

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**

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 (Morphofuncional 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.

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 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).

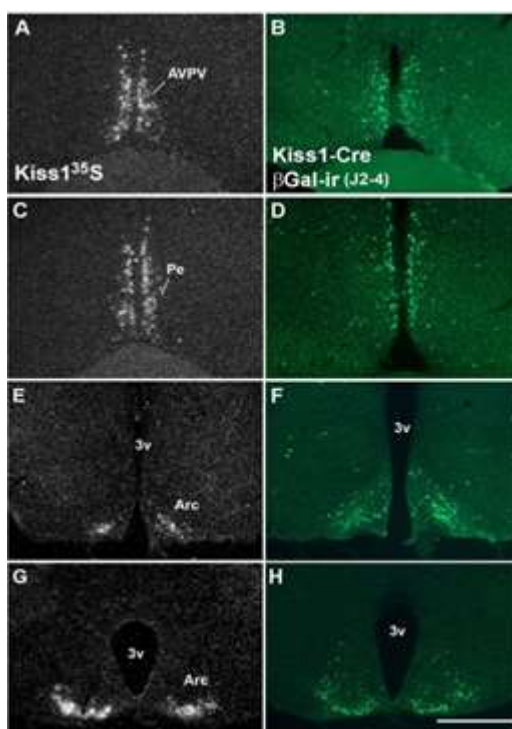


Figura 1. Distribuição comparativa do RNAm do gene *Kiss1* e células fluorescentes do animal transgênico *Kiss1-Cre* (Cravo et al., 2011). (A, C, E, G) Fotomicrografias em campo escuro de cortes encefálicos de camundongos selvagens (fêmeas sacrificadas na fase de diestro) demonstrando a expressão do 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 estrogênio 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 α), reconhecido por mediar o mecanismo de retroalimentação positivo no dia do proestro (WINTERMANTEL et al., 2006).

Neurônios GnRH não expressam o ER α , 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 α 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).

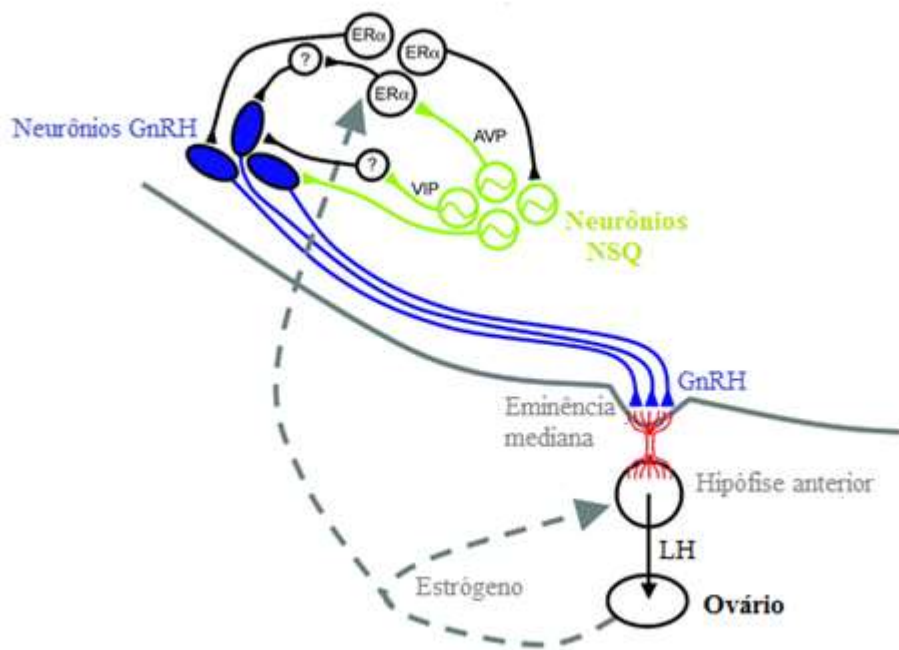


Figura 2. Representação esquemática do controle neuroendócrino da indução do pico do hormônio luteinizante (Modificado de: de la Iglesia e Schwartz, 2006). Quando os níveis circulantes de estrógeno estão elevados, ocorre um pico de liberação do hormônio GnRH que, por sua vez, induz um pico de liberação do hormônio luteinizante (LH). O efeito do mecanismo de retroalimentação positivo é modulado por neurônios que expressam o ER α 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 α por vias diretas e indiretas, e recebe projeções dos neurônios que expressam o ER α 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 α 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 préóptica, 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).

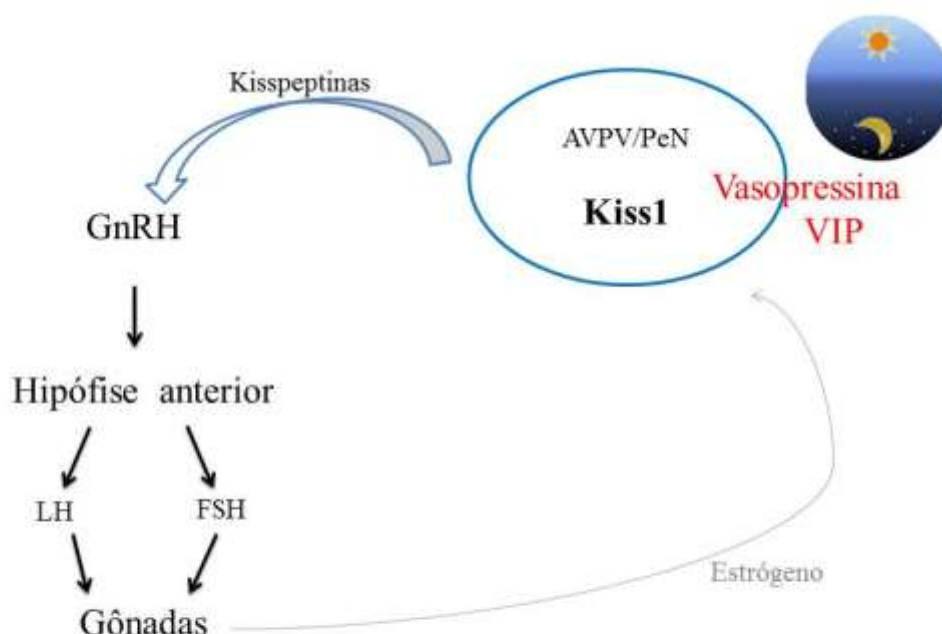


Figura 3: Possível interação dos neurotransmissores circadianos com o eixo HPG via neurônios Kiss1. Essa imagem ilustra o meio pelo qual os neurotransmissores do núcleo supraquiasmático, vasopressina e VIP poderiam atuar no controle do eixo HPG por meio do núcleo anteroventral periventricular que contém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

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**).

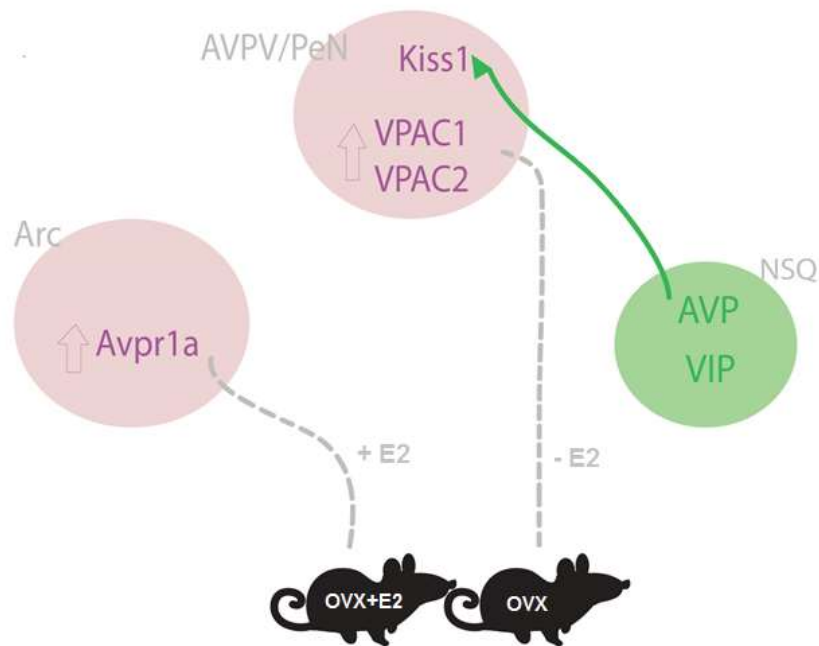


Figura 12. Diagrama ilustrando a expressão dos receptores de vasopressina e VIP nos núcleos anteroventral periventricular anterior (AVPV/PeN) e núcleo arqueado (Arc), assim como as projeções de fibras imunorreativas a vasopressina que só foram observadas em aposição a neurônios *Kiss1* no AVPV/PeN. A 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. 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. 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 $\hat{\pm}$. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 2807-2820, February 13, 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>>.