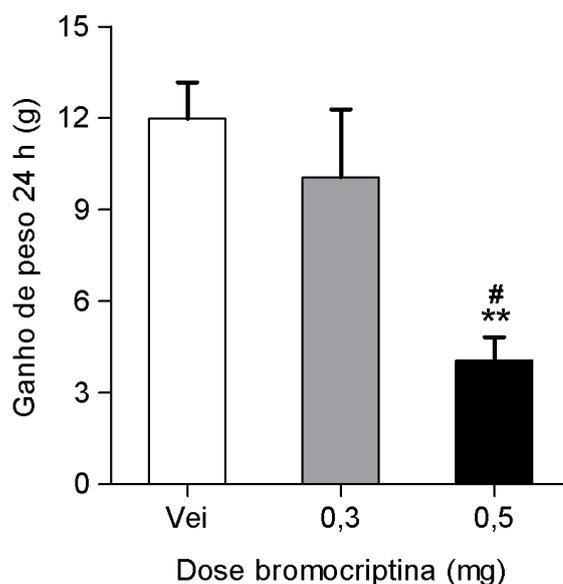


Figura 1: Ganho de peso da ninhada em 24 horas de tratamento com bromocriptina. Ratas no dia 4 da lactação foram tratadas com 2 injeções diárias de veículo (Veil; $n = 5$), ou bromocriptina nas doses de 0,3 mg ($n = 3$) ou 0,5 mg ($n = 5$). A ninhada (8 filhotes) foi pesada antes e 24 h após o início do tratamento. Resultados expressos em média \pm EPM. # $P < 0,05$ comparado à dose de 0,3 mg B; ** $P < 0,01$ comparado ao Veil. Diferenças determinadas por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Ganho de peso das ninhadas durante a primeira metade da lactação

A figura 2A apresenta o perfil da variação de peso das ninhadas das ratas lactantes tratadas com bromocriptina, bromocriptina e PRL α ou com os veículos das drogas. No dia 5 da lactação, foram iniciados os tratamentos e as ninhadas dos grupos Lac e Lac+B apresentaram aumento significativo de peso em relação ao dia 4 da lactação ($P < 0,05$). Entre os dias 6–8 da lactação, as ninhadas dos grupos Lac, Lac+B e Lac+B+P aumentaram progressivamente seus pesos em relação ao dia 4 ($P < 0,001$), e não houve diferença de peso entre as ninhadas dos diferentes grupos.

Os pesos das ninhadas avaliados na manhã do dia 8 da lactação são apresentados na figura 2B. O gráfico demonstra que não houve diferença significativa entre os pesos dos filhotes dos grupos Lac, Lac+B e Lac+B+P ($P = 0,15$).

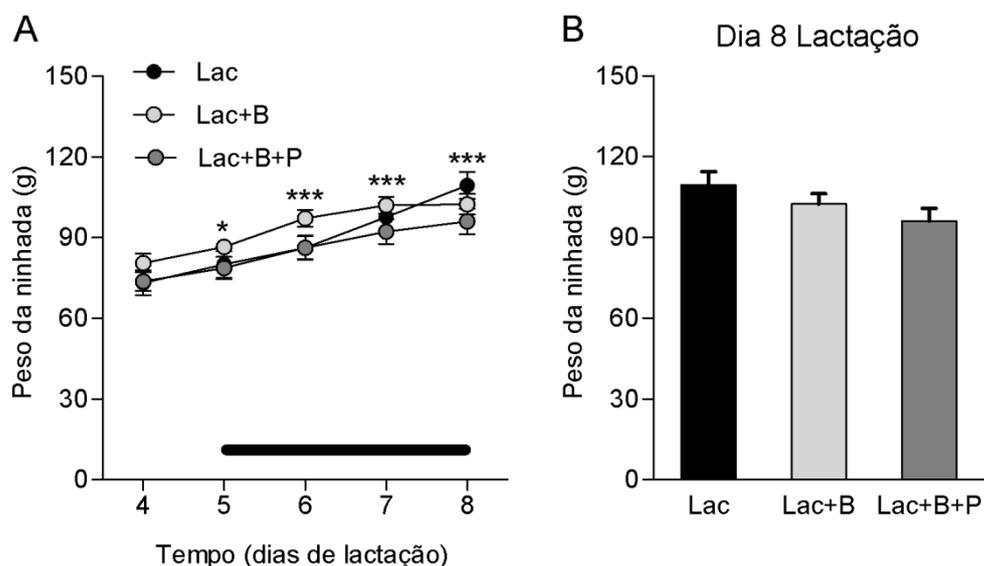


Figura 2: Peso da ninhada durante a primeira metade da lactação. As ratas foram tratadas por via s.c. com 2 injeções diárias de veículo (Lac; $n = 7$), bromocriptina na dose de 0,5 mg/0,2 mL/injeção (Lac+B; $n = 7$) ou bromocriptina e PRL na dose de 0,5 mg B e 0,5 mg PRL/0,2 mL/injeção (Lac+B+P; $n = 8$). A cada 12 horas, foram feitas trocas entre os filhotes das ratas Lac e os filhotes das ratas Lac+B. As ninhadas (8 filhotes) foram pesada diariamente. Resultados expressos em média \pm EPM. (A) Variação do peso das ninhadas entre os dias 4 e 8 da lactação. $*P < 0,05$ em relação ao dia 4 para os grupos Lac e Lac+B; $***P < 0,001$ em relação ao dia 4 para todos os grupos experimentais, determinado por ANOVA de duas vias, seguida do pós- teste de Bonferroni. (B) Peso das ninhadas no dia 8 da lactação. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P = 0,15$), determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Efeito da bromocriptina sobre as concentrações plasmáticas de PRL durante a lactação

As concentrações plasmáticas de PRL são apresentadas na figura 3. Como esperado, os níveis plasmáticos de PRL nas ratas Lac ($439,9 \pm 89,4$ ng/mL) foram

significativamente maiores do que nas ratas N-Lac ($68,05 \pm 23,53$ ng/mL) ($P < 0,001$). O tratamento com bromocriptina nas ratas Lac+B ($7,63 \pm 0,89$ ng/mL) e ratas Lac+B+P ($8,53 \pm 1,52$ ng/mL), por sua vez, promoveu uma redução sinigificativa da PRL plasmática em comparação aos grupos Lac e N-Lac ($P < 0,001$). A partir da análise dos níveis de PRL, podemos observar que o tratamento diário de ratas lactantes com bromocriptina promoveu o bloqueio da secreção de PRL. Embora a PRL_o não tenha sido detectada pelo radioimunoensaio para PRL de rato, podemos afirmar que a dose de 0,5 mg de PRL_o foi eficaz em reverter o efeito da bromocriptina sobre a secreção endógena de PRL, levando-se em consideração que o ganho de peso dos filhotes das ratas Lac+B+P não diferiu dos demais grupos experimentais (Figura 2). Ademais, embora não tenha sido avaliado de forma sistemática, não foi observada nenhuma alteração no comportamento das ratas lactantes tratadas com bromocriptina, uma vez que as ratas lactantes de todos os grupos apresentaram padrão de comportamento maternal semelhante.

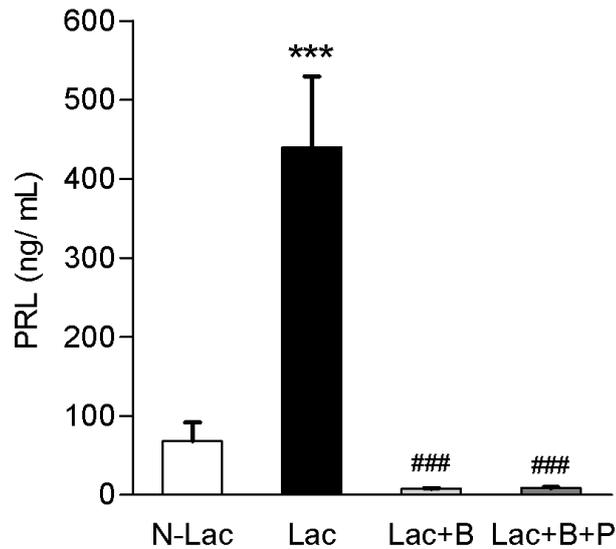


Figura 3: Concentrações plasmáticas de PRL após administração de bromocriptina durante a lactação. Ratas lactantes receberam injeções s.c. de bromocriptina (Lac+B; n = 7), bromocriptina e PRL_o (Lac+B+P; n = 8), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; n = 7). Ratas não lactantes receberam injeções de veículo (N-Lac; n = 7). Os tratamentos foram realizados 2 vezes ao dia entre os dias 5–7 (8:00 h e 18:00 h), e às 8:00 h no dia 8 da lactação. As ratas foram perfundidas entre 10:00–12:00 h do dia 8 da lactação. Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca no momento da perfusão para dosagem das concentrações plasmáticas de PRL. Resultados expressos em média \pm EPM. *** $P < 0,001$ em relação aos demais grupos experimentais; ### $P < 0,001$ em relação ao grupo N-Lac, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Efeito do bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina sobre as concentrações plasmáticas de LH durante a lactação

A figura 4 apresenta as concentrações plasmáticas de LH no dia 8 da lactação. As ratas Lac ($0,63 \pm 0,12$ ng/mL) apresentaram níveis significativamente menores de LH plasmático em relação às ratas N-Lac ($2,22 \pm 0,15$ ng/mL) ($P < 0,001$). O tratamento com bromocriptina nas ratas Lac+B ($0,87 \pm 0,09$ ng/mL) ocasionou um leve aumento das concentrações de LH em comparação com as ratas Lac e Lac+B+P ($0,54 \pm 0,06$ ng/mL) ($P < 0,05$), entretanto, os níveis de LH ainda permaneceram inferiores

aos observados nas ratas N-Lac ($P < 0,001$). Desta forma, nota-se que o bloqueio da secreção de PRL não foi capaz de reverter totalmente a inibição da secreção de LH que ocorre durante a lactação.

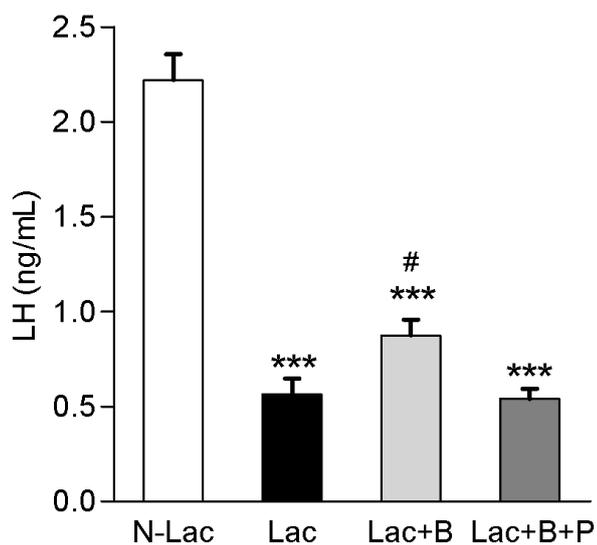


Figura 4: Concentrações plasmáticas de LH após administração de bromocriptina durante a lactação. Ratas lactantes receberam injeções s.c. de bromocriptina (Lac+B; $n = 7$), bromocriptina e PRL_o (Lac+B+P; $n = 8$), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; $n = 7$). Ratas não lactantes receberam injeções de veículo (N-Lac; $n = 7$). Os tratamentos foram realizados 2 vezes ao dia entre os dias 5–7 (8:00 h e 18:00 h), e às 8:00 h no dia 8 da lactação. As ratas foram perfundidas entre 10:00–12:00 h do dia 8 da lactação. Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca no momento da perfusão para dosagem das concentrações plasmáticas de LH. Resultados expressos em média \pm EPM. *** $P < 0,001$ em

relação aos grupos N-Lac; # $P < 0,05$ em relação aos grupos Lac e Lac+B+P, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Efeito do bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina sobre a expressão de kisspeptina no ARC durante a lactação

Variações na imunorreatividade à kisspeptina no núcleo ARC dos grupos N-Lac (A), Lac (B), Lac+B (C) e Lac+B+P (D) são representadas nas fotomicrografias de seções coronais apresentadas na figura 5. As setas indicam exemplos de neurônios kisspeptina-ir. Neurônios marcados para kisspeptina foram identificados por possuírem o núcleo corado em preto. A contagem dos neurônios kisspeptina-ir/secção no ARC é apresentada na figura 6 A. As ratas Lac ($6,89 \pm 0,85$) apresentaram redução de aproximadamente 57% no número de neurônios kisspeptina-ir em relação às ratas N-Lac ($16,13 \pm 1,04$) ($P < 0,01$). O tratamento de ratas lactantes com bromocriptina ($12,52 \pm 2,85$) resultou em um aumento significativo no número de neurônios kisspeptina-ir de aproximadamente 78% em relação às ratas Lac e Lac+B+P ($6,18 \pm 1,06$) ($P < 0,05$), as quais não diferiram entre si. Não houve diferença significativa no número de neurônios kisspeptina-ir entre os grupos N-Lac e Lac+B. A quantificação da área marcada para kisspeptina (%) no ARC é apresentada na figura 6 B. As ratas Lac ($3,40 \pm 0,68$) e Lac+B+P ($4,40 \pm 1,05$) apresentaram redução de aproximadamente 68% e 60%, respectivamente, na porcentagem de área kisspeptina-ir quando comparadas às ratas N-Lac ($10,8 \pm 0,97$) ($P < 0,05$). As ratas do grupo Lac+B ($7,0 \pm 2,02$), por sua vez, apresentaram níveis intermediários de área kisspeptina-ir, de aproximadamente 65%, os quais não foram estatisticamente diferentes em comparação aos grupos N-Lac, Lac e Lac+B+P.

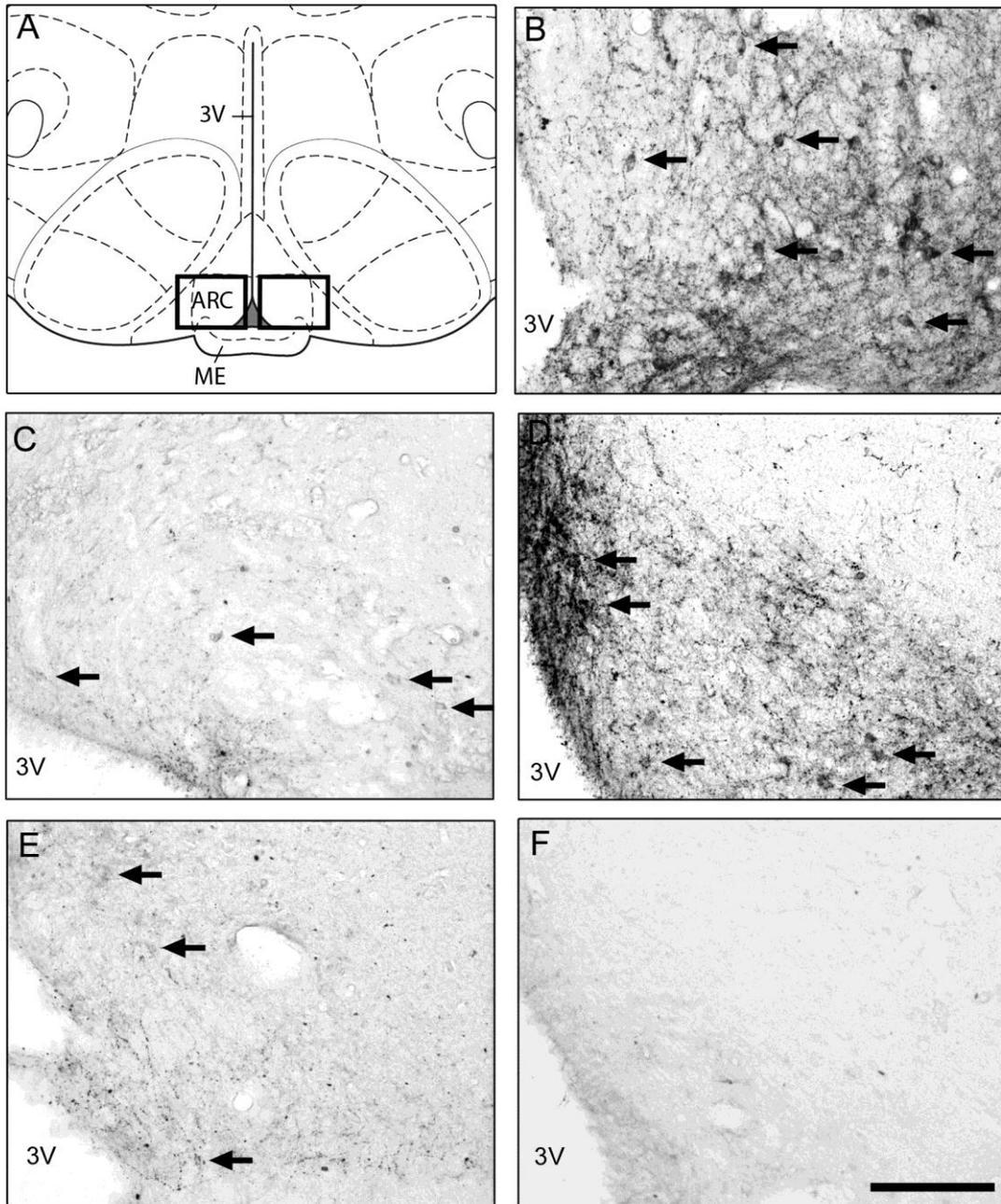


Figura 5: Imunorreatividade à kisspeptina no ARC durante a lactação. Ratas lactantes receberam injeções s.c. de bromocriptina (Lac+B; n = 7), bromocriptina e PRL_o (Lac+B+P; n = 8), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; n = 7). Ratas não lactantes receberam injeções de veículo (N-Lac; n = 7). Os tratamentos foram realizados 2 vezes ao dia entre os dias 5–7 (8:00 h e 18:00 h), e às 8:00 h no dia 8 da lactação. As ratas foram perfundidas no dia 8 da lactação e os cérebros processados para imunohistoquímica. (A) Diagrama esquemático representado regiões analisadas no núcleo ARC (caixas pretas). (B-E) Fotomicrografias representativas de ratas N-Lac (B), Lac (C), Lac+B (D) e Lac+B+P (E). (F) Imunorreatividade

após pré-adsorção do anticorpo primário com kisspeptina-10. 3V: terceiro ventrículo. EM: eminência mediana. Escala = 100 μ m.

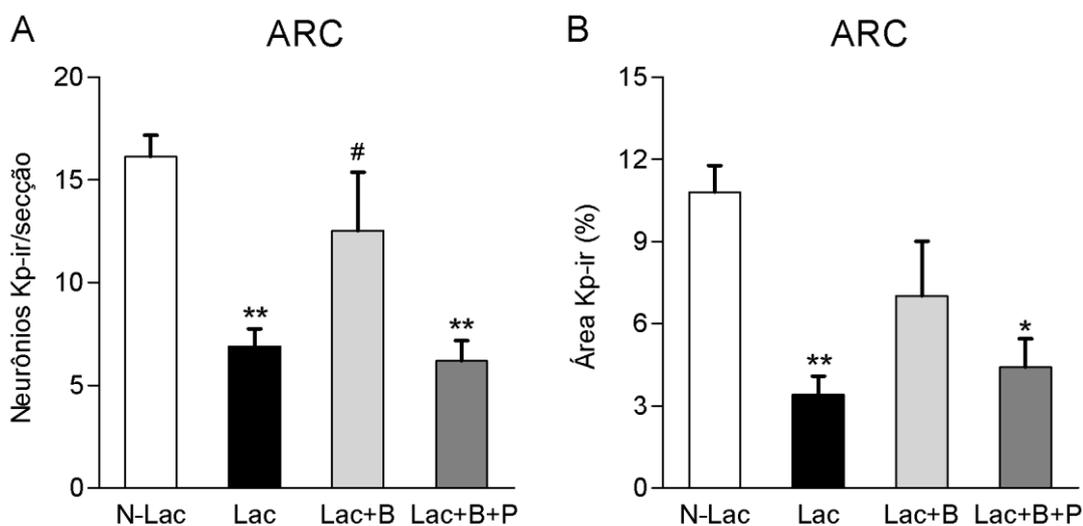


Figura 6: Efeito do bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina sobre a expressão de kisspeptina no ARC durante a lactação. Ratas lactantes receberam injeções s.c. de bromocriptina (Lac+B; n = 7), bromocriptina e PRL (Lac+B+P; n = 8), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; n = 7). Ratas não lactantes receberam injeções de veículo (N-Lac; n = 7). As ratas foram perfundidas no dia 8 da lactação e os cérebros processados para imunohistoquímica. (A) Número de neurônios kisspeptina-ir (Kp-ir)/secção no ARC. (B) Porcentagem da área Kp-ir no ARC. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado ao grupo N-Lac; # $P < 0,05$ comparado ao grupo Lac e Lac+B+P, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Dados expressos em média \pm EPM.

Efeito do bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina sobre a expressão de kisspeptina no AVPV durante a lactação

Fotomicrografias coronais apresentadas na figura 7 demonstram a imunorreatividade à kisspeptina no núcleo AVPV dos grupos N-Lac (A), Lac (B), Lac+B (C) e Lac+B+P (D), caracterizada pela presença de fibras e praticamente ausência de corpos celulares de neurônios kisspeptinérgicos. Desta forma, nesta região foi quantificada somente a área marcada para kisspeptina (%), apresentada na figura 8. A análise dos dados demonstrou que a porcentagem de área marcada para kisspeptina

no AVPV não variou significativamente entre os grupos N-Lac ($3,41 \pm 0,66$), Lac ($3,22 \pm 0,47$), Lac+B ($2,46 \pm 0,29$) e Lac+B+P ($3,77 \pm 0,66$) ($P = 0,35$).

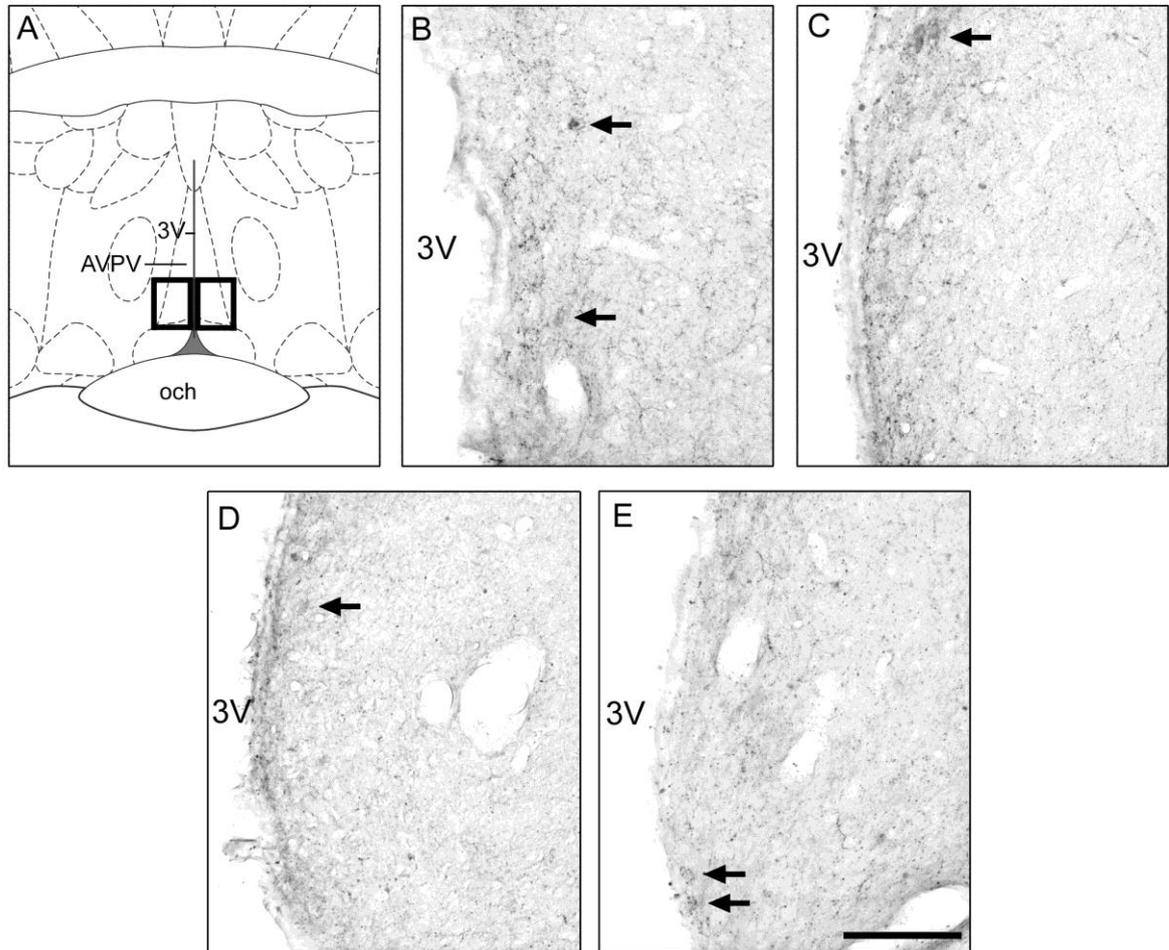


Figura 7: Imunorreatividade à kisspeptina no AVPV durante a lactação. Ratas lactantes receberam injeções s.c. de bromocriptina (Lac+B; n = 7), bromocriptina e PRLo (Lac+B+P; n = 8), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; n = 7). Ratas não lactantes receberam injeções de veículo (N-Lac; n = 7). As ratas foram perfundidas no dia 8 da lactação e os cérebros processados para imunohistoquímica. (A) Diagrama esquemático representado regiões analisadas no núcleo AVPV (caixas pretas). (B-E) Fotomicrografias representativas de ratas N-Lac (B), Lac (C), Lac+B (D) e Lac+B+P (E). 3V: terceiro ventrículo. EM: eminência mediana. Escala = 100 μ m.

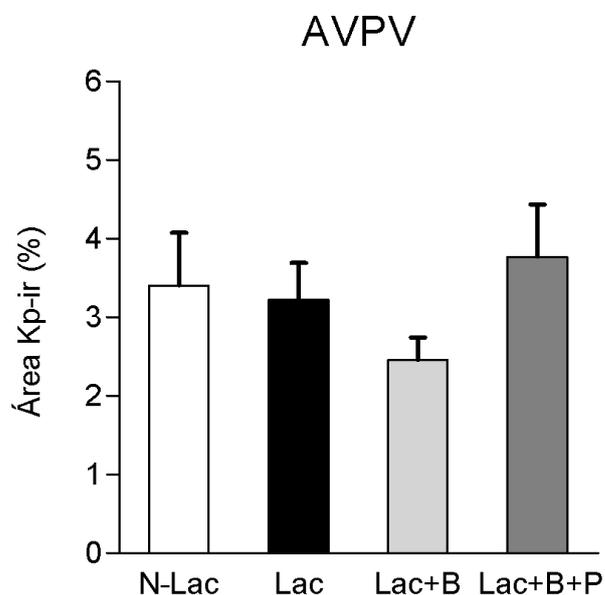


Figura 8: Porcentagem de área imunorreativa à kisspeptina (Kp-ir) no AVPV durante a lactação. Ratas lactantes receberam injeções s.c. de bromocriptina (Lac+B; n = 7), bromocriptina e PRL_o (Lac+B+P; n = 8), ou dos veículos das respectivas drogas (Lac; n = 7). Ratas não lactantes receberam injeções veículo (N-Lac; n = 7). As ratas foram perfundidas no dia 8 da lactação e os cérebros processados para imunohistoquímica. Dados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P = 0,35$), determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

3.2. Experimento 2: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina e secreção de LH em ratas OVX

Avaliação do peso do útero no modelo de ovariectomia de curto prazo

A citologia vaginal das ratas estudadas foi acompanhada diariamente durante os 3 dias de tratamento após a ovariectomia. Na manhã do dia do experimento, foi observado que as ratas OVX+Vei, OVX+PRL_{sc} e OVX+PRL_{icv} apresentavam citologia

vaginal condizente com a fase de diestro, caracterizada por grande quantidade de leucócitos (figura 9A), enquanto as ratas OVX+E2 apresentavam citologia semelhante à fase de estro, caracterizada pela presença de células cornificadas devido as ações estrogênicas sobre o epitélio vaginal (figura 9B). Os tratamentos com PRLo por via s.c. e i.c.v. não promoveram alterações no peso do útero das ratas OVX+PRLsc ($0,14 \pm 0,02$ g) e OVX+PRLicv ($0,12 \pm 0,01$ g) em relação ao grupo OVX+Vei ($0,13 \pm 0,02$ g). O tratamento com estradiol aumentou significativamente o peso uterino nas ratas OVX+E2 ($0,33 \pm 0,02$ g) em comparação, aos demais grupos experimentais ($P < 0,001$) (figura 10). Estes dados indicam que o modelo de ovariectomia de curto prazo empregado representa adequadamente uma condição hormonal de supressão dos efeitos do estradiol, sendo sensível ao aumento dos níveis circulantes deste hormônio.

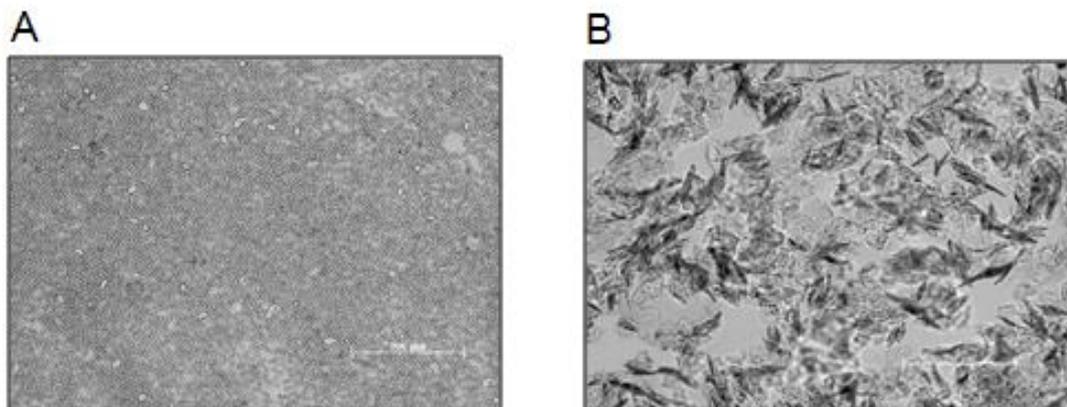


Figura 9: Citologia vaginal de ratas submetidas à ovariectomia de curto prazo. Ratas foram ovariectomizadas (OVX) e seu ciclo estral foi acompanhado diariamente durante os 3 dias de tratamento. Na manhã do terceiro dia, foi obtida imagem por microscopia óptica e então a fase do ciclo estral foi identificada pelo tipo dos constituintes celulares presentes. (A) citologia vaginal condizente com diestro observada em ratas OVX tratadas com veículo, PRLsc ou PRLicv. (B) citologia vaginal condizente com estro, observada em ratas OVX tratadas com estradiol.

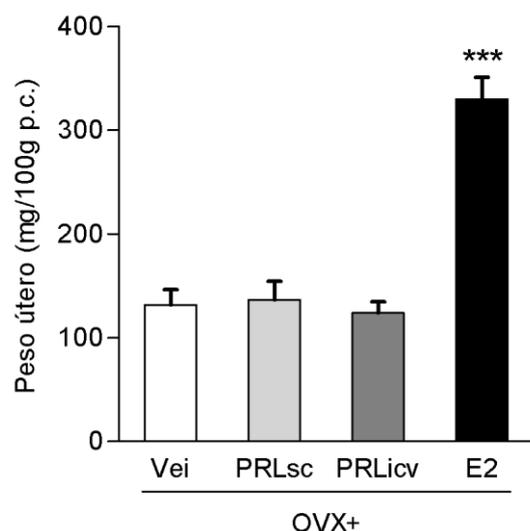


Figura 10: Peso do útero de ratas OVX tratadas com PRLo ou estradiol. Ratas foram OVX e tratadas a partir do dia seguinte com PRLo s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRLo i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 6), estradiol (OVX+E2; n = 5) ou veículos (OVX+Veil; n = 8) durante 2 dias, e perfundidas no terceiro dia. Média \pm EPM do peso do útero. *** $P < 0,001$ comparados aos grupos OVX+Veil, OVX+PRLsc e OVX+PRLicv, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Efeito da PRL sobre a secreção de LH em ratas OVX

As concentrações plasmáticas de LH de ratas OVX tratadas com PRLo e estradiol são apresentadas na figura 11. As ratas OVX+PRLsc ($4,33 \pm 1,43$ ng/mL), OVX+PRLicv ($2,17 \pm 0,32$ ng/mL) e OVX+E2 ($3,15 \pm 0,70$ ng/mL) apresentaram redução consistente nas concentrações plasmáticas de LH em relação às ratas OVX+Veil ($8,23 \pm 1,41$ ng/mL) ($P < 0,01$). A supressão da secreção de LH em relação ao grupo OVX+Veil foi de aproximadamente 48%, 74% e 62% para ratas OVX+PRLsc, OVX+PRLicv e OVX+E2, respectivamente. Não foi detectada diferença significativa de resposta entre os tratamentos com PRLo s.c., PRLo i.c.v., ou estradiol.

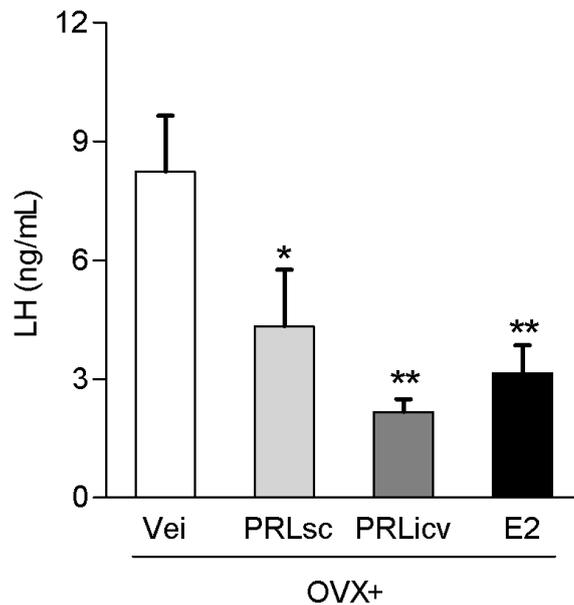


Figura 11: Efeito da PRL sobre a secreção de LH em ratas OVX. Ratas foram OVX e tratadas a partir do dia seguinte com PRLo s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRLo i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 6), estradiol (OVX+E2; n = 5) ou veículos (OVX+Vei; n = 8) durante 2 dias, e perfundidas no terceiro. Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca durante a perfusão para dosagem das concentrações plasmáticas de LH. Os dados dos diferentes veículos foram agrupados em um único grupo por não apresentarem diferença de resposta. Média \pm EPM das concentrações plasmáticas de LH. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado ao grupo OVX+Vei, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Dados expressos em média \pm EPM.

Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC de ratas OVX

Fotomicrografias coronais apresentadas na figura 12 demonstram variações na imunorreatividade à kisspeptina no núcleo ARC de ratas OVX+Vei (B), OVX+PRLsc (C), OVX+PRLicv (D) e OVX+E2 (E). As setas indicam exemplos de neurônios kisspeptina-ir, identificados por possuírem o corpo celular corado em preto. A contagem de neurônios kisspeptina-ir/secção é apresentada na figura 13A. Ratas OVX+Vei ($32,64 \pm 4,37$) exibiram maior número de neurônios kisspeptina-ir no ARC do

que as ratas OVX+PRLsc ($17,13 \pm 2,47$), OVX+PRLicv ($12,23 \pm 1,58$) e OVX+E2 ($7,9 \pm 0,89$) ($P < 0,001$). Estes valores indicam uma redução consistente em relação ao grupo OVX+Vei de aproximadamente 48%, 63% e 75% para os grupos OVX+PRLsc, OVX+PRLicv e OVX+E2, respectivamente. O número de neurônios kisspeptina-ir nas ratas OVX+E2 foi também significativamente menor do que nas ratas OVX+PRLsc ($P < 0,05$). A quantificação da área marcada para kisspeptina no ARC é apresentada na figura 13B. As ratas OVX+PRLsc ($12,67 \pm 2,61$), OVX+PRLicv ($4,79 \pm 1,09$) e OVX+E2 ($9,62 \pm 3,47$) apresentaram redução expressiva na porcentagem de área kisspeptina-ir em comparação ao grupo OVX+Vei ($27,03 \pm 2,44$) ($P < 0,001$). Esses valores correspondem a uma redução de aproximadamente 53%, 82% e 65% para ratas OVX+PRLsc, OVX+PRLicv e OVX+E2, respectivamente, em relação ao grupo OVX+Vei. A área kisspeptina-ir foi ainda significativamente menor nas ratas OVX+PRLicv do que nas OVX+PRLsc ($P < 0,05$).

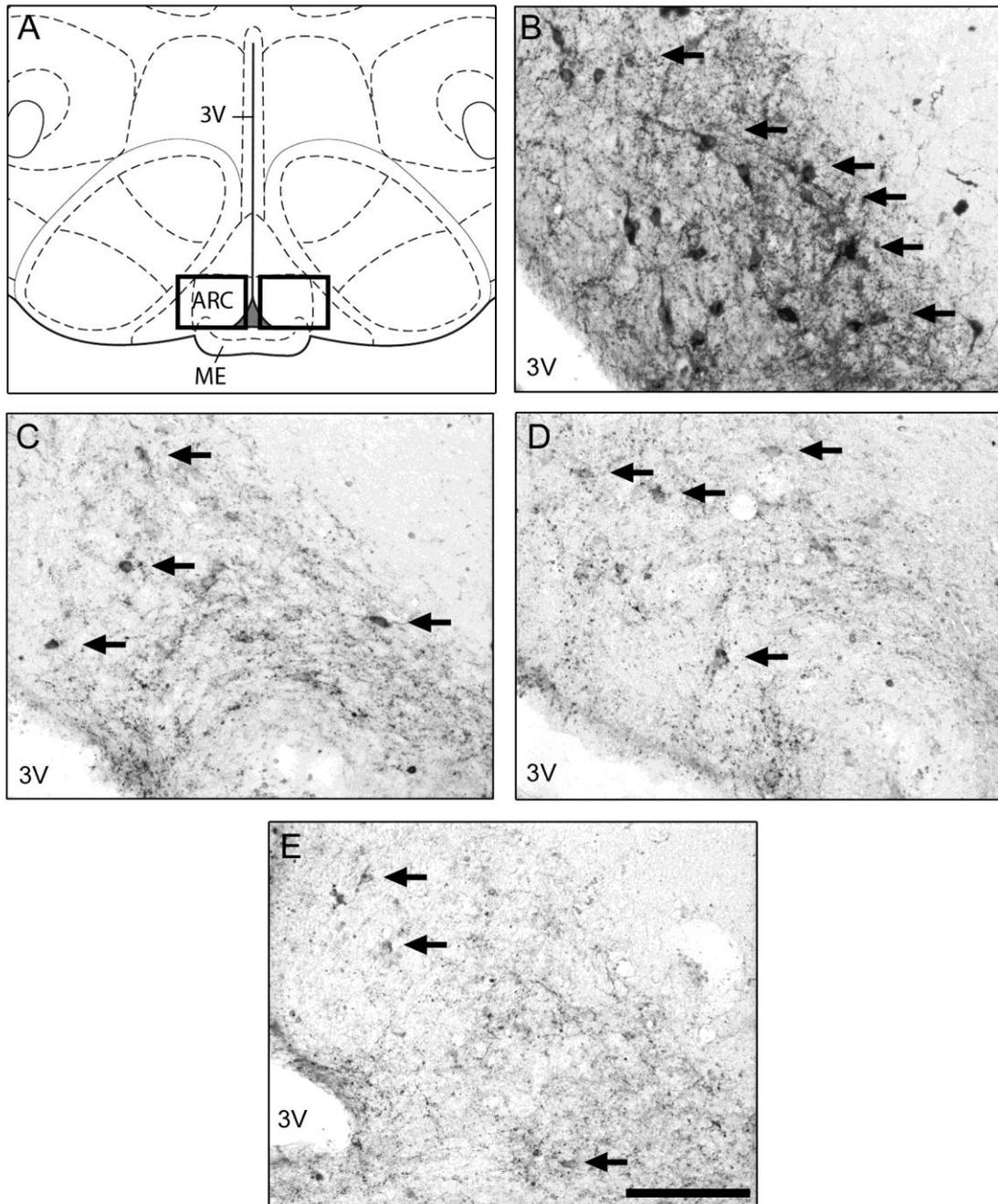


Figura 12: Imunorreatividade à kisspeptina no ARC de ratas OVX tratadas com PRL ou estradiol. Ratas foram OVX e tratadas a partir do dia seguinte com PRL s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRL i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 6), estradiol (OVX+E2; n = 5) ou veículo (OVX+Vei; n = 8) durante 2 dias, e perfundidas no terceiro dia. Os cérebros foram processados para imunohistoquímica. (A) Diagrama esquemático representado regiões analisadas no núcleo ARC (caixas pretas). (B-E) Fotomicrografias representativas de ratas OVX+Vei (B),

OVX+PRLsc (C), OVX+PRLicv (D) e OVX+E2 (E). 3V: terceiro ventrículo. EM: eminência mediana. Escala = 100 μ m.

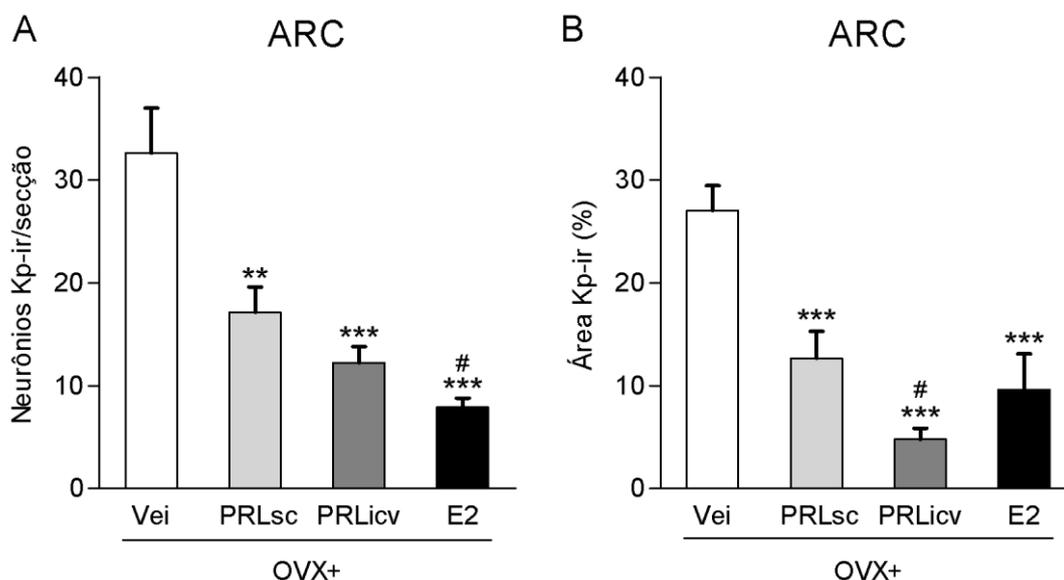


Figura 13: Efeito da PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC de ratas OVX. Ratas foram OVX e tratadas a partir do dia seguinte com PRLo s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRLo i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 6), estradiol (OVX+E2; n = 5) ou veículos (OVX+Veil; n = 8) durante 2 dias, e perfundidas no terceiro dia. Os dados dos diferentes veículos foram agrupados em um único grupo por não apresentarem diferença de resposta. (A) Número de neurônios kisspeptina-ir (Kp-ir)/secção no ARC. (B) Porcentagem da área Kp-ir no ARC. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVX+Veil; # $P < 0,05$ comparado ao grupo OVX+PRLsc, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Dados expressos em média \pm EPM.

Expressão de kisspeptina no AVPV de ratas OVX tratadas com PRLo e estradiol

Na figura 14 são apresentadas fotomicrografias coronais que demonstram variações na imunorreatividade à kisspeptina no núcleo AVPV de ratas OVX+Veil (A), OVX+PRLsc (B), OVX+PRLicv (C) e OVX+E2 (D). A marcação nesta região foi caracterizada pela presença de fibras e praticamente ausência de corpos celulares de neurônios kisspeptinérgicos. Desta forma, foi quantificada somente a área de

marcação, que corresponde majoritariamente à presença de fibras kisspeptina-ir (figura 15). As ratas OVX+E2 ($1,51 \pm 0,58$) apresentaram maior porcentagem de área marcada para kisspeptina em relação aos grupos OVX+Vei ($0,65 \pm 0,12$), OVX+PRLsc ($0,45 \pm 0,03$) e OVX+PRLicv ($0,56 \pm 0,07$) ($P < 0,05$). Por outro lado, não foi detectado efeito dos tratamentos com PRL s.c. ou i.c.v. sobre a expressão de kisspetina no AVPV.

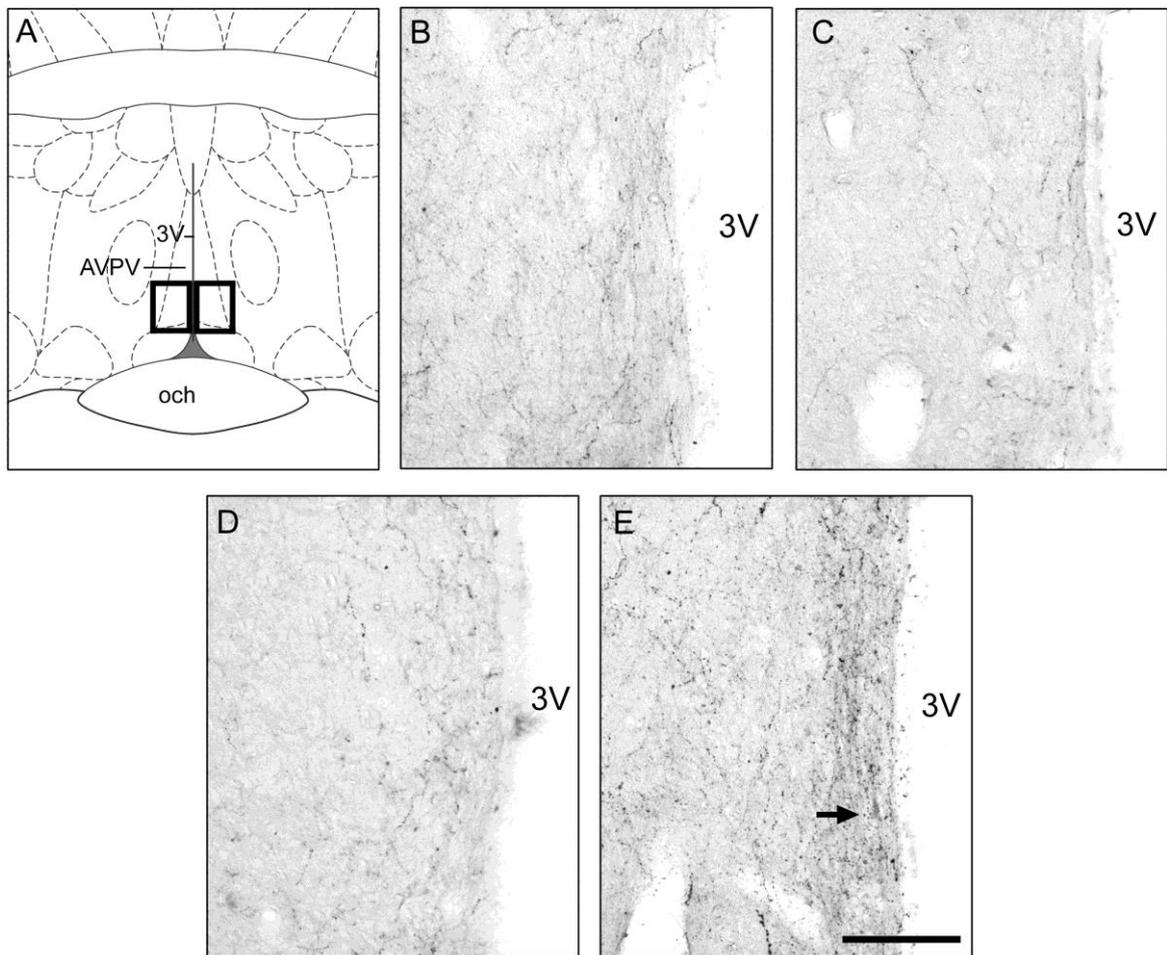


Figura 14: Imunorreatividade à kisspeptina no AVPV de ratas OVX tratadas com PRL e estradiol. Ratas foram OVX e tratadas a partir do dia seguinte com PRL s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRL i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 6), estradiol (OVX+E2; n = 5) ou veículos (OVX+Vei; n = 8) durante 2 dias, e perfundidas no terceiro dia. Os cérebros foram processados para imunohistoquímica. (A) Diagrama esquemático representado regiões analisadas no núcleo

AVPV (caixas pretas). (B-E) Fotomicrografias representativas de ratas OVX+Vei (B), OVX+PRLsc (C), OVX+PRLicv (D) e OVX+E2 (E). 3V: terceiro ventrículo. EM: eminência mediana. Escala = 100 μ m.

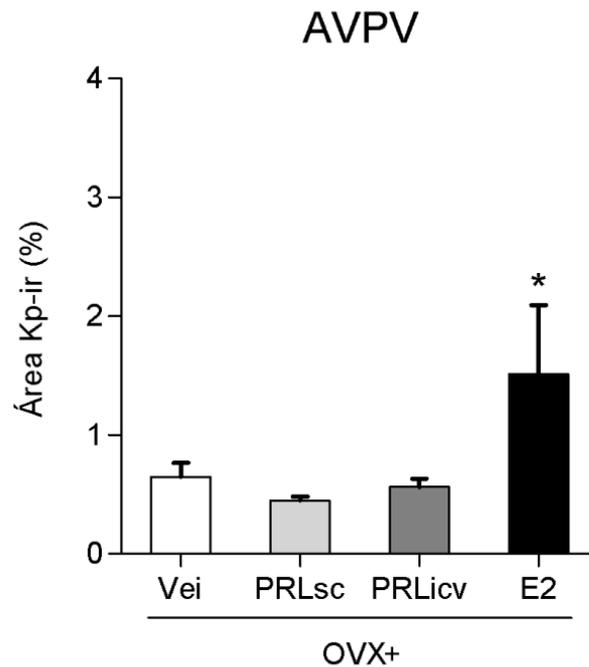


Figura 15: Expressão de kisspeptina no AVPV de ratas OVX tratadas com PRL e estradiol. Ratas foram OVX e tratadas a partir do dia seguinte com PRL s.c. (OVX+PRLsc; n = 6), PRL i.c.v. (OVX+PRLicv; n = 6), estradiol (OVX+E2; n = 5) ou veículos (OVX+Vei; n = 8) durante 2 dias, e perfundidas no terceiro dia. Os dados dos diferentes veículos foram agrupados em um único grupo por não apresentarem diferença de resposta. Média \pm EPM da porcentagem da área kisspeptina-ir (Kp-ir) no AVPV. * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos experimentais, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que, durante a lactação, a PRL é capaz de regular a expressão de kisspeptina no núcleo ARC, embora reverta apenas parcialmente o quadro de supressão deste neuropeptídeo e da secreção de LH. Por outro lado, ratas virgens submetidas à ovariectomia e posteriormente tratadas com PRL_o, por via s.c. ou i.c.v., apresentaram redução marcante do número de neurônios kisspeptina-ir e da porcentagem de área marcada para kisspeptina no núcleo ARC, efeito associado a uma redução expressiva nas concentrações plasmáticas de LH.

O tratamento diário de ratas lactantes com bromocriptina promoveu o bloqueio da secreção de PRL, cujos níveis plasmáticos estão sabidamente altos durante a lactação. É descrito que, durante a primeira metade da lactação, o aumento da concentração de PRL deve-se principalmente ao estímulo de sucção do mamilo pelos filhotes (Tsukamura & Maeda, 2001). Assim sendo, o método de rodízio dos filhotes a cada 12 horas, entre as mães tratadas com veículo e as mães tratadas com bromocriptina, garantiu a sucção eficaz e a nutrição adequada à prole, verificado por meio do acompanhamento diário do ganho de peso das ninhadas. Durante esse período, a PRL é apontada como um dos fatores responsáveis pela redução da capacidade reprodutiva, uma vez que é capaz de inibir a secreção de GnRH e LH (Smith, 1978; Cohen-Becker et al., 1986; Matsuzaki et al., 1994; Tsukamura & Maeda, 2001).

O bloqueio da PRL endógena com bromocriptina, foi revertido pela administração de PRL_o, a qual foi capaz de garantir a nutrição adequada aos filhotes, como determinado pelo ganho de peso da ninhada. A administração de PRL_o em conjunto com bromocriptina manteve os níveis plasmáticos de LH semelhantes aos de ratas lactantes, o que mimetiza, portanto, o efeito que a PRL endógena exerceria sobre a secreção de LH.

O controle da secreção de LH tem sido relacionado ao neuropeptídeo denominado kisspeptina (Navarro, 2012; Pinilla et al., 2012). Ratas Lac e Lac+B+P apresentaram redução significativa do número de neurônios kisspeptina-ir, bem como da porcentagem de área marcada para kisspeptina-ir no núcleo ARC, quando comparadas às ratas N-Lac. Estes dados estão de acordo com resultados recentes de grupos distintos de pesquisadores que demonstraram uma redução da expressão do RNAm para *KiSS1* no ARC, mas não no AVPV de ratas lactantes (Yamada et al., 2007; True et al., 2011). Após o bloqueio da secreção de PRL com bromocriptina, ratas Lac+B apresentaram um aumento na expressão de neurônios kisspeptina-ir no ARC em relação às ratas Lac e Lac+B+P. Ainda, a análise da porcentagem de área marcada para kisspeptina-ir no núcleo ARC demonstrou ausência de inibição efetiva em ratas Lac+B em comparação a resposta observada nos grupos Lac e Lac+B+P, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa. Este tipo de análise nos fornece informações sobre a área total imunorreativa à kisspeptina-10, o que compreende neurônios kisspeptina-ir, bem como fibras kisspeptina-ir. Portanto, é possível averiguar a existência de resposta similar quanto ao aumento do número de neurônio kisspeptina-ir e a porcentagem de área marcada para kisspeptina-10 no núcleo ARC de ratas lactantes tratadas com bromocriptina, sugerindo que o bloqueio da secreção de PRL afeta de forma consistente a expressão de kisspeptina no ARC durante a lactação.

Ratas Lac apresentaram níveis de LH reduzidos quando comparados aos controles N-Lac. A redução das concentrações de LH em ratas lactantes pode ser devido à menor secreção hipotalâmica de GnRH. Nesse sentido, é descrito que o vigoroso estímulo de sucção na fase inicial da lactação, causa inibição do LH que pode estar associado ao aumento dos níveis plasmáticos de PRL (Taya & Greenwald, 1982). Porém, de acordo com relatos da literatura, a PRL não é a principal responsável pela inibição da fertilidade durante a primeira metade da lactação (Lu et

al., 1976; Smith et al., 1976; Smith & Neill, 1977; Smith, 1978; Grattan et al., 2007), uma vez que a presença do estímulo de sucção parece ser necessário para que os efeitos inibitórios da PRL sobre a secreção de LH sejam manifestados (Smith, 1978). Assim sendo, o tratamento com bromocriptina foi capaz de aumentar apenas de forma sutil os níveis de LH, corroborando, portanto, com dados previamente descritos na literatura. Resposta diferenciada, entretanto, ocorreu nas ratas N-Lac, as quais apresentaram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de LH após remoção das ninhadas e conseqüentemente do estímulo de sucção, indispensável tanto à liberação de PRL quanto à inibição da secreção de LH durante este período.

Além do ARC, outra região na qual há intensa expressão de fibras kisspeptinérgicas é a APO, em especial no núcleo AVPV (Gottsch et al., 2004; Clarkson et al., 2009). A análise da imunorreatividade à kisspeptina no AVPV demonstrou praticamente ausência de corpos celulares de neurônios kisspeptinérgicos nesta região. Isto está em contraste aos resultados recentemente publicados demonstrando a presença de tais corpos neuronais no AVPV de ratas lactantes (True et al., 2011). Por outro lado, nossos resultados são coerentes com a ideia amplamente divulgada de haver regularmente baixo nível de marcação imunohistoquímica para neurônios kisspeptinérgicos no AVPV de ratos (Desroziers et al., 2010), embora os neurônios possam ser visualizados através da expressão do RNAm para *KISS1* (Smith et al., 2006). Os motivos para ausência de marcação imunohistoquímica não são completamente conhecidos. Uma possível explicação é que o neuropeptídeo seria armazenado majoritariamente nos terminais e não nos corpos celulares dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV, sendo esta hipótese sustentada pela marcação expressiva de corpos celulares kisspeptin-ir no AVPV de ratas tratadas com colchicina, que promove acúmulo de neuropeptídeos no soma neuronal (Adachi et al., 2007).

A porcentagem de área kisspeptina-ir no AVPV não foi estatisticamente diferente entre os grupos N-Lac e Lac, o que corrobora com achados prévios que demonstraram

redução na expressão de kisspeptina-ir no ARC mas não no AVPV de ratas lactantes (Yamada et al., 2007). Tal fato demonstra que o durante a lactação, os neurônios kisspeptinérgicos do ARC devem participar mais ativamente do controle da fertilidade, uma vez que estão envolvidos no mecanismo de retroalimentação negativa (Gottsch et al., 2004; Clarkson et al., 2009) que regula a secreção pulsátil de LH, e a inibição desta pulsatilidade é descrita como principal causa de infertilidade (Cohen-Becker et al., 1986; Fox et al., 1987).

Em contrapartida, o efeito mais pronunciado da PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC e redução da secreção de LH foi observado em ratas virgens OVX. Sabidamente, a expressão de PRL-R é dependente dos níveis circulantes de estradiol (Grattan & Kokay, 2008) e este hormônio exerce um efeito inibitório sobre a expressão de kisspeptina no núcleo ARC (Smith et al., 2005a). Nesse sentido, para o estudo de ratas OVX utilizamos um modelo de ovariectomia de curto prazo, correspondente a um período de 3 dias, a fim de se reduzir o impacto negativo da ovariectomia sobre expressão de PRL-R no sistema nervoso central. A ovariectomia promove ainda um aumento da expressão de kisspeptina no ARC, devido a remoção da alça de feedback negativo exercido pelo estradiol. Por conseguinte, foi possível avaliar os efeitos da PRL sobre os elevados níveis de kisspeptina no ARC e secreção de LH de ratas OVX, e compará-los com o clássico efeito supressor do estradiol. O tratamento com PRL por via s.c. e i.c.v. não alterou o peso do útero em relação ao controle OVX. Entretanto, o tratamento com estradiol promoveu aumento expressivo do peso uterino em relação aos demais grupos, o que está relacionado à ação trófica do estradiol sobre o útero. Os dados em conjunto demonstram que o modelo de ovariectomia de curto prazo, foi eficiente em promover uma condição hormonal de supressão dos efeitos do estradiol, levando à atrofia uterina e sendo sensível aos níveis circulantes deste hormônio.

O tratamento com PRL_o, tanto por via s.c., quanto i.c.v., promoveu a inibição da expressão de kisspeptina no ARC, mas não no AVPV das ratas OVX. Isso foi verificado a partir da análise de parâmetros como a redução do número de neurônios kisspeptina-ir, porcentagem de área kisspeptina-ir em relação ao controle OVX. Esta redução da expressão da kisspeptina no ARC foi associado com a redução das concentrações plasmáticas de LH. Possivelmente, esta ação deve-se ao controle inibitório exercido pela PRL sobre a função dos neurônios kisspeptinérgicos do ARC, uma vez que estes apresentam alta expressão de PRL-R (Kokay et al., 2011). O tratamento com PRL i.c.v promoveu um efeito mais pronunciado de redução na expressão kisspeptina no ARC quando comparado à administração sistêmica, evidenciado pela maior redução da área kisspeptina-ir. Isso pode ser justificado pelo fato que a PRL por via i.c.v., atua diretamente sobre os seus PRL-R de forma longa expressos no sistema nervoso central, exercendo seus efeitos inibitórios sobre o eixo reprodutivo. Em contrapartida, a PRL s.c., por ser um hormônio de elevado peso molecular, deve encontrar maior dificuldade para atravessar a barreira hematoencefálica. Sabe-se que a PRL sistêmica é capaz de exercer suas ações no sistema nervoso central ao se ligar aos seus receptores expressos no plexo coroide ou através da passagem por fenestrações dos capilares vasculares em regiões com ausência de barreira hematoencefálica, como por exemplo a eminência mediana (Grattan, 2002; Sapsford et al., 2012). Apesar de existir diferença na eficácia entre a PRL s.c. e i.c.v. sobre a área de kisspeptina-ir, as duas vias de tratamento resultaram em redução semelhante dos níveis plasmáticos de LH. Isso indica que o efeito inibitório da PRL sobre a expressão de kisspeptina no ARC resulta em inibição da secreção de LH em ratas OVX, independentemente da forma de administração.

Em contraste com a ação inibitória exercida no ARC, o tratamento com PRL não alterou a expressão de fibras kisspeptinérgicas no AVPV. Estas repostas diferenciadas indicam um mecanismo eficiente de ação da PRL na inibição da secreção pulsátil de

LH, controlada pelos neurônios kisspeptinérgicos do ARC, que resulta em diminuição ou bloqueio da fertilidade. Porém é necessário averiguar mais detalhadamente os efeitos da administração de PRL sobre a pulsatilidade e pico de LH, já que possuímos apenas valores médios das concentrações plasmáticas de LH. Por outro lado, parece não haver efeito da PRL sobre a gênese do pico pré-ovulatório de LH, regulado pelos neurônios do AVPV. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer se há envolvimento da PRL no efeito de retroalimentação positiva do estradiol sobre a secreção de LH.

Por sua vez, um grupo adicional de ratas OVX tratadas com estradiol foi utilizado, já que é conhecida sua ação sobre a expressão de neurônios kisspeptinérgicos no ARC e AVPV. Estes neurônios são regulados de maneira diferenciada pelo estradiol, pois o mesmo estimula a expressão de *KiSS1* no AVPV, enquanto a inibe no ARC (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Com efeito, observou-se uma redução na expressão de kisspeptina no ARC e um aumento no AVPV de ratas OVX+E2 em relação ao grupo OVX. No ARC, não houve alteração na expressão de kisspeptina-ir após tratamento com PRL por vias s.c. e i.c.v. em relação ao tratamento com estradiol. Entretanto, o estradiol promoveu maior expressão de kisspeptina-ir no AVPV quando comparado aos grupos tratados com PRL. Os níveis de LH também foram semelhantes entre ratas tratadas com estradiol ou PRL e reduzidos em comparação ao grupo OVX, o que demonstra que a PRL assim como o estradiol, foi capaz de reduzir a secreção de gonadotrofinas.

Estudos relacionados à ação inibitória da PRL sobre o eixo HPG demonstram que durante a hiperprolactinemia a PRL atua provavelmente no hipotálamo, reduzindo a secreção de GnRH. Porém, não foi observada alteração na responsividade da hipófise ao GnRH (Cohen-Becker et al., 1986; Elkind-Hirsch et al., 1987; Elkind-Hirsch et al., 1989; Matsuzaki et al., 1994). Isso sugere que a alta concentração de PRL pode causar anovulação e infertilidade por reduzir tanto a frequência quanto a amplitude dos

pulsos de LH (Sauder et al., 1984; Matsuzaki et al., 1994). Entretanto, a evidência que os neurônios GnRH apresentam baixa expressão de PRL-R (Kokay et al., 2011), reforça a hipótese da existência de interneurônios, que apresentam conexões com neurônios GnRH e expressam PRL-R, envolvidos no efeito inibitório da PRL sobre a atividade dos neurônios GnRH.

A kisspeptina exerce papel crucial na regulação da fertilidade, devido a sua potente ação estimulatória sobre a secreção das gonadotrofinas, além de apresentar alta expressão de PRL-R, quando comparada aos neurônios GnRH (Kokay et al., 2011; Navarro, 2012). Em conjunto, nossos dados sugerem que a ação inibitória exercida pela PRL sobre o eixo gonadal envolve a inibição dos neurônios kisspeptinérgicos do ARC. Portanto, os achados deste trabalho indicam um novo mecanismo pelo qual a PRL exerce sua regulação inibitória por meio de uma alça de retroalimentação negativa sobre o possível eixo kisspeptina-DA-PRL em ratas OVX, como demonstrado pela figura 16. Em contrapartida, a PRL possui uma ação bastante discreta sobre a supressão da secreção de LH durante a lactação. Assim sendo, outros neurotransmissores devem atuar majoritariamente para promover o estado de infertilidade durante a lactação, como por exemplo, peptídeos opioides endógenos (Arbogast & Ben-Jonathan, 1988), NPY (Li et al., 1999), GABA (Kornblatt & Grattan, 2001), e a própria kisspeptina (Yamada et al., 2007; True et al., 2011). Logo, estes resultados corroboram com trabalhos que ressaltam a importância da ativação de vias neurais pelo estímulo de sucção, bem como alterações metabólicas, para a supressão da fertilidade durante a lactação (Tsukamura & Maeda, 2001), muito embora as principais moléculas sinalizadoras destas vias ainda não estejam claramente elucidadas.

CONCLUSÕES

Durante a lactação, o bloqueio da secreção de PRL resultou apenas em um pequeno aumento na expressão de kisspeptina e nos níveis plasmáticos de LH. Isso indica que durante a lactação, a PRL exerce um efeito inibitório leve tanto sobre a expressão de kisspeptina, quanto sobre a secreção de LH. Portanto, é provável que a inibição da fertilidade durante a lactação deva-se principalmente a outros fatores, como por exemplo sinais neurais deflagrados pelo estímulo de sucção.

Em ratas nulíparas, a PRL atua no sistema nervoso central inibindo a expressão de kisspeptina no ARC e, por conseguinte, reduz os níveis plasmáticos de LH. Estes dados demonstram um novo mecanismo de ação através do qual a PRL é capaz de modular a atividade do eixo HPG e, conseqüentemente, a fertilidade.

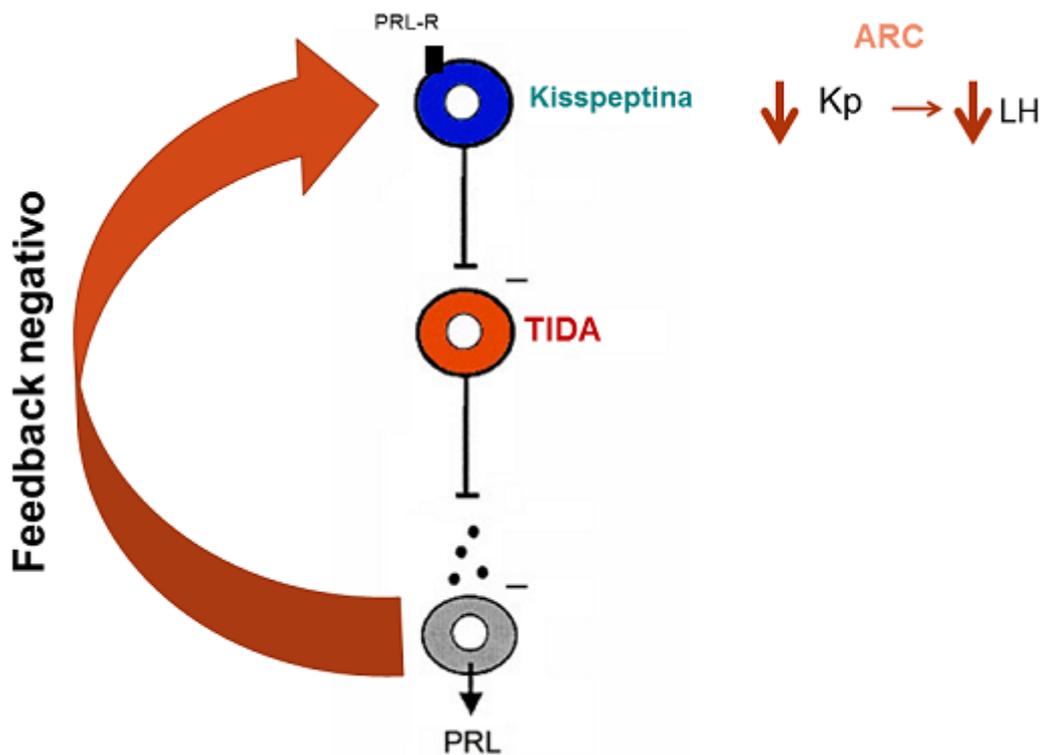


Figura 16: Modulação do eixo reprodutivo de ratas ovariectomizadas pela prolactina. PRL: prolactina; PRL-R: receptor de prolactina; ARC: núcleo arqueado; Kp: kisspeptina; LH: hormônio luteinizante; TIDA: neurônios do sistema tuberoinfundibular dopaminérgico.

REFERÊNCIAS

1. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J ReprodDev* 2007; 53: 367-378.
2. Anderson GM, Kieser DC, Steyn FJ, Grattan DR. Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology* 2008; 149: 1562-1570.
3. Anderson GM, Beijer P, Bang AS, Fenwick MA, Bunn SJ, Grattan DR. Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation. *Endocrinology* 2006; 147: 4996-5005.
4. Andrews ZB, Grattan DR. Opioid receptor subtypes involved in the regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 227-236.
5. Arbogast LA, Ben-Jonathan N. The preovulatory prolactin surge: an evaluation of the role of dopamine. *Endocrinology* 1988; 123: 2690-2695.
6. Arbogast LA, Voogt JL. The responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin feedback is diminished between early lactation and midlactation in the rat. *Endocrinology* 1996; 137: 47-54.
7. Arbogast LA, Voogt JL. Endogenous opioid peptides contribute to suckling-induced prolactin release by suppressing tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid levels in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology* 1998; 139: 2857-2862.
8. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22: 724-763.
9. Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC. Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 1977; 100: 452-458.
10. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-268.
11. Bouilly J, Sonigo C, Auffret J, Gibori G, Binart N. Prolactin signaling mechanisms in ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2011.

12. Bridges RS, Ronsheim PM. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology* 1990; 126: 837-848.
13. Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR. Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 2010; 518: 92-102.
14. Buhimschi CS. Endocrinology of lactation. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004; 31: 963-979, xii.
15. Callahan P, Baumann MH, Rabii J. Inhibition of tuberoinfundibular dopaminergic neural activity during suckling: involvement of mu and kappa opiate receptor subtypes. *J Neuroendocrinol* 1996; 8: 771-776.
16. Callahan P, Klosterman S, Prunty D, Tompkins J, Janik J. Immunoneutralization of endogenous opioid peptides prevents the suckling-induced prolactin increase and the inhibition of tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* 2000; 71: 268-276.
17. Chen P, Smith MS. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. *Endocrinology* 2004; 145: 823-829.
18. Clarkson J, d'Anglemont dTX, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2008; 28: 8691-8697.
19. Clarkson J, d'Anglemont dTX, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 673-682.
20. Cohen-Becker IR, Selmanoff M, Wise PM. Hyperprolactinemia alters the frequency and amplitude of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1986; 42: 328-333.
21. Costello LC, Franklin RB. Effect of prolactin on the prostate. *Prostate* 1994; 24: 162-166.
22. d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology* 2010; 25: 207-217.
23. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10972-10976.
24. Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, Franceschini I. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 1101-1112.

25. Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6609-6615.
26. Dombrowicz D, Sente B, Closset J, Hennen G. Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology* 1992; 130: 695-700.
27. Dutt A, Kaplitt MG, Kow LM, Pfaff DW. Prolactin, central nervous system and behavior: a critical review. *Neuroendocrinology* 1994; 59: 413-419.
28. Elkind-Hirsch KE, Platia MP, Schiff I. Elevation of plasma immunoreactive luteinizing hormone releasing hormone in hyperprolactinemic-amenorrheic women on bromocriptine therapy. *J Reprod Med* 1987; 32: 5-9.
29. Elkind-Hirsch KE, Reynolds MV, Goldzieher JW. Comparison of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin in term placentas from normal women and those with insulin-dependent and gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 71-78.
30. Fitzsimmons MD, Olschowka JA, Wiegand SJ, Hoffman GE. Interaction of opioid peptide-containing terminals with dopaminergic perikarya in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1992; 581: 10-18.
31. Fox SR, Hofer MT, Bartke A, Smith MS. Suppression of pulsatile LH secretion, pituitary GnRH receptor content and pituitary responsiveness to GnRH by hyperprolactinemia in the male rat. *Neuroendocrinology* 1987; 46: 350-359.
32. Fuxe K. 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* 1965; 64: SUPPL.
33. Gala RR. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci* 1990; 46: 1407-1420.
34. Gibbs DM, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology* 1978; 102: 1895-1900.
35. Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8173-8177.
36. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 2007; 148: 5752-5760.

37. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides* 2009; 30: 4-9.
38. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 4073-4077.
39. Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 147-154.
40. Grattan DR. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* 2002; 123: 497-506.
41. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 752-763.
42. Grattan DR, Jasoni CL, Liu X, Anderson GM, Herbison AE. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology* 2007; 148: 4344-4351.
43. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005; 25: 11349-11356.
44. Herbison AE. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. San Diego: Academic Press 2006: 1415-1482.
45. Holzbauer M, Racke K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 1985; 63: 97-116.
46. Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 2000; 141: 3506-3509.
47. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 264-272.
48. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; 148: 1774-1783.

49. Kawano H, Daikoku S. Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1981; 32: 179-186.
50. Kawano H, Daikoku S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1987; 265: 242-253.
51. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12: 235-251.
52. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 2005; 146: 4431-4436.
53. Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology* 2011; 152: 526-535.
54. Kornblatt JJ, Grattan DR. Lactation alters gamma-aminobutyric acid neuronal activity in the hypothalamus and cerebral cortex in the rat. *Neuroendocrinology* 2001; 73: 175-184.
55. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le PE, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636.
56. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999; 446: 103-107.
57. Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 1997; 57: 2384-2387.
58. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-1737.
59. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010; 151: 3479-3489.
60. Li C, Chen P, Smith MS. Neuropeptide Y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: role of prolactin. *Endocrinology* 1999; 140: 118-123.

61. Lu KH, Chen HT, Huang HH, Grandison L, Marshall S, Meites J. Relation between prolactin and gonadotrophin secretion in post-partum lactating rats. *J Endocrinol* 1976; 68: 241-250.
62. Ma FY, Anderson GM, Gunn TD, Goffin V, Grattan DR, Bunn SJ. Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2005; 146: 5112-5119.
63. Matsuzaki T, Azuma K, Irahara M, Yasui T, Aono T. Mechanism of anovulation in hyperprolactinemic amenorrhea determined by pulsatile gonadotropin-releasing hormone injection combined with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1994; 62: 1143-1149.
64. McNeilly AS. Lactational control of reproduction. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13: 583-590.
65. Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology* 2007; 148: 140-147.
66. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr., Civelli O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7625-7628.
67. Melo AI, Perez-Ledezma M, Clapp C, Arnold E, Rivera JC, Fleming AS. Effects of prolactin deficiency during the early postnatal period on the development of maternal behavior in female rats: mother's milk makes the difference. *Horm Behav* 2009; 56: 281-291.
68. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1761-1766.
69. Molitch ME. Pituitary tumors: cabergoline versus bromocriptine: a meta-analysis? *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 254-255.
70. 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. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 28969-28975.
71. Nag S, Sanyal S, Ghosh KK, Biswas NM. Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. *Horm Res* 1981; 15: 72-77.

72. Navarro VM. New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 48.
73. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009; 29: 11859-11866.
74. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 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* 2004; 145: 4565-4574.
75. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005; 146: 1689-1697.
76. Neill JD. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 1972; 90: 1154-1159.
77. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613-617.
78. Ono M, Miki N, Amano K, Kawamata T, Seki T, Makino R, Takano K, Izumi S, Okada Y, Hori T. Individualized high-dose cabergoline therapy for hyperprolactinemic infertility in women with micro- and macroprolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2672-2679.
79. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2007.
80. Pi XJ, Grattan DR. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol* 1998a; 394: 462-474.
81. Pi XJ, Grattan DR. Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1998b; 59: 1-12.
82. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012; 92: 1235-1316.

83. Richard N, Corvaisier S, Camacho E, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides* 2009; 30: 123-129.
84. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 381-393.
85. Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. The preparation, identification and assay of prolactin - A hormone of the anterior pituitary. *Am J Physiol* 1933; 105: 191-216.
86. Samson WK, Schell DA. Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Adv Exp Med Biol* 1995; 395: 355-364.
87. Sapsford TJ, Kokay IC, Ostberg L, Bridges RS, Grattan DR. Differential sensitivity of specific neuronal populations of the rat hypothalamus to prolactin action. *J Comp Neurol* 2012; 520: 1062-1077.
88. Sauder SE, Frager M, Case GD, Kelch RP, Marshall JC. Abnormal patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion in women with hyperprolactinemia and amenorrhea: responses to bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 941-948.
89. Sawai N, Iijima N, Takumi K, Matsumoto K, Ozawa H. Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. *Neurosci Res* 2012.
90. Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; 6: 602-608.
91. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614-1627.
92. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2129-2134.
93. Sjoeholm A, Bridges RS, Grattan DR, Anderson GM. Region-, neuron-, and signaling pathway-specific increases in prolactin responsiveness in reproductively experienced female rats. *Endocrinology* 2011; 152: 1979-1988.
94. Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2009; 150: 5530-5538.

95. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005a; 146: 3686-3692.
96. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006; 26: 6687-6694.
97. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005b; 146: 2976-2984.
98. Smith MS. The relative contribution of suckling and prolactin to the inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat. *Biol Reprod* 1978; 19: 77-83.
99. Smith MS, Neill JD. Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biol Reprod* 1977; 17: 255-261.
100. Smith MS, McLean BK, Neill JD. Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 1976; 98: 1370-1377.
101. Smith MS, True C, Grove KL. The neuroendocrine basis of lactation-induced suppression of GnRH: role of kisspeptin and leptin. *Brain Res* 2010; 1364: 139-152.
102. Sugiyama T, Minoura H, Kawabe N, Tanaka M, Nakashima K. 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* 1994; 141: 325-333.
103. Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 374-382.
104. Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 629-639.
105. Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 3247-3257.
106. Taya K, Greenwald GS. Mechanisms of suppression of ovarian follicular development during lactation in the rat. *Biol Reprod* 1982; 27: 1090-1101.
107. Terkel J, Blake CA, Sawyer CH. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 1972; 91: 49-53.

108. Tomogane H, Ota K, Yokoyama A. Suppression of progesterone secretion in lactating rats by administration of ergocornine and the effect of prolactin replacement. *J Endocrinol* 1975; 65: 155-161.
109. True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS. Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* 2011; 23: 52-64.
110. Tsukamura H, Maeda K. Non-metabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. *Prog Brain Res* 2001; 133: 187-205.
111. Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Seong JY, Vaudry H. Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 716-727.
112. Watson RE, Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides* 1986; 7: 155-159.
113. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998; 54: 145-148.
114. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 2006; 52: 271-280.
115. Woodside B. Prolactin and the hyperphagia of lactation. *Physiol Behav* 2007; 91: 375-382.
116. Xu J, Kirigiti MA, Grove KL, Smith MS. Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: role of insulin and leptin. *Endocrinology* 2009; 150: 4231-4240.
117. Yamada S, Uenoyama Y, Deura C, Minabe S, Naniwa Y, Iwata K, Kawata M, Maeda KI, Tsukamura H. Oestrogen-dependent suppression of pulsatile luteinising hormone secretion and kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus during late lactation in rats. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 1234-1242.
118. Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H. Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 2007; 148: 2226-2232.