REGINA SILVA PARADELA

**Envolvimento dos neurônios Kiss1 na via neural através da qual o sistema
circadiano regula o ciclo ovulatório**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências
Biomédicas para obtenção do
título de mestre em Ciências
Morfofuncionais.

**São Paulo
2015**

REGINA SILVA PARADELA

**Envolvimento dos neurônios Kiss1 na via neural através da qual o sistema
circadiano regula o ciclo ovulatório**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
para obtenção do título de mestre
em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Neurociência

Orientador: Prof. Dr. Renata Frazão

Versão corrigida

**São Paulo
2015**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Paradela, Regina Silva.

Envolvimento dos neurônios Kiss 1 na via neural através da qual o sistema circadiano regula o ciclo ovulatório / Regina Silva Paradela. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Renata Frazão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Vias neurais que regulam a reprodução.

Versão do título para o inglês: Involvement of Kiss 1 neurons in the neural pathway through which the circadian system regulates the ovulatory cycle.

1. Kisspeptinas 2. Reprodução 3. Estrógeno 4. Núcleo supraquiasmático 5. ciclo ovulatório I. Frazão, Profa. Dr. Renata II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB038/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Regina Silva Paradela.

Título da Dissertação: Envolvimento dos neurônios Kiss 1 na via neural através da qual o sistema circadiano regula o ciclo ovulatório.

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Frazão.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP, Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **065** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Renata Frazão**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Controle neuroendócrino do ciclo ovulatório: Como informações circadianas modulam as propriedades biofísicas dos neurônios Kiss1*" do qual participam o(s) aluno(s) **Regina Pereira da Silva** e o pesquisador **José Donato Jr.**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **18.06.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 20 de junho de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico ao meu esposo, Fábio, pelo incansável apoio e estímulo durante o período em que foi desenvolvido esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

O mestrado foi uma experiência muito boa que alterou vários aspectos da minha vida. Durante esse período aprendi muitas coisas novas, conheci muitas pessoas com visões diferentes e aprendi a ver a vida por outro ângulo. Por isso, sou imensamente agradecida a Deus por ter me concedido essa experiência, e também às pessoas que ele permitiu que cruzasse o meu caminho.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof^a Dra. Renata Frazão, que me recebeu no laboratório durante a graduação para juntas desenvolvermos um projeto de iniciação científica. Logo após este período desenvolvemos o mestrado que resultou nessa dissertação. Aprendi inúmeras coisas com ela, coisas que vou levar pra vida. Foi extremamente enriquecedor esse período! Obrigada.

Não poderia deixar de agradecer também às meninas do laboratório, que foram colegas de trabalho e amigas também: Marina, Fernanda e Tabata. Sou muito grata pela força que vocês me deram durante esse trabalho. Tem um pouquinho da ajuda de vocês em cada parte dele. Isso fez uma grande diferença no resultado.

Sou extremamente agradecida também ao Renivaldo, e ao Fábio e o Rodrigo que trabalham com ele no Biotério do Departamento de Anatomia. O trabalho de vocês é indispensável e muito bom. Sem ele não daria pra fazer pesquisa de qualidade.

Obrigada também ao Prof^o Dr. José Donato Jr. do departamento de fisiologia e toda a equipe do seu laboratório. Tive a oportunidade de fazer muita coisa com eles e de aprender boa parte das técnicas que utilizei durante o mestrado, as quais aprimoraram muito a qualidade do projeto.

Sou imensamente agradecida também ao Laboratório de Estrutura e Função Celular da Prof^a Dra. Claudimara F. Pacicco Lotfi. Foi lá que consegui rodar as placas de qRT-PCR durante a parte final do mestrado.

E ao laboratório do Prof^o Dr. Newton Canteras, também agradeço por ceder muitas vezes o microscópio para análise das lâminas de imunoistoquímica fluorescente.

Também agradeço ao meu esposo, Fábio Paradela, por tanto incentivo que eu recebi da parte dele. Encorajamento e motivação fizeram toda a diferença. Obrigada! À minha mãe, ao meu irmão, Ruan, e amigos mais próximos, eu agradeço pela compreensão, paciência e admiração durante esse período.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento desse trabalho, pela bolsa de mestrado (Processo 2013/00801-3), e apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (Processo 2012/12202-4).

“Nunca ninguém se torna mestre num domínio em que não conheceu a impotência, e, quem aceita esta ideia, saberá também que tal impotência não se encontra nem no começo nem antes do esforço empreendido, mas sim no seu centro.”

Walter Benjamin

RESUMO

PARADELA, R. S. **Envolvimento dos neurônios Kiss1 na via neural através da qual o sistema circadiano regula o ciclo ovulatório.** 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O controle da reprodução envolve a participação de três áreas: hipotálamo anterior, adenohipófise e gônadas, as quais compõem o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG). Os neurônios Kiss1 localizados no núcleo anteroventral periventricular (AVPV/PeN) e núcleo arqueado (Arc) expressam o receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e são essenciais no controle neuroendócrino do ciclo ovulatório. Os neurônios Kiss1 do AVPV/PeN apresentam conexões recíprocas com o núcleo supraquiasmático (NSQ), considerado o principal relógio biológico, e através do qual a informação fótica poderia modular o ciclo ovulatório. A vasopressina (AVP) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) são os principais peptídeos produzidos pelo NSQ, e diversos estudos sugerem a participação destes neurotransmissores na secreção de LH. Devido à importância dos neurônios Kiss1 na regulação do ciclo ovulatório, o presente estudo investigou se fibras vasopressinérgicas estão em aposição com neurônios Kiss1 nos núcleos AVPV/PeN e Arc, bem como se os receptores através dos quais a AVP e o VIP se ligam para exercer suas ações são expressos nestes núcleos. Além disto, determinamos se variações nos níveis circulantes de estrógeno poderiam afetar a expressão destes receptores. Para testar os objetivos utilizamos camundongos que foram divididos em três grupos: fêmeas em diestro; fêmeas que foram submetidas a cirurgia para remoção dos ovários (OVX); e fêmeas que foram submetidas a cirurgia para remoção dos ovários e receberam reposição de estradiol (OVX+E2). Os resultados demonstraram que cerca de 15% dos neurônios Kiss1 localizados no AVPV/PeN estão em contato aparente com fibras vasopressinérgicas, sendo que, os níveis circulantes de estrógeno não afetaram esta distribuição e sim o número de neurônios Kiss1. Também observamos que o RNAm que codifica a expressão dos receptores Avpr1a, VPAC1 e VPAC2 foi detectado nas regiões correspondentes aos núcleos AVPV/PeN e Arc. O RNAm que codifica a expressão dos receptores Avpr1b e Avpr2 não foram detectados nas respectivas regiões. No núcleo AVPV/PeN, a remoção dos ovários induziu aumento significativo da expressão do RNAm que codifica a expressão dos receptores VPAC1 e VPAC2, enquanto que, na região correspondente ao núcleo Arc a reposição de estradiol induziu um aumento significativo na expressão do RNAm que codifica a expressão do Avpr1a. Nossos resultados sugerem uma possível participação dos neurotransmissores AVP e VIP na modulação da reprodução, visto que, a expressão do RNAm que codifica os seus receptores sofre influência dos níveis circulantes de estradiol; além disso, esses receptores foram detectados em núcleos que expressam o gene Kiss1, essencial para a função reprodutiva.

Palavras-chave: Kisspeptinas. Reprodução. Estrógeno. Núcleo Supraquiasmático. Ciclo Ovulatório.

ABSTRACT

PARADELA, R. S. **Involvement of Kiss1 neurons in the neural pathway through which the circadian system regulates ovulatory cycle.** 2015. 53 p. Masters thesis (Morphofunctional Sciences). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The control of reproduction involves the participation of three areas: the anterior hypothalamus, anterior pituitary and gonads, which make up the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG). The Kiss1 neurons in the periventricular anteroventral nucleus (AVPV/PeN) and arcuate nucleus (Arc) express the estrogen receptor alpha (ER α) and are essential in the neuroendocrine control of the ovulatory cycle. The Kiss1 neurons of the AVPV/PeN have reciprocal connections with the suprachiasmatic nucleus (SCN), considered the main biological clock, and through which photic information could modulate the ovulatory cycle. Vasopressin (AVP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) are the main peptides produced by the SCN, and several studies suggest the involvement of these neurotransmitters in LH secretion. Given the importance of Kiss1 neurons in the regulation of the ovulatory cycle, the present study investigated whether vasopressinergic fibers are in apposition with Kiss1 neurons in the AVPV/PeN and Arc nucleus, and whether the receptors of the AVP and VIP are expressed in these areas. In addition, we determine whether changes in circulating levels of estrogen could affect the expression of these receptors. To test these objectives our experimental animals (mice) were divided into three groups: females in diestrus; females ovariectomized (OVX); and females ovariectomized with estradiol replacement (OVX + E2). The results of this study demonstrated that approximately 15% of Kiss1 neurons, in the AVPV/PeN, co-located with vasopressinergic fibers, and that circulating levels of estrogen did not affect this distribution, but modified the number of Kiss1 neurons. In addition, we found that the mRNA encoding the expression of Avpr1a, VPAC1 and VPAC2 receptors was detected in the AVPV/PeN and Arc regions. The mRNA coding for the expression of Avpr1b and Avpr2 receptors was not detected in these regions. In the AVPV/PeN, removal of the ovaries induced significant increase of mRNA expression that encodes the expression of VPAC1 and VPAC2 receptors, whereas in the Arc replacement with estradiol induced a significant increase in the expression of mRNA encoding expression of Avpr1a. Our results suggest a possible involvement of AVP and VIP in modulating reproduction. since the expression of mRNA encoding their receptors is influenced by the circulating levels of estradiol; In addition, these receptors have been detected in nuclei expressing the Kiss1 gene essential for reproductive function.

Keywords: Kisspeptins. Reproduction. Estrogen. Suprachiasmatic Nucleus. Ovulatory Cycle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição comparativa do RNAm do gene Kiss1 e células fluorescentes do animal transgênico Kiss1-Cre.....	16
Figura 2 -	Representação esquemática do controle neuroendócrino da indução do pico do hormônio luteinizante	20
Figura 3 -	Possível interação dos neurotransmissores circadianos com o eixo HPG via neurônios Kiss1	22
Figura 4 -	Referência correspondente aos bregmas das regiões anatômicas dissecadas – núcleos AVPV/PeN e NSQ.....	28
Figura 5 -	Referência corresponde aos bregmas das regiões anatômicas dissecadas – núcleo Arc.....	29
Figura 6 -	Análise dos úteros	33
Figura 7 -	A expressão da proteína hrGFP nos núcleos anteroventral periventricular, periventricular anterior e arqueado varia conforme os níveis circulantes de hormônios gonadais	34
Figura 8 -	Padrão de distribuição de neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas no núcleo anteroventral periventricular	35
Figura 9 -	Padrão de distribuição dos neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas no núcleo arqueado	36
Figura 10 -	Gráfico de barras demonstrando a expressão do RNAm de diferentes genes na região do núcleo anteroventral periventricular e periventricular anterior	38
Figura 11 -	Gráfico de barras demonstrando a expressão do RNAm de diferentes genes na região do núcleo arqueado	39
Figura 12 -	Diagrama ilustrando as conclusões obtidas	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arc	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
AVP	Arginina vasopressina
Avpr1a	Receptor de arginina vasopressina 1a
Avpr1b	Receptor de arginina vasopressina 1b
Avpr2	Receptor de arginina vasopressina 2
cDNA	DNA complementar
E2	Estradiol
ER α	Receptor de estrógeno alfa
ER β	Receptor de estrógeno beta
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPR54	Receptor acoplado à proteína G 54
HPG	Hipotálamo-Hipófise-Gônadas
hrGFP	Proteína fluorescente verde “humanized renilla”
LH	Hormônio luteinizante
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OVX	Ovarectomizadas
OVX+E2	Ovarectomizadas tratadas com Estradiol
PeN	Núcleo periventricular anterior

Ppia	Peptidilprolil isomerase A
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
TAC3	Taquiquina 3
VIP	Poli-peptídeo intestinal vasoativo
VPAC1	Receptor de poli-peptídeo intestinal vasoativo 1
VPAC2	Receptor de poli-peptídeo intestinal vasoativo 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas	15
1.2 Kisspeptinas e o mecanismo de retroalimentação dos esteroides sexuais	15
1.3 Controle temporal do ciclo ovulatório	17
1.3.1 <i>Receptores de vasopressina e VIP</i>	21
1.3.2 <i>Possível meio de comunicação circadiana e estrogênica</i>	22
2 OBJETIVOS	24
3 METODOLOGIA	25
3.1 Animais	25
3.2 Procedimentos para a imunistoquímica fluorescente	25
3.3 Procedimentos para a coleta dos núcleos AVPV/PeN e Arc	27
3.1 Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real	30
4 RESULTADOS	33
4.1 Análise comparativa do tamanho dos úteros: controle da cirurgia	33
4.2 Expressão da proteína hrGFP e fibras vasopressinérgicas apostas a neurônios Kiss1 no AVPV/PeN e Arc	33
4.3 Expressão gênica na região dos núcleos AVPV/PeN, Arc e NSQ	37
5 DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS*	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas

O controle neuroendócrino da reprodução depende principalmente da interação dinâmica entre sinais provenientes de três fontes principais: a área preóptica, onde um grupo de neurônios sintetiza o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); a adenohipófise, onde se localizam células gonadotróficas que são estimuladas por GnRH para sintetizar e liberar gonadotrofinas hipofisárias: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH); e as gônadas, que, além da geração de gametas, respondem às ações tróficas de gonadotrofinas elevando a secreção de esteroides sexuais e hormônios. Através de uma alça de retroalimentação, o hipotálamo e a hipófise regulam a secreção de GnRH e gonadotrofinas, compondo o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) (NAVARRO, 2011). Os neurônios que sintetizam GnRH são regulados por muitos circuitos neuronais, mas um fator determinante para esta regulação é uma família de peptídeos, conhecidos como kisspeptinas, que são sintetizados sob o controle transcricional do gene *Kiss1*. O gene *Kiss1* foi descoberto em 1996 primeiramente como um gene supressor de metástase, e recebeu inicialmente o nome de metastina. Depois, em homenagem ao local onde foi descoberto: Hershey, Pensilvania onde é o produzido o famoso “Hershey chocolate Kiss”, recebeu o nome de Kiss1 (OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009).

Em 2003, três trabalhos independentes mostraram que mutações no receptor de kisspeptinas, o GPR54, ou no gene *Kiss1*, geram diversos problemas reprodutivos, tais como: hipogonadismo hipogonadotrófico, que se caracteriza principalmente como uma redução no tamanho das gônadas, ausência de puberdade e infertilidade. Esses resultados foram observados em animais e humanos. Desde então, um forte interesse foi despertado a respeito do papel das kisspeptinas no controle da função reprodutiva (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY et al., 2007; DE ROUX et al., 2003; FUNES et al., 2003; SEMINARA et al., 2003).

1.2 Kisspeptinas e o mecanismo de retroalimentação dos esteroides sexuais

Com o uso da técnica de hibridização *in situ*, e atualmente com a utilização de animais geneticamente modificados, sabe-se que existem três áreas principais, no que diz respeito à

reprodução, que contêm neurônios que expressam o RNAm do gene *Kiss1*: o núcleo anteroventral periventricular (AVPV), o núcleo periventricular anterior (PeN) - que neste trabalho serão designados em conjunto como AVPV/PeN - e o núcleo arqueado (Arc); todos localizados no hipotálamo (**Figura 1**) (CRAVO et al., 2011; GOTTSCH ML, 2004; UZ et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que outras regiões encefálicas contêm células que expressam o RNAm do gene *Kiss1*, como por exemplo, núcleo preóptico anterodorsal e o núcleo medial da amígdala (CRAVO et al., 2011; KAUFFMAN et al., 2007b).

Figura 1. Distribuição comparativa do RNAm do gene *Kiss1* e células fluorescentes do animal transgênico *Kiss1-Cre* (Cravo et al., 2011). (A, C, E, G) Fotomicrografias em campo escuro de cortes encefálicos de camundongos selvagens (fêmeas sacrificadas na fase de diestro) demonstrando a expressão do RNAm do gene *Kiss1* nos núcleos anteroventral periventricular (AVPV, A), núcleo periventricular anterior (PeN, C) e em dois níveis do núcleo arqueado (Arc, E, G). (B, D, F, H) Fotomicrografias fluorescentes de cortes encefálicos demonstrando a distribuição de neurônios *Kiss1-Cre* identificados com o anticorpo que reconhece a galactosidase pelo método de imunistoquímica (*Kiss1-Cre/gal-ir*) no AVPV (B), PeN (D) e em dois níveis do Arc (F, H). 3V: terceiro ventrículo. Escala: 400 μ M.

Os mecanismos de ação dos hormônios esteroides no eixo HPG são principalmente inibitórios (mecanismo de retroalimentação negativo); entretanto, em fêmeas adultas, o aumento do estrógeno no dia do proestro (fase do ciclo reprodutivo dos roedores) induz um pico de

secreção do hormônio GnRH e consequentemente de gonadotrofinas (mecanismo de retroalimentação positivo) (HERBISON, 2008). Os estrógenos sintetizados pelos ovários, ou que podem ser produzidos localmente pela aromatização da testosterona, tem função essencial principalmente através da sinalização no receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), reconhecido por mediar o mecanismo de retroalimentação positivo no dia do proestro (WINTERMANTEL et al., 2006).

Neurônios GnRH não expressam o $ER\alpha$, entretanto, virtualmente todos os neurônios Kiss1 expressam este receptor. Evidências indicam que as populações rostrais e caudais de neurônios Kiss1 participam da modulação do eixo HPG de forma específica: os neurônios Kiss1 do AVPV/PeN tem papel dominante no mecanismo de retroalimentação positivo e, portanto, são essenciais para a indução do pico de secreção de gonadotrofinas e da ovulação, enquanto que, os neurônios Kiss1 do Arc participariam da modulação do mecanismo de retroalimentação negativo durante a maior parte do ciclo estral (COLLEDGE, 2010; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; HERBISON, 2008; OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009; ROA et al., 2008).

1.3 Controle temporal do ciclo ovulatório

O estrógeno é um pré-requisito fundamental para que a ovulação ocorra, entretanto não é o único. A ovulação é um mecanismo complexo que exige a interação entre sinais periféricos e centrais para que ocorra. Nos roedores, o pico de secreção de LH ocorre somente no final da tarde do proestro e, portanto, parece ser modulado também por informações circadianas (DE LA IGLESIA; SCHWARTZ, 2006). O hipotálamo contém diversos núcleos que estão envolvidos na regulação endócrina, e muitos destes núcleos exibem ritmos circadianos na síntese e liberação de hormônios. O núcleo supraquiasmático (NSQ) está no topo dessa hierarquia, e é considerado o regulador circadiano central dos mamíferos - o relógio biológico (KWON et al., 2011).

Se os níveis circulantes de estradiol forem suficientes para induzir a liberação de GnRH, ainda assim ela só ocorrerá diante de um sinal temporal, possivelmente proveniente do NSQ. Essa pista temporal do NSQ é disponibilizada diariamente, como é demonstrado pelo fato de que o tratamento crônico com estradiol, tanto em ratos como em camundongos, estimula picos de LH diários apenas no período que precede o início da fase de escuro (CHRISTIAN; MOBLEY; MOENTER, 2005; DE LA IGLESIA; SCHWARTZ, 2006). Sendo assim, esse sinal diário é

restrito a uma estreita janela de tempo: uma fêmea camundongo tratada com pentobarbital no período da tarde, mas não no período da manhã do proestro apresenta um atraso no pico de LH e consequentemente na ovulação. De outro modo, se o NSQ for lesionado uma aciclicidade estral se torna evidente, sugerindo que o NSQ também desempenha um papel crucial na função reprodutiva (BROWN-GRANT; RAISMAN, 1977; WIEGAND; TERASAWA, 1982).

Funcionalmente, o NSQ está dividido em duas partes: uma região ventrolateral denominada “core”, e uma região dorsomedial conhecida como “shell”. Os neurônios da região ventrolateral recebem informações sobre o ciclo claro/escuro através do trato retino-hipotalâmico; e esses neurônios da região ventrolateral se projetam para a região dorsomedial. Essas duas regiões são caracterizadas por suas populações neuroquímicas predominantes, conhecidas por sintetizarem os principais neurotransmissores do NSQ (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; CANTERAS et al., 2011). Além disso, também se caracterizam pela expressão diferencial de genes do relógio (MILLER et al., 2006). Na região ventrolateral, o principal neuropeptídeo sintetizado é o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), e na região dorsomedial, o principal neuropeptídeo é a vasopressina (MOORE; SPEH; LEAK, 2002). Esses dois neuropeptídeos, VIP e vasopressina, são essenciais para os ritmos biológicos de muitos processos fisiológicos, tanto centrais como periféricos (LOWREY; TAKAHASHI, 2004).

A identidade neuroquímica do sinal circadiano que estimula o pico de LH ainda é desconhecida. Porém, há indicações de que a vasopressina e o VIP podem estar envolvidos nesse mecanismo (KALSBECK; BUIJS, 2002; VAN DER BEEK et al., 1997). Neurônios que sintetizam VIP, por exemplo, possuem conexões diretas com neurônios GnRH, os quais expressam o receptor VPAC2 (HORVATH; CELA; VAN DER BEEK, 1998; SMITH; JIENNES; WISE, 2000; VAN DER BEEK et al., 1997). Neurônios GnRH inervados por VIP apresentam um aumento da expressão do marcador de ativação neuronal, c-FOS, que coincide com o período do pico de secreção do LH. Além do mais, se o receptor VPAC2 for bloqueado, ocorre uma queda na taxa de disparo neuronal de neurônios GnRH na tarde do pico de secreção do LH; esses dados que sugerem uma possível participação desse peptídeo no controle do ciclo ovulatório (CHRISTIAN; MOENTER, 2008; VAN DER BEEK et al., 1994).

Outras evidências sugerem que a vasopressina exerce efeito estimulatório na indução do pico de secreção do LH: quando administrada diretamente na área medial pré-óptica aumenta o pico de secreção do LH em animais tratados com E2 (PALM et al., 2001), sendo o mesmo efeito

observado em animais com o NSQ lesionado (PALM et al., 1999); quando antagonistas da vasopressina são administrados via intracerebroventricular, o pico de secreção de LH é atenuado (FUNABASHI; TOSHIYA et al., 2000); a administração *in vitro* de vasopressina aumenta a liberação de GnRH da área medial pré-óptica, sendo que, em cultura associada de NSQ e área medial pré-óptica, o ritmo de secreção de LH ocorre de forma sincronizada com o da vasopressina somente na presença de E2 (FUNABASHI; TOSHIYA et al., 2000). Além desses relatos, sabe-se que a expressão da vasopressina é regulada por genes do relógio: *Clock* e *Bmal1* (GRACE; FINK; QUINN, 1999; LOWREY; TAKAHASHI, 2004; MUÑOZ; BREWER; BALER, 2002), e fêmeas com uma mutação no gene *Clock* (*Clock/Clock*) apresentam ciclo estral irregular, falhas no pico de secreção do LH e uma redução na expressão do RNAm que codifica a própria vasopressina e também do RNAm que codifica o receptor de vasopressina do subtipo 1a (*Avpr1a*) (MILLER et al., 2004, 2006).

Fibras vasopressinérgicas do NSQ se projetam para diversas áreas hipotalâmicas, como por exemplo, núcleo paraventricular, área preóptica, AVPV/PeN, dentre outras (DAI et al., 1998; KALSBECK et al., 2008). Sendo assim, outra forma pela qual o NSQ poderia regular o eixo HPG seria através de uma via indireta representada por fibras vasopressinérgicas que inervam neurônios contendo receptores de $ER\alpha$ no núcleo AVPV/PeN que, por sua vez, se projetam para neurônios GnRH (**Figura 2**) (DE LA IGLESIA; BLAUSTEIN; BITTMAN, 1995; VIDA et al., 2010). O núcleo AVPV/PeN expressa os receptores dos principais peptídeos sintetizados pelo NSQ, vasopressina e VIP, e sabe-se que a expressão do receptor *Avpr1a* aumenta de forma significativa no AVPV/PeN de ratos tratados com E2 (KALAMATIANOS et al., 2004b; KALLÓ et al., 2004). Além disso, o pico de expressão da vasopressina no NSQ ocorre no final da tarde, próximo ao período em que ocorre o pico de LH (KRAJNAK et al., 1998).

Figura 2. Representação esquemática do controle neuroendócrino da indução do pico do hormônio luteinizante (Modificado de: de la Iglesia e Schwartz, 2006). Quando os níveis circulantes de estrógeno estão elevados, ocorre um pico de liberação do hormônio GnRH que, por sua vez, induz um pico de liberação do hormônio luteinizante (LH). O efeito do mecanismo de retroalimentação positivo é modulado por neurônios que expressam o $ER\alpha$ que se projetam de forma direta ou indireta para neurônios GnRH. Neurônios do núcleo supraquiasmático projetam-se tanto para neurônios GnRH como para neurônios que expressam o $ER\alpha$ por vias diretas e indiretas, e recebe projeções dos neurônios que expressam o $ER\alpha$ localizados no AVPV/PeN, além de outras regiões. Pelo menos parte das projeções eferentes do NSQ para os neurônios GnRH ou para neurônios que expressam o $ER\alpha$ contém o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a vasopressina (AVP).

1.3.1 Receptores de vasopressina e VIP

A vasopressina é um nonapeptídeo produzido por núcleos hipotalâmicos, e atua como hormônio ou como neuromodulador. A vasopressina exerce seus efeitos por meio de três subtipos de receptores: Avpr1a, Avpr1b e o Avpr2. Os três tipos são encontrados em células periféricas, mas no encéfalo predomina o subtipo Avpr1a (BARBERIS, 1996; RAGGENBASS, 2008); apesar de que, alguns trabalhos tem relatado a presença do Avpr1b em estruturas do sistema nervoso central (HERNANDO et al., 2001; YOUNG et al., 2006).

Os receptores Avpr1a, Avpr1b e Avpr2 pertencem a classe de receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCR), mas diferem em função e mecanismo de transdução. O Avpr1a, por exemplo, quando ativado, aciona uma via de sinalização via fosfolipase C. A fosfolipase C libera dois fragmentos: 1,4,5 fosfatidilinositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG), que atuam como segundos mensageiros. O IP3 liga-se a receptores do retículo endoplasmático estimulando a liberação de cálcio intracelular. O Avpr1b desencadeia o mesmo mecanismo de sinalização intracelular descrito para o Avpr1a. A ligação de vasopressina ao Avpr2, por outro lado, ativa o sistema da adenililciclase que resulta no aumento dos níveis citosólicos de adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMP cíclico) que, como segundo mensageiro, ativa a proteína quinase A que fosforila a aquaporina 2 localizada em vesículas intracelulares (RAGGENBASS, 2008).

Em relação ao VIP, dois subtipos de receptores foram descritos: VPCA1 e VPAC2. Estes receptores também pertencem à família de receptores de membranas acoplados à proteína G. O RNAm que codifica o receptor VPAC1 foi detectado nos seguintes tecidos: pulmão, fígado e intestino, e no cérebro foi localizado na região do córtex e hipocampo; e o receptor VPAC2 já foi descrito em bulbo olfatório, área preóptica, e diversas outras área onde o VIP atua. (ISHIHARA et al., 1992; LUTZ et al., 1993). A ativação dos receptores VPAC1 e VPAC2 ativa uma via de sinalização que desencadeia a produção de AMP cíclico, que atua como segundo mensageiro, e de cálcio (DICKSON et al., 2006).

1.3.2 Possível meio de comunicação circadiana e estrogênica

Os neurônios Kiss1 localizados no AVPV/PeN já são reconhecidos como essenciais na indução do pico de LH por mediarem as ações do estradiol; também tem sido sugeridos como possível centro de convergência para o sinal circadiano e os níveis estrôgenicos (**Figura 3**) (SMARR; MORRIS; DE LA IGLESIA, 2012; VIDA et al., 2010). Primeiro porque possuem receptores de ER α e tem a expressão do RNAm que codifica as kisspeptinas aumentada em resposta ao E2; e segundo porque os neurônios Kiss1 do AVPV/PeN recebem projeções diretas de neurônios vasopressinérgicos do NSQ, através dos quais poderia receber a informação circadiana; sendo que, o mesmo padrão de projeções não foi observado com relação às células que produzem VIP (VIDA et al., 2010).

Figura 3: Possível interação dos neurotransmissores circadianos com o eixo HPG via neurônios Kiss1. Essa imagem ilustra o meio pelo qual os neurotransmissores do núcleo supraquiasmático, vasopressina e VIP poderiam atuar no controle do eixo HPG por meio do núcleo anteroventral periventricular que contém os neurônios Kiss1, importantes para o mecanismo de retroalimentação positiva do estradiol.

Nesse caso, tendo em vista o papel dos neurônios Kiss1 na reprodução e o seu possível envolvimento com o mecanismo circadiano que regula a ovulação, e levando em consideração que os principais neuropeptídeos do NSQ parecem agir sobre os circuitos que regulam o eixo HPG, o objetivo geral desse trabalho foi analisar a correlação entre os neuropeptídeos vasopressina e VIP, bem como seus receptores e os neurônios Kiss1 nesse mecanismo dinâmico no qual interage a informação circadiana e a estrogênica para induzir o pico de LH que precede a ovulação.

2 OBJETIVOS

1. Determinar o percentual de posições entre neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas;
2. Determinar se os níveis circulantes de estradiol afetam o padrão de distribuição das fibras vasopressinérgicas em relação aos neurônios Kiss1;
3. Determinar se os núcleos AVPV/PeN e Arc expressam os receptores Avpr1a, Avpr1b e Avpr2, VPAC1 e VPAC2, assim como vasopressina e VIP; e
4. Analisar se os níveis circulantes de estradiol afetam a expressão dos genes Avpr1a, Avpr1b, Avpr2, vasopressina e VIP nos núcleos AVPV/PeN e Arc.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para realização deste estudo foram utilizados camundongos (fêmeas) geneticamente modificados nos quais a proteína fluorescente verde “humanized renilla” (hrGFP) é expressa sob o controle transcricional do gene *Kiss1* (Kiss1/hrGFP) (CRAVO, 2011, 2013; FRAZÃO et al., 2013). Também utilizamos camundongos (fêmeas) C57BL6 fornecidos pelo biotério do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os animais foram mantidos no biotério com um ciclo diário de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, e acesso livre à água e ração. O ciclo estral das fêmeas adultas, Kiss1/hrGFP e C57BL6, foi acompanhado por um período de 15 dias, sendo a coleta da secreção vaginal realizada diariamente no período da tarde, entre 14:00-16:00. A secreção vaginal foi coletada por meio de uma pipeta contendo solução salina que foi introduzida de forma delicada e apropriada para lavar a vagina de cada fêmea; o produto coletado foi visualizado com uso de microscópio para identificar a morfologia celular que é característica em cada fase do ciclo estral, o qual é dividido em quatro etapas: Proestro - fase em que predominam células epiteliais nucleadas; Estro - caracterizado por células epiteliais cornificadas; Metestro - fase de transição entre o estro e o diestro, onde três tipos celulares são visualizados: células epiteliais nucleadas, células epiteliais cornificadas e leucócitos; e Diestro - fase caracterizada pela presença de muitos leucócitos (CALIGIONI, 2009). Apenas as fêmeas com ciclo estral regular foram selecionadas para compor os grupos experimentais.

3.2 Procedimentos para a imunoistoquímica fluorescente

As fêmeas Kiss1/hrGFP (10-12 semanas de idade) foram divididas em três grupos: **Grupo I- Diestro**, **Grupo II- Ovariectomizadas (OVX)** e **Grupo III- Ovariectomizadas + Estradiol (OVX + E2)**. No **Grupo I** as fêmeas Kiss1/hrGFP foram sacrificadas quando estavam no segundo dia consecutivo da fase de diestro (n= 9). No **Grupo II** as fêmeas Kiss1/hrGFP foram submetidas a cirurgia para remoção dos ovários; passados 10 dias da cirurgia os animais foram submetidos ao procedimento de perfusão transcardíaca e posterior coleta de tecidos (n=9). No **grupo III** as fêmeas Kiss1/hrGFP foram ovariectomizadas e subsequentemente receberam

implante de cânula preenchida com E2. As cânulas contendo E2 foram preparadas quatro dias antes da cirurgia para o implante. Para o preparo da cânula, um tubo de material plástico específico (Dow Corning) foi cortado no tamanho de 1,8 cm e teve uma de suas extremidades selada com silicone; no segundo dia, as cânulas foram preenchidas com E2 previamente diluído em óleo de sésamo (Sigma), sendo que o conteúdo da cânula apresentava concentração de 1.0 µg; no terceiro dia, as cânulas foram lavadas e mantidas em solução salina por um período mínimo de 12 horas, após este período as cânulas foram implantadas via subcutânea na região dorsal do animal logo após a remoção dos ovários (CHRISTIAN; MOBLEY; MOENTER, 2005; FRAZÃO et al., 2013, 2014). As fêmeas OVX+E2 foram sacrificadas no terceiro dia após o procedimento cirúrgico e implante da cânula (n=6).

Todos os animais foram manipulados e/ou sacrificados no período da tarde, entre 14:00-17:00. No dia do sacrifício os animais foram apropriadamente anestesiados e, após confirmação da anestesia, submetidos à perfusão transcardíaca. Os tecidos coletados para análise (encéfalo e útero) foram fixados com paraformaldeído 4% (pH 7,4). Os úteros foram mantidos em paraformaldeído a 4% por 7 dias. Após esse período os úteros foram pesados para análise comparativa entre os grupos. Os encéfalos foram removidos e fixados em solução de paraformaldeído a 4% com sacarose a 20% por aproximadamente 12 horas, na sequência foram transferidos para solução contendo tampão fosfato de sódio e potássio a 0,02 M (KPBS 0,02 M) e sacarose a 20% por cerca de 24 horas. Os encéfalos foram posteriormente seccionados em cortes coronais de 30 µm e coletados de forma a possuírmos quatro séries representativas.

Para determinarmos o percentual de aposições entre neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas, e se os níveis circulantes de E2 afetam este percentual de aposições (objetivos 1 e 2), uma das séries de cortes encefálicos de cada animal foi submetida à técnica de imunoistoquímica fluorescente. Os cortes foram lavados em tampão KPBS 0,02 M, incubados em solução contendo KPBS 0,02 M mais Triton-X (KPBS+T) e soro normal (Donkey) a 3%. Em seguida, foram incubados em solução composta por KPBS 0,02 M, sódio ázida a 0,02%, soro normal a 3% e anticorpo primário contra vasopressina (anti-vasopressina, Millipore, 1:1000). No segundo dia de incubação, os cortes foram lavados em KPBS 0,02 M e mantidos em solução contendo KPBS+T e anticorpo secundário que reconhece o epítipo do anticorpo primário (Rodamina, Jackson laboratories, 1:1000) por 90 minutos. Após este período, os cortes foram novamente lavados em KPBS 0,02 M e na sequência montados em lâminas gelatinizadas. Os neurônios Kiss1 foram identificados pela expressão da fluorescência endógena (hrGFP) e as

fibras vasopressinérgicas através da fluorescência vermelha emitida pela rodamina. A análise dos núcleos foi feita em microscópio fluorescente (Nikon Eclipse 80i).

3.3 Procedimentos para a coleta dos núcleos AVPV/PeN e Arc

As fêmeas C57BL6 (10-12 semanas de idade) também foram divididas nos grupos: **I Diestro**, **II OVX** e **III OVX + E2**. No **Grupo I** as fêmeas foram sacrificadas quando estavam no segundo dia consecutivo da fase de diestro (n= 6). No **Grupo II** as fêmeas foram submetidas à cirurgia para remoção dos ovários; passados 10 dias da cirurgia os animais foram sacrificados para coleta do hipotálamo (n=5). No **grupo III** as fêmeas foram ovariectomizadas e subsequentemente receberam implante de cânula preenchida com E2. As fêmeas OVX+E2 foram sacrificadas no terceiro dia após o procedimento cirúrgico e implante da cânula (n=7). No dia do sacrifício os animais foram apropriadamente anestesiados e, após confirmação da anestesia, submetidos à decapitação seguida por coleta do encéfalo. O encéfalo coletado foi imediatamente transferido para um meio contendo ACSF (Artificial Cerebro-Spinal Fluid; composição: 126 mM de NaCl, 2,8 mM de KCl, 1,2 mM de MgCl₂, 2,5 mM de CaCl₂, 1,25 mM de NaH₂PO₄, 26 mM de NaHCO₃ e 5 mM de glucose, pH 7,4, resfriado e oxigenado - 95% O₂ e 5% CO₂). Com uso de um vibrátomo (Leica) foram realizados cortes coronais para coleta de 1 corte com 350 µm de espessura para imediato recorte e coleta da região do AVPV/PeN e, 2 cortes com 500 µm de espessura para imediato recorte e coleta do núcleo Arc. Os cortes foram transferidos para placa de petri contendo ACSF na qual as regiões de interesse foram rapidamente dissecadas e coletadas em tubo eppendorf que foi transferido e mantido em gelo seco. Posteriormente o material coletado foi armazenado em freezer -80°C para preservação do tecido. Realizamos ainda a coleta, conforme descrito, do NSQ de fêmeas em diestro (n=5). Este tecido serviu como controle positivo para análise de alguns dos genes de interesse. No caso do NSQ, coletamos a região correspondente ao mesmo a partir de 1 corte de 500 µm de espessura. A definição da espessura dos cortes e coleta dos núcleos foi feita com base nas coordenadas do Atlas de Camundongo “The Mouse Brain” (PAXINOS e FRANKLIN), sendo que para cada núcleo foram utilizados como base os seguintes bregmas: AVPV/PeN: 0.38 mm a 0.02 mm; NSQ: -0.34 mm a -0.82 mm; Arc: -1.22 mm a -1.94 mm. Também usamos como auxílio as pistas anatômicas que caracterizam esses núcleos (**Figuras 4 e 5**).

Figura 4. Referência correspondente aos bregmas das regiões anômicas dissecadas. Imagens do Atlas “The Mouse Brain” representando (através do destaque vermelho) as regiões dissecadas para obtenção do material utilizado na técnica de Rt-PCR. **A** – Núcleo anteroventral periventricular (AVPV/PeN); **B** – Núcleo supraquiasmático (NSQ).

Figura 5. Referência correspondente aos bregmas das regiões anômicas dissecadas. Imagens do Atlas “The Mouse Brain” representando (através do destaque vermelho) as regiões dissecadas para obtenção do material utilizado na técnica de Rt-PCR. **A e B:** dois níveis do núcleo arqueado (Arc).

3.1 Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativo em Tempo Real

Para determinarmos se os núcleos AVPV/PeN e Arc expressam os receptores através dos quais a vasopressina e, ou o VIP exercem seus efeitos, assim como, verificarmos se os níveis circulantes de E2 afetam o padrão de expressão do RNAm que codifica a expressão destes receptores (objetivos 2 e 3), o material coletado foi submetido a extração do RNA para análises posteriores por meio da reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Além disto, foi feita a análise da expressão dos genes considerados controle como, por exemplo, *Kiss1* que comprovaria a eficácia das cirurgias realizadas.

As amostras coletadas foram submetidas ao protocolo de extração de RNA com a utilização do Kit PicoPure (Applied Biosystems). Em cada amostra foi adicionado 100 µL do tampão de extração (Extraction Buffer), 250 µL de Condiotining Buffer, 100 µL de etanol 70%, 100 µL de Wash Buffer 1, 100 µL de Wash Buffer 2 e 11 µL de Elution Buffer. Após a extração, o RNA foi quantificado por meio de um espectrofotômetro de massa (EPOCH).

Na sequência foi utilizado um protocolo para geração do DNA complementar (cDNA) de cada amostra. A quantidade de RNA total de cada amostra utilizada para produzir o cDNA foi padronizada da seguinte forma: para as regiões AVPV/PeN e NSQ, o total de RNA gerado foi calculado para a concentração de 500 ng/µL. Para a região do Arc, o RNA total foi calculado para a concentração de 1000 ng/µL. O cDNA foi gerado com a utilização do kit *SuperScript III First-StrandSynthesis System* para qRT-PCR (Invitrogen). Para cada amostra (quantidade da amostra baseada no cálculo do RNA total para cada concentração), foi utilizado 1 µL de random primers (Roche Applied Science), 1 µL do mix de desoxirribonucleotídios fosfatados (dNTP) a 10 mM, água com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), 4 µL de 5x First Strand Buffer, 2 µL de ditiotretitol (DTT) a 0,1 M, 1 µL de RNase OUT e 1 µL da enzima Super Script II RT.

O cDna produzido foi utilizado para identificação do padrão de expressão dos genes *Avpr1a*, *Avpr1b*, *Avpr2* e vasopressina (AVP). Além desses, outros genes foram analisados: *Kiss1*, *Prodinorfina (Pdyn)*, *Tac3*, *VIP*, *VPAC1* e *VPAC2*. O cDNA produzido a partir do NSQ foi utilizado como controle positivo para identificação da expressão dos genes *AVP*, *Avpr1a*, *Avpr1b*, *Avpr2*, *VIP*, *VPAC1* e *VPAC2*. O cDNA de cada amostra foi utilizado para determinação dos genes *βactina*, *GAPDH* e *pPia*, que foram utilizados como referência. Os primers para identificação dos genes *Avpr1a*, *Avpr1b* e *Avpr2* foram adquiridos da empresa Life Technologies,

os demais foram adquiridos da empresa Exxtend. As sequências de primers sense e anti-sense foram determinadas com base na literatura (**Tabela 1**).

Para os genes *Avpr1a*, *Avpr1b* e *Avpr2* foi realizada a amplificação por qRT-PCR com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) a partir do cDNA obtido de cada amostra. Para cada 1,5 µL de cDNA de cada amostra foi utilizado 4,4 µL de água DEPC, 0,35 µL do primer específico para cada gene, e 6,25 µL da enzima Taqman.

Para os genes *βactina*, *GAPDH*, *pPia*, *Kiss1*, *Pdyn*, *Tac3*, *AVP*, *VIP*, *VPAC1* e *VPAC2* foi utilizado o reagente SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Para estes genes, em cada 1,5 µL de cDNA de cada amostra foi adicionado 3,25 µL de água DEPC, 1,5 µL de primer e 6,25 µL da enzima SYBR Green. As amostras foram preparadas em duplicatas e pipetadas em uma placa de 96 poços própria para PCR (MicroAmp, Applied Biosystems). Essa placa foi inserida numa máquina de qRT-PCR (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) na qual as amostras passam por ciclos compostos basicamente por três fases: desnaturação, anelamento e amplificação (Temperatura ótima para a enzima Taqman e SYBR Green: 72-74 °C). Os primers utilizados se ligam em regiões complementares que são replicadas durante as fases de amplificação de cada ciclo.

A qRT-PCR faz a quantificação dos ácidos nucleicos de cada amostra durante a fase exponencial da reação. O ciclo em que a reação atinge o limiar da fase exponencial é chamado de Cycle threshold (Ct). Os valores gerados pelo Ct foram utilizados para quantificar e comparar a expressão de cada gene por amostra e por região. A quantificação relativa de RNAm foi calculada pelo algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados foram normalizados pela média geométrica de *GAPDH* e *βactina*, e são apresentados como mudanças em comparação com os valores obtidos no grupo em diestro (fixado em 1,0).

A análise estatística dos dados foi feita com o software GraphPad Prism. Os testes estatísticos aplicados foram ANOVA e Test t de Student. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

Tabela 1. Sequência e referência dos primers utilizados.

Gene	Primers (5' a 3')
Actb-SqPCR	CCTCTGAACCCTAAGGCCAA
Actb-ASqPCR	AGCCTGGATGGCTACGTACA
GADPH-SqPCR	GGGCAGCCCAGAACATCAT
GADPH-ASqPCR	CCGTTCAGCTCTGGGATGAC
Ppia-SqPCR	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGT
Ppia-ASqPCR	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
Kiss1-SqPCR	GGCAAAAGTGAAGCCTGGAT
Kiss1-ASqPCR	GATTCCTTTTCCCAGGCATT
Pdyn – SqPCR	CCTGTCCTTGTGTTCCCTGT
Pdyn – ASqPCR	AGAGGCAGTCAGGGTGAGAA
Tac3 – SqPCR	CCGCTCCATCTCTCTGGAAG
Tac3 - ASqPCR	TGCATGTCACGTTTCTGTGG
VIP-SqPCR	TTGGCAAACGAATCAGCAGTAG
VIP-ASqPCR	ATTTGCTTTCTAAGGCGGGTGTA
VPAC1-SqPCR	CGGCCACCCGACATTGGGAAG
VPAC1-ASqPCR	CTGCATGTGGCGCCGTTGCTG
VPAC2-SqPCR	AATGACCAGTCACAGTACAAGA
VPAC2-ASqPCR	TCACACTGTACCTCACTGTTCA
AVP-SqPCR	TCGCCAGGATGCTCAACAC
AVP-ASqPCR	TTGGTCCGAAGCAGCGTC
Avpr1a	Mm00444092_m1
Avpr1b	Mm01700416_m1
Avpr2	Mm01193534-g1

4 RESULTADOS

4.1 Análise comparativa do tamanho dos úteros: controle da cirurgia

Para confirmar a eficácia do procedimento cirúrgico, um dos primeiros parâmetros analisado foi o tamanho dos úteros. A análise dos úteros das fêmeas demonstrou que as cirurgias realizadas, bem como a reposição de E2 foram eficientes. Como esperado, o útero de fêmeas em diestro (n=4) e de fêmeas OVX (n=6) apresentaram peso significativamente menor em comparação com o útero de fêmeas OVX+E2 (n=4, **Figura 6**).

Figura 6. Análise dos úteros. Comparação do peso (g) dos úteros coletados de fêmeas na fase de diestro, fêmeas ovariectomizadas (OVX) e fêmeas ovariectomizadas que receberam implante de cânula contendo E2 (OVX + E2). Os resultados são demonstrados como média ± EP*** $P < 0.001$.

4.2 Expressão da proteína hrGFP e fibras vasopressinérgicas apostas a neurônios Kiss1 no AVPV/PeN e Arc

Como esperado, o número de neurônios que expressaram a proteína hrGFP sob o controle transcricional do gene *Kiss1* foi, de forma significativa, menor nos núcleos AVPV/PeN de fêmeas submetidas a ovariectomia (OVX), em comparação a fêmeas em diestro ou fêmeas que foram ovariectomizadas e receberam reposição de estradiol (OVX+E2, $P < 0,0001$) (**Figura 7A; 8A, D e G**). Ao analisar o percentual de neurônios Kiss1 (identificados pela proteína hrGFP) que estão em aposição com fibras vasopressinérgicas observamos que, no AVPV/PeN o percentual de aposição em fêmeas OVX foi menor em comparação a fêmeas em diestro e/ou fêmeas OVX+E2 (**Figura 7B**, $P < 0,05$).

Em relação ao núcleo Arc, observamos um aumento significativo do número de neurônios que expressam a proteína hrGFP em fêmeas OVX em comparação a fêmeas em diestro ou fêmeas OVX+E2 ($P<0,05$) (**Figura 7C; 8A, D, G**). Sendo que, apenas em fêmeas em diestro foi observado um baixo percentual de aposições entre neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas (**Figura 7D**). Vimos que neste núcleo as fibras vasopressinérgicas estão dispostas principalmente na região tuberal do hipotálamo (**Figura 9B, E e H**).

É importante ressaltar que em ambos os núcleos estudados não houve variação aparente com relação à quantidade de fibras vasopressinérgicas quando comparamos as três situações: diestro, OVX e OVX + E2 (**Figura 7, 8 e 9**).

Figura 7. Expressão da proteína hrGFP nos núcleos anteroventral periventricular, periventricular anterior e arqueado. Gráficos de barra demonstrando o número de neurônios que expressaram a proteína hrGFP sob o controle transcricional do gene *Kiss1* em diferentes condições experimentais. (A) A análise dos núcleos anteroventral periventricular, periventricular anterior (AVPV/PeN) e (C) arqueado (Arc) foi realizada nos tecidos coletados de fêmeas em diestro, fêmeas submetidas a ovariectomia (OVX) e fêmeas submetidas a ovariectomia que receberam reposição de estradiol (OVX+E2). Notar que o percentual de aposição entre fibras vasopressinérgicas e neurônios hrGFP no AVPV/PeN acompanha a variação do número de neurônios em cada condição experimental (B). Um percentual baixo de fibras vasopressinérgicas está relacionado aos neurônios hrGFP no Arc apenas em fêmeas em diestro (D). Média $\pm$ E.P., * $P<0,05$, ** $P=0,006$, *** $P<0,0001$.

Figura 8. Padrão de distribuição de neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas no núcleo anteroventral periventricular (AVPV). A, D e G: Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a expressão da proteína hrGFP no AVPV de fêmeas em diestro (A), ovariectomizadas (OVX, D) e ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E2, G). B, E e H: Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a disposição de fibras vasopressinérgicas no AVPV de fêmeas em diestro (B), OVX (E) e OVX+E2 (H). C, F e I: sobreposição de fibras vasopressinérgicas e neurônios Kiss1, identificados pela proteína hrGFP, no AVPV dos grupos analisados (C, F, I). 3V: terceiro ventrículo; VP (vasopressina). Escala: 100 μ M.

Figura 9. Padrão de distribuição dos neurônios Kiss1 e fibras vasopressinérgicas no núcleo arqueado (Arc). Em fluorescência demonstrando a expressão da proteína hrGFP no Arc de fêmeas em diestro (**A**), ovariectomizadas (OVX, **D**) e ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E2, **G**). **B, E e H:** Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a disposição de fibras vasopressinérgicas no Arc de fêmeas em diestro (**B**), OVX (**E**) e OVX+E2 (**H**). **C, F e I:** sobreposição de fibras vasopressinérgicas e neurônios Kiss1 no Arc dos grupos analisados (**C, F, I**). 3V: terceiro ventrículo; VP (vasopressina). Escala: 100 μ M.

4.3 Expressão gênica na região dos núcleos AVPV/PeN, Arc e NSQ

A expressão do gene *Kiss1* na região do AVPV/PeN e Arc variou de acordo com as descrições da literatura. Observamos que a expressão deste gene aumentou de forma significativa no AVPV/PeN na análise do material obtido de fêmeas OVX+E2 em comparação ao material de fêmeas em DII ou fêmeas OVX (**Figura 10**). O Efeito oposto foi observado no Arc (**Figura 11**). Além disto, no núcleo Arc, a expressão dos genes que codificam a prodinorfina (*Pdyn*) e a neuroquinina B (*Tac3*) aumentou significativamente no grupo OVX em relação ao material obtido no grupo que recebeu reposição de E2 (**Figura 11**).

No núcleo AVPV/PeN não foram observadas diferenças significativas em relação a expressão dos genes que codificam a expressão do *Avpr1a* ou da vasopressina. Os genes *Avpr1b* e *Avpr2* não foram detectados nesta área. Como controle positivo desta expressão, realizamos a análise destes genes no NSQ, sendo o valor médio do Ct referente ao *Avpr1a* de 29,7 e da vasopressina de 22,09. O RNAm que codifica a expressão dos genes *Avpr1b* e *Avpr2* não foi determinado no NSQ.

Em relação ao gene que codifica o neuropeptídeo VIP no AVPV/PeN, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Notamos que o quadro de OVX induziu o aumento significativo da expressão dos genes *VPAC1* e *VPAC2* em comparação ao grupo DII e OVX+E2 (**Figura 10**). Na região do NSQ, o valor médio do Ct referente ao gene que codifica a expressão do VIP foi de 22,7; *VPAC1*: 32,04 e do *VPAC2*: 26,2.

Figura 10. Gráfico de barras demonstrando a expressão do RNAm de diferentes genes na região do núcleo anteroventral periventricular e periventricular anterior . Gráfico de barras demonstrando a expressão gênica correspondente ao núcleo anteroventral periventricular e núcleo periventricular anterior (AVPV/PeN) após análise (Ct) do material obtido de fêmeas em diestro (DII), fêmeas submetidas a ovariectomia (OVX) e, fêmeas submetidas a ovariectomia que receberam reposição de estradiol (OVX+E2). Média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$. N.D: Não determinado.

Em relação ao Arc não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene que codifica a vasopressina. Entretanto, notamos que a reposição de E2 induziu aumento significativo do gene que codifica a expressão do *Avpr1a* em comparação ao grupo DII e OVX. De forma similar ao descrito para os núcleos AVPV/PeN e NSQ a expressão dos genes *Avpr1b* e *Avpr2* não foi detectada na área correspondente ao núcleo Arc. Em relação ao VIP, os diferentes níveis circulantes de E2 (verificados pelo tamanho uterino no momento do sacrifício do animal para coleta das áreas específicas) não induziu alteração na expressão dos genes que codificam o VIP ou os seus receptores: VPAC1 e VPAC2 (**Figura 11**).

Figura 11. Gráfico de barras demonstrando a expressão do RNAm de diferentes genes no núcleo arqueado. Gráfico de barras demonstrando a expressão gênica correspondente ao núcleo arqueado (Arc) após análise (Ct) do material obtido de fêmeas em diestro (DII), fêmeas submetidas a ovariectomia (OVX) e, fêmeas submetidas a ovariectomia que receberam reposição de estradiol (OVX+E2). Média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$. N.D: Não determinado.

5 DISCUSSÃO

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar se as populações de neurônios Kiss1 do AVPV/PeN e Arc, essenciais para a reprodução, apresentavam contato aparente com fibras de vasopressina, e verificar o padrão de expressão dos principais receptores de vasopressina e VIP nessas duas regiões, as quais podem ter uma participação importante no mecanismo circadiano que sincroniza os eventos que antecedem a ovulação. O modelo transgênico utilizado para responder parte das questões desse trabalho foi importado e mantido no nosso biotério para acasalamento e procriação. E foi interessante notar que, assim como a expressão da proteína hrGFP, que identifica os neurônios Kiss1, o RNAm do gene Kiss1 também variou como esperado com a utilização da técnica de qRT-PCR. Da mesma forma, a imunoistoquímica fluorescente nos permitiu estudar as fibras vasopressinérgicas apostas a neurônios Kiss1, que observamos principalmente na região do AVPV/PeN independente dos níveis de estradiol. Os genes que codificam os principais receptores dos neuropeptídeos implicados no mecanismo circadiano foram mais expressos quando o gene Kiss1 foi menos ativado: a expressão de VPAC1 e VPAC2 foi maior no AVPV/PeN das fêmeas OVX e a expressão do *Avpr1a* foi maior no Arc das fêmeas tratadas com E2.

Para estudar parte dos objetivos propostos, nós utilizamos um modelo de camundongo transgênico que expressa a proteína fluorescente verde (hrGFP) toda vez que o gene *Kiss1* é expresso. A identificação dos neurônios Kiss1 como fatores essenciais para a reprodução despertou grande interesse para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitassem seu estudo. Variações do gene *Kiss1*, como a que ocorre por mudanças dos níveis circulantes de estradiol podem, portanto, serem acompanhadas sem a necessidade de técnicas como a imunoistoquímica. Entretanto, vale ressaltar que a proteína hrGFP pode ser marcada/amplificada pelo método mencionado. O modelo Kiss1/hrGFP foi desenvolvido por Cravo et al. (2011), sendo portanto uma ferramenta eficaz para estudos como este. A grande e principal vantagem desse modelo é que os anticorpos disponíveis comercialmente não são eficazes para identificar neurônios Kiss1 do núcleo Arc, o que inviabilizaria a comparação entre os principais núcleos que possuem neurônios Kiss1 relacionados à reprodução: AVPV/PeN e Arc.

Os esteroides sexuais exercem um papel extremamente importante na regulação da secreção de gonadotrofinas. As ações de retroalimentação exercidas pelos esteroides gonadais são predominantemente inibitórias. Porém, em fêmeas adultas, altos níveis estrogênicos

estimulam a liberação de GnRH e gonadotrofinas num período específico do ciclo estral. Esse mecanismo de retroalimentação negativo (ações inibitórias) exercido pelos hormônios sexuais ocorre tanto em machos como em fêmeas, já esse pico de secreção de LH que ocorre mediante estímulos positivos é exclusivo de fêmeas. A expressão do gene *Kiss1* também é caracteristicamente diferente entre machos e fêmeas; é, portanto, sexualmente dimórfica, apresentando-se mais abundante em fêmeas que em machos (CHRISTIAN; MOENTER, 2010).

O primeiro trabalho que demonstrou que a expressão do gene *Kiss1* varia de acordo com os níveis de E2 foi realizado em 2006 (SMITH; CLIFTON; STEINER, 2006). Os autores empregaram a técnica de hibridização *in situ* e observaram que em fêmeas ovariectomizadas a expressão do gene *Kiss1* é reduzida no AVPV/PeN em relação ao Arc; por outro lado, o grupo notou que o tratamento com estradiol gerava um fenômeno inverso: aumentava a expressão do gene *Kiss1* no AVPV/PeN e diminuía no Arc. Outros trabalhos seguintes também demonstraram esse mecanismo de retroalimentação positivo apresentado pelo AVPV/PeN diante dos níveis estrogênicos, e também hipotetizaram o possível papel do Arc no mecanismo de retroalimentação negativo (KAUFFMAN et al., 2007a; WINTERMANTEL et al., 2006). Nesse trabalho os resultados foram semelhantes, como previamente descritos na literatura: houve uma variação significativa do número de neurônios que expressaram a proteína hrGFP baseada nos níveis circulantes de hormônios gonadais, tanto no AVPV/PeN como no Arc. Esta variação também foi confirmada pela técnica qRT-PCR, na qual analisamos o material coletado de animais selvagens. O mesmo padrão de flutuação foi observado na expressão do gene *Kiss1*. Estes resultados validaram a eficácia da técnica escolhida, assim como as cirurgias realizadas e a coleta do material.

Além do nível estrogênico, a informação circadiana também é extremamente necessária para regular a ovulação. Os sinais neuroendócrinos e circadianos são extremamente complexos e importantes para sincronizar os eventos que ocorrem antes da ovulação em uma fase específica do dia, a que precede o período de maior atividade dos roedores que são noturnos (DE LA IGLESIA; SCHWARTZ, 2006).

Há diversas discussões literárias sobre o papel da vasopressina e do VIP como sinal circadiano que regula o eixo HPG. Sendo assim, alguns pesquisadores investigaram a relação anatômica entre o NSQ - considerado o regulador circadiano central dos mamíferos, e os sistemas que regulam o eixo HPG. Os resultados obtidos ao longo desses trabalhos destacaram as principais vias pelas quais o NSQ se comunica direta ou indiretamente com neurônios GnRH, o

centro do eixo HPG. Esses trabalhos demonstraram, por exemplo, que projeções contendo VIP se comunicam diretamente com neurônios GnRH, e este poderia ser um meio desse neuropeptídeo exercer suas ações sobre esses neurônios. (HORVATH; CELA; VAN DER BEEK, 1998; VAN DER BEEK et al., 1997). Porém, há evidências de que apenas 20% dos neurônios GnRH colocalizam com fibras de VIP (KRIEGSFELD et al., 2002; VAN DER BEEK et al., 1997), uma porcentagem abaixo da que é ativada durante o pico de secreção do hormônio GnRH, que compreende 40% dessa população neuronal (LEE; SMITH; HOFFMAN, 1990). Além disso, as aferências de VIP para neurônios GnRH são sexualmente dimórficas, apresentando-se mais abundantes em machos que em fêmeas (HORVATH; CELA; VAN DER BEEK, 1998). Por outro lado, trabalhos mostraram que ao bloquear a sinalização de VIP ocorre um atraso no pico de LH de ratas tratadas com E2 (HARNEY et al., 1996; LEE; SMITH; HOFFMAN, 1990; VAN DER BEEK et al., 1994). O que sugere um possível papel desse neuropeptídeo nas funções que regulam a secreção de LH. Mesmo assim, apesar de existir essa relação entre VIP e o eixo HPG, ainda não é certo se ele exerce um efeito estimulador principal ou apenas coparticipante.

Em algumas espécies, como a de hamsters, neurônios vasopressinérgicos se projetam para a região do AVPV/PeN, e neurônios do AVPV/PeN se projetam para neurônios GnRH (KRIEGSFELD et al., 2004; LEAK; MOORE, 2001). Essas projeções correspondem à via indireta que comunica o NSQ aos neurônios GnRH.

Um estudo anatômico com microscopia de luz e microscopia confocal identificou que hamsters apresentam 37% de seus neurônios Kiss1 do AVPV/PeN colocalizando com fibras vasopressinérgicas. Sendo que esta colocalização não é observada nos grupos de animais que tiveram o NSQ lesionado. Neste mesmo modelo animal, 42% dos neurônios Kiss1, também do AVPV/PeN, expressam o receptor de vasopressina Avpr1a (WILLIAMS et al., 2011), meio pelo qual essas células poderiam responder à ação da vasopressina. Essas informações, assim como os nossos resultados anatômicos de aposições entre fibras de vasopressina e neurônios Kiss1, nos permite sugerir um possível envolvimento dos neurônios Kiss1 nessa via indireta pela qual o NSQ poderia regular os neurônios GnRH.

Vida et al. (2010) observou que em camundongos (fêmeas) ovariectomizados aproximadamente 30% de neurônios Kiss1 colocalizam com fibras vasopressinérgicas no AVPV/PeN; nas fêmeas que receberam reposição de estradiol, esse valor subiu para 46% de colocalização. Poucas fibras com VIP foram observadas nessa região, e raramente apostas a neurônios Kiss1. Vida et al. (2010) também discute em seu trabalho que, conforme a variação estrogênica, o número de fibras vasopressinérgicas apostas a cada neurônio Kiss1 parece variar.

Segundo as conclusões do grupo, o E2 parece modular o número de fibras em cada neurônio Kiss1. Entretanto, nos nossos resultados não observamos variação no padrão de distribuição de fibras de vasopressina apostas a células Kiss1 do núcleo AVPV/PeN entre os grupos analisados. A quantidade de fibras aparentemente foi a mesma entre os grupos comparados. O percentual de aposições mudava apenas em função da variação observada na expressão da proteína hrGFP - que identifica os neurônios Kiss1 no nosso modelo experimental.

Além do dado anatômico, uma referência bastante importante para analisar a interação circadiana e estrogênica é verificar se os núcleos importantes para a reprodução, AVPV/PeN e Arc, expressam os genes dos principais neuropeptídeos que poderiam atuar no mecanismo ovulatório. Para isso, nós fizemos o máximo possível para coletar a porção de tecido hipotalâmico que correspondia, quase especificamente, à região do núcleo AVPV/PeN e, ou, Arc; ambos núcleos que sintetizam as kisspeptinas. Para garantir que o tecido correspondia às regiões de interesse, analisamos a expressão do gene *Kiss1* e de outros dois genes que são coexpressos, principalmente, por neurônios que sintetizam as kisspeptinas no Arc: dinorfina A (*Dyn*), cujo gene é referenciado como *Pdyn* nesse trabalho, e o gene que codifica a expressão da neuroquinina B, o *Tac3*. Todos eles reconhecidos por serem expressos nesses núcleos (GRACHEV; MILLAR; O'BYRNE, 2014).

Em camundongos, a maioria dos neurônios Kiss1 do Arc coexpressam *Dyn* e neuroquinina B, enquanto que no AVPV/PeN, a minoria dos neurônios Kiss1 apresentam colocalização com esses dois neuropeptídeos (Navarro *et al.*, 2009). A expressão dos genes *Pdyn* e *Tac3* variam significativamente de acordo com as alterações que ocorrem no gene *Kiss1* do Arc. Nos nossos resultados de expressão gênica, observamos um padrão semelhante de variação. A expressão dos genes *Pdyn* e *Tac3* foi peculiar no núcleo Arc, onde observamos aumento significativo da expressão desses genes em fêmeas ovariectomizadas, o mesmo que ocorreu para o gene *Kiss1*. Já no AVPV/PeN, para a expressão desses genes não houve diferença estatística entre os grupos. Esses dados, portanto, ajudam a caracterizar os núcleos AVPV/PeN e Arc e nos dão mais certeza de que estávamos comparando a expressão gênica desses dois núcleos individualmente.

Dados da literatura indicam que a expressão do receptor *Avpr1a* no AVPV/PeN de ratas é modulada pelos níveis circulantes de E2 (FUNABASHI *et al.*, 2000; KALAMATIANOS *et al.*, 2004a). Entretanto, os nossos dados de qRT-PCR não mostraram variação significativa desse receptor no núcleo AVPV/PeN frente as alterações nos níveis de E2. Essa divergência entre os dados pode se referir a uma diferença interespecie, visto que estamos comparando dados obtidos

em ratos com os nossos obtidos de camundongos. Além disso, nosso estudo apresenta um dado bastante importante não observado anteriormente na literatura: a expressão do receptor Avpr1a no núcleo Arc aumentou significativamente nas fêmeas tratadas com estradiol comparado aos outros grupos. E até onde sabemos, nenhum trabalho considerou a importância desse receptor nesse núcleo, onde parece ser regulado por altos níveis estrogênicos.

Os outros dois receptores de vasopressina, Avpr1b e Avpr2, são principalmente periféricos, com exceção do Avpr1b que já foi descrito em algumas regiões encefálicas; entretanto, esses trabalhos não observaram a presença desse receptor nos núcleos AVPV/PeN e Arc (BARBERIS, 1996; RAGGENBASS, 2001) o que pode justificar o fato de não termos detectado expressão desses genes nas nossas amostras.

Assim como o Avpr1a, estudos de expressão gênica associam a importância da vasopressina ao pico de LH, visto que, o pico de expressão do gene que codifica a vasopressina se dá no período da tarde, pouco antes de iniciar o período noturno; do mesmo modo que ocorre com o pico de LH (KRAJNAK et al., 1998). Outros experimentos destacam sua importância pelo fato de que, antagonistas do receptor Avpr1a atrasam o pico de LH em ratas na fase de proestro (FUNABASHI et al., 1998); em ratas homozigotas que possuem uma mutação espontânea no gene da vasopressina (Brattleboro), observam-se diversos problemas reprodutivos, incluindo ciclo estral anormal (BOER; BOER; SWAAB, 1981). Ainda assim, no nosso modelo animal não detectamos variações significativas na expressão da vasopressina dentre os grupos e regiões analisadas.

Assim como a vasopressina, o gene que codifica o VIP também apresenta mudanças diárias na sua expressão. Um estudo desenvolvido com ratos machos mostrou que, durante a fase clara (dia), a expressão do RNAm que codifica o VIP aumenta consideravelmente em relação aos seus níveis basais. Durante a noite, essa expressão diminui. Da mesma forma, o RNAm que codifica o receptor VPAC2 sofre mudanças diárias no seu ritmo de expressão, que diminui durante o dia e aumenta durante a noite. (SHINOHARA; FUNABASHI; KIMURA, 1999).

Com base nesses dados, analisamos a expressão do VIP e seus receptores nas regiões AVPV/PeN e Arc, e obtivemos um resultado um tanto interessante. Os receptores VPAC1 e VPAC2 parecem ser mais expressos na região do AVPV/PeN quando os níveis estrogênicos são baixos, de acordo com o que observamos em nossos resultados, nos quais a expressão desses receptores foi maior em fêmeas OVX. No núcleo Arc, por sua vez, a expressão desses receptores não sofreu mudanças significativas diante das variações nos níveis circulantes de E2. A expressão do gene que codifica o VIP também não foi significativa entre os grupos de ambos os

núcleos analisados. Os nossos dados, portanto, nos permite apenas indagar uma possível função dos seus receptores diante do mecanismo de retroalimentação negativo do E2.

As descobertas deste trabalho ajudam a reforçar uma possível atuação da vasopressina, em conjunto com os neurônios Kiss1 do AVPV/PeN, no mecanismo que desencadeia a ovulação. Visto que, apenas nesse núcleo observamos contato entre fibras vasopressinérgicas e neurônios Kiss1, como já tinha sido descrito na literatura. Ainda assim, não detectamos variações significativas do gene que codifica a vasopressina em nenhum dos dois núcleos avaliados, o que nos permite afirmar apenas que ela é detectada nesses núcleos, mas não que pode variar diante dos níveis circulantes de E2, já que não notamos diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, esse trabalho nos permitiu conjecturar qual seria a função do receptor Avpr1a no Arc quando os níveis de E2 estão elevados, ao mesmo tempo em que indagamos qual seria a função dos receptores VPAC1 e VPAC2 no AVPV/PeN quando os níveis estrogênicos estão baixos. Descobertas que precisam ser levadas em conta em investigações futuras.

Os métodos que nós utilizamos foram condizentes com os objetivos propostos porque nos permitiram verificar o percentual de fibras vasopressinérgicas apostas a neurônios Kiss1 assim como avaliar se os níveis de E2, reduzidos pela ovariectomia ou em doses suprafisiológicas como nas ovariectomizadas tratadas com E2, interferiam nessas aposições. Também nos ajudaram a estudar a expressão de genes que foram sugeridos como participantes no processo ovulatório e se eles também variam com os níveis de E2. Entretanto, algumas limitações das técnicas não nos permitiu afirmar do ponto de vista da expressão gênica o envolvimento direto dos neurônios Kiss1 com a vasopressina ou o VIP, mesmo nos permitindo supor que as variações desses genes ocorridas nos núcleos AVPV/PeN e Arc podem partir de uma possível coparticipação com neurônios Kiss1. Esses dados, portanto, necessitam de análises futuras.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante esse trabalho nos permitiu concluir que:

- A expressão da proteína hrGFP, assim como do gene *Kiss1*, variaram de acordo com os níveis de E2;
- As fibras vasopressinérgicas foram observadas apostas a neurônios *Kiss1* do AVPV/PeN independente dos níveis circulantes de E2. O mesmo não foi visto no núcleo Arc;
- No núcleo AVPV/PeN, os baixos níveis de E2 induziu aumento da expressão do RNAm que codifica os receptores VPAC1 e VPAC2.
- A expressão do RNAm que codifica o receptor *Avpr1a* aumentou em resposta aos altos níveis de E2 no núcleo Arc (**Figura 12**).

Figura 12. Diagrama ilustrando a expressão dos receptores de vasopressina e VIP nos núcleos anteroventral periventricular anterior (AVPV/PeN) e núcleo arqueado (Arc), assim como as projeções de fibras imunorreativas a vasopressina que só foram observadas em aposição a neurônios *Kiss1* no AVPV/PeN. A expressão do principal receptor de vasopressina, o *Avpr1a* foi maior no Arc em resposta aos altos níveis circulantes de estradiol, enquanto que no AVPV/PeN, o quadro de ovariectomia, que reduz bastante os níveis de estradiol, induziu o aumento da expressão dos receptores de VIP, VPAC1 e VPAC2.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAMSON, E. E.; MOORE, R. Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. **Brain Research**, v. 916, n. 1-2, p. 172-191, Oct 2001. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597605> >.

BARBERIS, C., TRIBOLLET, E. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. **Critical Reviews in Neurobiology**. 1996;10(1):119-154. 1996.

BOER, K.; BOER, G. J.; SWAAB, D. F. Reproduction in Brattleboro rats with diabetes insipidus. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v. 61, n. 2, p. 273-280, Mar 1981. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7205775> >.

BROWN-GRANT, K.; RAISMAN, G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 198, n. 1132, p. 279-296, Sep 1977. ISSN 0950-1193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755> >.

CALIGIONI, C. S. Assessing reproductive status/stages in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. Appendix 4, p. Appendix 4I, Jul 2009. ISSN 1934-8576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575469> >.

CANTERAS, N. S. et al. The retinohypothalamic tract: comparison of axonal projection patterns from four major targets. **Brain Research Reviews**, v. 65, n. 2, p. 150-183, Jan 2011. ISSN 1872-6321. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863850> >.

CHRISTIAN, C. A.; MOBLEY, J. L.; MOENTER, S. M. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15682-15687, October 25, 2005 2005. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/102/43/15682.abstract> >.

CHRISTIAN, C. A.; MOENTER, S. M. Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 3130-3136, Jun 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326000> >.

_____. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 4, p. 544-577, Aug 2010. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20237240> >.

¹ *De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CRAVO R.M. et al. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. **PLoS One**, v. 8, n.3, p. e58698, 2013.

CRAVO, R. M. et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. **Neuroscience**, v. 173, p. 37-56, 2011. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T0F-51H1DSR-3/2/5d25caed9461b31ece487d5afb241fba> >.

D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W. H. The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction. **Physiology**, v. 25, p. 207-217. 2010. Disponível em: < <http://physiologyonline.physiology.org/nips/25/4/207.full.pdf> >.

D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X. et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10714-10719, June 19, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/104/25/10714.abstract> >.

DAI, J. et al. Postmortem tracing reveals the organization of hypothalamic projections of the suprachiasmatic nucleus in the human brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 400, n. 1, p. 87-102, Oct 1998. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9762868> >.

DE LA IGLESIA, H. O.; BLAUSTEIN, J. D.; BITTMAN, E. L. The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. **Neuroreport**, v. 6, n. 13, p. 1715-1722, Sep 1995. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541467> >.

DE LA IGLESIA, H. O.; SCHWARTZ, W. J. Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1148-1153, Mar 2006. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373412> >.

DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10972-10976, September 16, 2003. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/100/19/10972.abstract> >.

DICKSON, L. et al. VIP and PACAP receptor pharmacology: a comparison of intracellular signaling pathways. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1070, p. 239-242, Jul 2006. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888173> >.

FRAZÃO, R. et al. Shift in Kiss1 Cell Activity Requires Estrogen Receptor $\hat{I}\pm$. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 2807-2820, February 13, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.jneurosci.org/content/33/7/2807.abstract> >.

_____. Estradiol modulates Kiss1 neuronal response to ghrelin. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 306, E606-E614. 2014. Disponível em: < <http://ajpendo.physiology.org/ajpendo/306/6/E606.full.pdf> >.

FUNABASHI, T. et al. Changes in neurotensin mRNA by estrogen in the female rat preoptic area during aging: an in situ hybridization histochemistry study. **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, n. 3, p. 364-371, Dec 1998. ISSN 0016-6480. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843642> >.

_____. Estrogen increases arginine-vasopressin V1a receptor mRNA in the preoptic area of young but not of middle-aged female rats. **Neuroscience Letters**, v. 285, n. 3, p. 205-208, 2000. ISSN 03043940. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394000010697> >.

_____. Gonadotropin-Releasing Hormone Exhibits Circadian Rhythm in Phase with Arginine-Vasopressin in Co-Cultures of the Female Rat Preoptic Area and Suprachiasmatic Nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 6, p. 521-528, 2000. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00481.x> >.

FUNES, S. et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1357-1363, 12/26/ 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03024070> >.

GOTTSCH ML, C. M., 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**, v. 145, n. 9, p. 4073-4077, 2004. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2004-0431> >.

GRACE, C. O.; FINK, G.; QUINN, J. P. Characterization of potential regulatory elements within the rat arginine vasopressin proximal promoter. **Neuropeptides**, v. 33, n. 1, p. 81-90, Feb 1999. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657475> >.

GRACHEV, P.; MILLAR, R. P.; O'BYRNE, K. T. The role of neurokinin B signalling in reproductive neuroendocrinology. **Neuroendocrinology**, v. 99, n. 1, p. 7-17, 2014. ISSN 1423-0194. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356581> >.

HARNEY, J. P. et al. In vivo antisense antagonism of vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nuclei causes aging-like changes in the estradiol-induced luteinizing hormone and prolactin surges. **Endocrinology**, v. 137, n. 9, p. 3696-3701, Sep 1996. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756535> >.

HERBISON, A. E. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 277-287, 3/14/ 2008. ISSN 0165-0173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017307000963> >.

HERNANDO, F. et al. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. **Endocrinology**, v. 142, n. 4, p. 1659-1668, Apr 2001. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250948> >.

HORVATH, T. L.; CELA, V.; VAN DER BEEK, E. M. Gender-specific apposition between vasoactive intestinal peptide-containing axons and gonadotrophin-releasing hormone-producing neurons in the rat. **Brain Research**, v. 795, n. 1-2, p. 277-281, Jun 1998. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622650> >.

ISHIHARA, T. et al. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. **Neuron**, v. 8, n. 4, p. 811-819, Apr 1992. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1314625> >.

KALAMATIANOS, T. et al. Cellular expression of V1a vasopressin receptor mRNA in the female rat preoptic area: effects of oestrogen. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, n. 6, p. 525-533, Jun 2004a. ISSN 0953-8194. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189327> >.

_____. Cellular Expression of V1a Vasopressin Receptor mRNA in the Female Rat Preoptic Area: Effects of Oestrogen. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, n. 6, p. 525-533, 2004b. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01199.x> >.

KALLÓ, I. et al. Transgenic approach reveals expression of the VPAC2 receptor in phenotypically defined neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus and in its efferent target sites. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 2201-2211, 2004. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03335.x> >.

KALSBECK, A.; BUIJS, R. M. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 109-118, Jul 2002. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111541> >.

KALSBECK, A. et al. Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: an interplay of GABA and glutamate. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3194, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18791643> >.

KAUFFMAN AS et al. Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1774-1783, 2007a.

_____. Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1774-1783, 2007b. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2006-1540> >.

KRAJNAK, K. et al. Sex differences in the daily rhythm of vasoactive intestinal polypeptide but not arginine vasopressin messenger ribonucleic acid in the suprachiasmatic nuclei. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4189-4196, Oct 1998. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751499> >.

KRIEGSFELD, L. J. et al. Organization of suprachiasmatic nucleus projections in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): an anterograde and retrograde analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 3, p. 361-379, Jan 2004. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681931> >.

_____. Vasoactive intestinal polypeptide contacts on gonadotropin-releasing hormone neurones increase following puberty in female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14, n. 9, p. 685-690, Sep 2002. ISSN 0953-8194. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213129> >.

KWON, I. et al. Mammalian molecular clocks. **Experimental Neurobiology**, v. 20, n. 1, p. 18-28, Mar 2011. ISSN 2093-8144. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110358> >.

LEAK, R. K.; MOORE, R. Y. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 433, n. 3, p. 312-334, May 2001. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298358> >.

LEE, W. S.; SMITH, M. S.; HOFFMAN, G. E. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5163-5167, Jul 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2114646> >.

LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 5, p. 407-441, 2004. ISSN 1527-8204. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485355> >.

LUTZ, E. M. et al. The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. **The Journal for Rapid Publication of Short Reports in Molecular Neurosciences**, v. 334, n. 1, p. 3-8, Nov 1993. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8224221> >.

MILLER, B. H. et al. Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and Clock mutant mice. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 5, p. 778-784, Nov 2006. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870944> >.

_____. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. **Current Biology**, v. 14, n. 15, p. 1367-1373, Aug 2004. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15296754> >.

MOORE, R. Y.; SPEH, J. C.; LEAK, R. K. Suprachiasmatic nucleus organization. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 89-98, Jul 2002. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111539> >.

MUÑOZ, E.; BREWER, M.; BALER, R. Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36009-36017, Sep 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130638> >.

NAVARRO, V. M. et al. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 38, p. 11859-11866, Sep 2009. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776272> >.

NAVARRO, V. M. T.-S., MANUEL. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 40-53, 01/print 2011. ISSN 1759-5029. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.147> >.

OAKLEY, A. E.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin signaling in the brain. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 713-743, Oct 2009. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770291> >.

PALM, I. F. et al. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 93, n. 2, p. 659-666, 1999. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452299001062> >.

_____. The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. **Brain Research**, v. 901, n. 1-2, p. 109-116, 2001. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899301023095> >.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.

RAGGENBASS, M. Vasopressin- and oxytocin-induced activity in the central nervous system: electrophysiological studies using in-vitro systems. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 3, p. 307-326, Jun 2001. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11240311> >.

_____. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2-3, p. 243-254, Apr 2008. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280467> >.

ROA, J. et al. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 48-69, 2008. ISSN 0091-3022. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302207000362> >.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614-1627, 2003. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa035322> >.

SHINOHARA, K.; FUNABASHI, T.; KIMURA, F. Temporal profiles of vasoactive intestinal polypeptide precursor mRNA and its receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus. **Molecular Brain Research**, v. 63, n. 2, p. 262-267, Jan 1999. ISSN 0169-328X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878775> >.

SMARR, B. L.; MORRIS, E.; DE LA IGLESIA, H. O. The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of Kiss1 and the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2839-2850, Jun 2012. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454148> >.

SMITH, J. T.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 623-630, April 1, 2006 2006. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/131/4/623.abstract> >.

SMITH, M. J.; JIENNES, L.; WISE, P. M. Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4317-4320, Nov 2000. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089568> >.

UZ, T. et al. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. **Molecular Brain Research**, v. 136, n. 1-2, p. 45-53, 2005. ISSN 0169-328X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169328X05000112> >.

VAN DER BEEK, E. M. et al. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. **Journal of Comparative Neurology**, v. 384, n. 4, p. 569-579, Aug 1997. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259490> >.

_____. Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. **Endocrinology**, v. 134, n. 6, p. 2636-44, Jun 1994. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194489> >.

VIDA, B. et al. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 9, p. 1032-1039, Sep 2010. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20584108> >.

WIEGAND, S. J.; TERASAWA, E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 395-404, Jun 1982. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6808412> >.

WILLIAMS, W. P. et al. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 152, n. 2, p. 595-606, Feb 2011. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190958> >.

WINTERMANTEL, T. M. et al. Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility. **Neuron**, v. 52, n. 2, p. 271-280, 2006. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627306005885> >.

YOUNG, W. S. et al. The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. **Neuroscience**, v. 143, n. 4, p. 1031-1039, Dec 2006. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17027167> >.