

GUSTAVO GUERINO MACEDO

**AXÔNIOS CONTENDO NEUROPEPTÍDEO Y EM PROXIMIDADE À
NEURÔNIOS CONTENDO KISSPEPTINA NO HIPOTÁLAMO DE
OVELHAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

GUSTAVO GUERINO MACEDO

**PROJEÇÕES NEURONAIS CONTENDO NEUROPEPTÍDEO Y EM PROXIMIDADE À
NEURÔNIOS CONTENDO KISSPEPTINA NA ÁREA PRÉ-OPTICA E NO
HIPOTÁLAMO DE OVELHAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADO: 23 de Fevereiro de 2011

Prof. Dr. José Domingos Guimarães
(Co-orientador)

Prof. Dr. Ciro Alexandre Alves Torres
(Co-orientador)

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Prof. Dr. Giovanni Ribeiro de Carvalho

Prof. Dr. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

***Este trabalho é dedicado com amor à
minha família que tem sempre
estado ao meu lado, completando
cada momento da minha vida.***

***Com respeito à vida dos animais
utilizados neste projeto.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo excelente programa de Estágio de Doutorado – PDEE, proporcionando suporte durante minha passagem pelos Estados Unidos. À AgriLife pelo suporte financeiro no projeto.

Gostaria de expressar minha gradidão ao meu orientador Eduardo Paulino da Costa, pela confiança em minha pessoa e em meu trabalho. Por guiar-me e apoiar-me em todas situações durante meu treinamento. Pelos puxões de orelha (merecidos) e extraordinário suporte em minha vida acadêmica e pessoal.

Meus sinceros agradecimentos ao meu co-orientador nos USA Marcel Amstalden, por proporcionar-me um excelente treinamento e orientação em minha carreira científica. Por receber-me e fornecer-me todo tipo de suporte, seja estrutural, científico e emocional estando sempre disponível a qualquer tipo de pedido. Pela amizade e bolachas baudoço nos momentos de saudade do Brasil. Tive muita sorte por ter tido sua co-orientação.

Agradeço também ao professor José Domingos pelos bons momentos na Reprodução da UFV, sempre prestativo e disponível à qualquer discussão científica. Aos profs. do DVT Laércio, Tarcizio, Claudio e Ciro (DZO, obrigado por instigar-me ciência). Agradeço também à prof da UFMS Eliane Costa e Silva, pelo apoio e confiança durante meu período de DTI.

Sou extremamente grato à Rosi, secretária do programa de pós – graduação, por ajudar-me desde minha inscrição, em 2007, na seleção do Doutorado. Sempre disponível e competente a resolver todo problema surgido na minha presença ou ausência.

Agradeço aos colegas do programa de pós-graduação, pela ajuda, diversão e trabalho. Em especial aos meus amigos da Reprodução: Emílio

lobim, Rogerim, Gian, Leozito, Zé Rogério, Colômbia. Sou grato também ao 'seo' Nenzim pelo 'cafezim meu fio' e ao amigo Frederico pela camaradagem nos tempos de Viçosa . Aos casais Tata e Diego blues boy; Cesinha e Maga pelo apoio logístico, e calorosa recepção!

Aos amigos nos USA pelo suporte, ajuda e solidariedade nos momentos de saudade. Sou muito grato à vocês!!! Principalmente aos meus amigos PM, Igloo, Cowboy, Becky Simmons, Jeremy, Catalina, Caca, Gege... you guys were just awesome, I really appreciate! Agradeço de coração à Bruna Alves, pelo companheirismo e disposição, assim como a imprescindível ajuda no meu projeto e aspectos relacionados ao meu período nos USA.

Um agradecimento especial à minha fantástica família que tem estado ao meu lado durante todos esses sofridos, divertidos, intensos e calorosos anos. Ao meus pais Gilberto, Marlene, minha Irmã Luciana e meu sobrinho "turzim", pelo amor incondicional. À vocês não cabem palavras ou adjetivos para definir minha gratidão e o quão feliz eu sou por ter vocês ao meu lado.

Agradeço à Deus!

BIOGRAFIA

Gustavo Guerino Macedo, filho de Gilberto e Marlene, nasceu irmão de Luciana no dia 30 de Abril de 1981 em Dourados-MS. Em 1999 iniciou sua graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, concluindo em 2003. No ano de 2004 foi bolsista de apoio técnico da Associação Nacional dos Criadores e Pesquisadores-ANCP, e posteriormente do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, em projetos relacionados à reprodução e bem-estar animal. Em 2005 iniciou o Mestrado em Ciência Animal na UFMS concluindo-o no início de 2007 com tese relacionada ao efeito do estresse na eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. Em 2007 iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa-UFV. No segundo semestre de 2008 iniciou o Estágio de Doutorado no Exterior-PDEE (doutorado sanduíche) com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Este programa foi desenvolvido no Physiology of Reproduction of Animal Science Department of the Texas A&M University, desenvolvendo trabalho na área de neuroendocrinologia da reprodução e retornando um ano após. No segundo semestre de 2009 tornou-se pesquisador assistente do Laboratório de Reprodução Animal da UFMS com bolsa DTI-2 do CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	5
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 Estrutura do sistema nervoso central e comunicações neuronais.....	6
3.2 Desenvolvimento hipotalâmico e hipofisário	10
3.3 Eixo hipotalâmico-hipofisário	13
<i>Hormônio liberador de gonadotrofina</i>	14
3.4 Kisspeptina como principal regulador do neurônio secretor de GnRH	17
<i>Descoberta do gene Kiss1/kisspeptinas e Kiss1r</i>	17
<i>Distribuição hipotalâmica de neurônios expressando Kiss1 e contendo</i> <i>kisspeptina</i>	20
<i>O papel fisiológico da kisspeptina/Kiss1r na função reprodutiva</i>	20
<i>Kisspeptina como reguladora da puberdade</i>	23
<i>Regulação dos neurônios secretores de kisspeptina</i>	24
3.5 Mediadores metabólicos e neuroendócrinos com efeito nos eventos reprodutivos	25
<i>Leptina</i>	26
<i>Insulina</i>	27

<i>Fator de crescimento semelhante à insulina – 1</i>	28
<i>Hormônios da tireóide</i>	29
<i>Neuropeptídeo Y</i>	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
<i>Animais e procedimento de ovariectomia</i>	33
<i>Coleta de sangue e radioimunoensaio para estradiol</i>	35
<i>Eutanásia e coleta de tecido cerebral</i>	36
<i>Imunofluorescência dupla para detecção de NPY e kisspeptina</i>	37
<i>Análises</i>	39
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÃO	51
8 REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secção transversal de 35 µm de cérebro ovino. A) Secção corada para células, utilizando hematoxilina-eosina (HE) mostrando a relação anatômica da área pré-ótica (POA) com o quiasma ótico, 3º ventrículo (3V), comissura anterior e fórnix. B) Imagem em nível da POA mostrando coloração para axônios. C) Secção em nível de núcleo arqueado (ARC) com coloração HE para células e em D) para axônios. No canto inferior esquerdo há a vista lateral mostrando em que nível se encontra a secção. (*The Sheep Brain Atlas*, John I. Johnson et al. Suporte financeiro: U. S. National Science Foundation). 12

Figura 2. Estrutura das kisspeptinas, produto do gene *Kiss1*. Diferentes kisspeptinas são geradas através de clivagem proteolítica de um precursor comum de 145 aminoácidos. A pré-kisspeptina contém 19 aminoácidos, e há uma região central de 54 aminoácidos, kisspeptina-54. Formas de baixo peso molecular incluem a kp-14, kp-13 e a kp-10. A porção final da cadeia corresponde à C-terminal 10 aminoácidos de comprimento que contém o RF-amido, fator suficiente para ativar o Kiss1r (Roa et al., 2008) 19

Figura 3. Implante subcutâneo de estradiol contendo em seu interior uma coluna de 10 mm de estradiol 17-β cristalino em pó. 34

Figura 4. Corpos celulares imunoreativos à kisspeptina-10 no núcleo arqueado do hipotálamo de ovelha ovariectomizada e com implante de E₂. A) Corpo celular e B) dendrito imunoreativo à kisspeptina. Setas indicam extensos axônios imunoreativos à kisspeptina-10. 41

Figura 5. Imunofluorescência de dupla marcação para kisspeptina (vermelho) e NPY (verde) no ARC. Setas indicam corpos celulares de imunoreativos à kisspeptina. Pontos verdes ou vermelhos indicam axônios imunoreativos ao NPY e à kisspeptina, respectivamente. O terceiro ventrículo está indicado por 3V. Barra: 100µm..... 44

Figura 6. Imunofluorescência de dupla marcação para kisspeptina e NPY no e ARC de secção de 50 µm de espessura. Cada imagem representa o mesmo campo visual e plano focal com magnificação de 400X. A) Corpo celular contendo kisspeptina (em vermelho, Alexa 555); B) Axônio contendo NPY (em verde, Alexa 488), indicado pelas setas; C) Contato próximo entre axônio contendo NPY e o corpo celular e dendrito de kisspeptina, indicado pelas setas. Barra: 10 µm. 45

Figura 7. Imunofluorescência de secção na região do núcleo arqueado do hipotálamo de ovelha ovariectomizada com implante de E₂, utilizando o fluorocromo Alexa 488. Fluorescências verdes são reativas para anticorpo anti-

NPY. Corpos celulares estão indicados pelas letras A e B, e as setas indicam axônios. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos corpos celulares imunorreativos para kisspeptina (kp10-ir), número de contatos próximos entre axônios contendo NPY e corpos celulares ou dendritos kp10-ir, e densidade das fibras contendo NPY na área pré-óptica (POA) e núcleo arqueado (ARC) rostral, médio e caudal, de ovelhas ovariectomizadas com implante de estradiol.....42

Tabela 2. Número de corpos celulares imunorreativos para kisspeptina, percentagem de células e dendritos em contato com fibras de NPY, média de contatos por corpo celular ou dendrito de kisspeptina e densidade das fibras de NPY na área pré-óptica (POA) e núcleo arqueado (ARC) de ovelhas ovariectomizadas com implante de estradiol.....43

ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AHA	Hipotálamo anterior
ARC	Núcleo arqueado
AVPV	Anteroventral periventricular
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DMH	Hipotálamo dorsomedial
E ₂	Estradiol
Er	Receptor de estrógeno
Er _α	Receptor de estrógeno α
Er _β	Receptor de estrógeno β
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnIH	Hormônio inibidor de gonadotrofinas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GRH	Hormônio liberador de hormônio do crescimento
HHG	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal
icv	Intracerebroventricular
IGF-1	Fator I de crescimento semelhante à insulina
iv	Intravenosa
<i>KISS1</i>	Gene humano codificador de kisspeptina

<i>Kiss1</i>	Gene não-humano codificador de kisspeptina
KISS1R	Receptor de kisspeptina em humanos
Kiss1r	Receptor de kisspeptina em não-humanos
Kp	Kisspeptina
Kp-10	Kisspeptina com 10 resíduos de aminoácidos
kp10-ir	Imunorreatividade à kisspeptina
Kp-13	Kisspeptina com 13 resíduos de aminoácidos
Kp-14	Kisspeptina com 14 resíduos de aminoácidos
Kp-54	Kisspeptina (metastina) com 54 resíduos de aminoácidos
LH	Hormônio luteinizante
Lr	Receptor de leptina
LT	Hipotálamo lateral
ME	Eminência mediana
NGS	Soro normal caprino
NPY	Neuropeptídeo Y
NPY-ir	Imunorreatividade à neuropeptídeo Y
OVX	Ovariectomizada
PAF	Paraformaldeído
PAV	Núcleo paraventricular
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato 0,1 M + 0,9% NaCl
PBSTX	Tampão fosfato 0,1 M + 0,9% NaCl + 4% de soro caprino
PEV	Região periventricular

POA	Área pré-óptica
PRH	Hormônio liberador de prolactina
RIA	Radioimunoensaio
SNC	Sistema nervoso central
SO	Núcleo supraóptico
SQM	Núcleo supraquiasmático
SS	Somatostatina
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio tireotrófico
TX	Triton-X100
VMH	Hipotálamo ventromedial

RESUMO

MACEDO, Gustavo Guerino. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Axônios contendo neuropeptídeo Y em proximidade à neurônios contendo kisspeptina no hipotálamo de ovelhas.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientadores: Ciro Alexandre Alves Torres, Eliane Vianna da Costa e Silva, José Domingos Guimarães e Laércio dos Anjos Benjamin.

O eixo reprodutivo tem a capacidade de responder a variações nos fatores metabólicos. Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares que ligam o balanço energético com reprodução, assim como os locais do cérebro para esta função, permanecem não compreendidos. Peptídeos neuroendócrinos, como neuropeptídeo Y (NPY) e kisspeptina são considerados como tendo função primordial na sinalização da nutrição à reprodução. O NPY é um peptídeo com potente efeito orexigênico e a kisspeptina é o mais poderoso estimulador da liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)/hormônio luteinizante (LH). Para avaliar um possível papel do NPY na modulação da resposta de kisspeptina, é necessário estabelecer as bases anatômicas entre os neurônios contendo esses dois neuropeptídeos no hipotálamo. O modelo experimental utilizado foram ovelhas mestiças Suffolk ovariectomizadas e estimuladas por implante de estradiol. Os animais foram abatidos e cortes do hipotálamo contendo a área pré-óptica (POA) e núcleo arqueado (ARC) foram submetidas a imunofluorescência dupla para detecção de NPY e kisspeptina. Por meio de microscopia de fluorescência, foi analisado: o número de corpos celulares contendo kisspeptina-imunoreativa (kp10-ir); o número de varicosidades contendo NPY-ir em contato próximo com corpo celular ou dendritos de kp10-ir e a densidade das fibras de NPY nas regiões estudadas. No total, foram analisadas 3.037 células imunorreativas para kisspeptina, sendo que 27,2% dessas estavam em contato próximo a axônios contendo NPY. O número médio de contatos de axônios de NPY com o corpo celular de kisspeptina foi de $1,6 \pm 0,3$ e $2,1 \pm 0,3$ na POA e ARC,

respectivamente. O número de contatos de NPY com dendritos de kisspeptina foi $1,5 \pm 0,5$ e $1,6 \pm 0,1$ na POA e ARC, respectivamente. Assim, foi verificado que axônios contendo NPY estão em contato próximo com corpos celulares e dendritos de uma subpopulação de neurônios secretores de kisspeptina na POA e ARC de ovelhas. As análises indicam que o NPY possa regular funções neuroendócrinas, atuando diretamente em neurônios kisspeptina.

ABSTRACT

MACEDO, Gustavo Guerino. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2011. **Neuropeptide Y containing axons in proximity to kisspeptin containing neurons in hypothalamus of ewes.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Ciro Alexandre Alves Torres, Eliane Vianna da Costa e Silva, José Domingos Guimarães and Laércio dos Anjos Benjamin.

The reproductive axis responds to changing on levels of metabolic factors. However, cellular and molecular mechanisms linking energy balance and reproduction, as well the brain sites for this function remain not well understood. Neuroendocrine peptides like neuropeptide Y (NPY) and kisspeptin are considered to have a major function signaling nutrition to reproduction. NPY is a peptide with a potent orexigenic effect and kisspeptin is the most important stimulator of the releasing of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)/luteinizing hormone (LH). To evaluate the role of NPY on the modulation of the kisspeptin releasing is necessary to establish the anatomic bases between this two neuropeptides in the hypothalamus. The experimental model used was ovariectomized crossbreed Suffolk ewes with subcutaneous estradiol implant. Animals were euthanatized and hypothalamic tissue assayed to double-label immunofluorescence to detect NPY and kisspeptin in pre-optic area (POA) and arcuate nucleus (ARC). Fluorescence microscopy was used to analyze the number of immunoreactive kisspeptin containing cell bodies (kp-ir), NPY-ir containing varicosities in close contact with kp10-ir cell bodies and dendrites, density of NPY containing fibers in the studied sites. Total of 3,037 kp10-ir cell bodies were analyzed, which 27% of them are in close contact with NPY containing axons. The mean number of axo-somatic contacts per kp10-ir neuron observed was 1.6 ± 0.3 and 2.1 ± 0.3 for POA and ARC, respectively. On the other hand, the mean number of NPY varicosities in close contact with kp10-ir dendrite was 1.5 ± 0.5 and 1.6 ± 0.1 contacts for POA and ARC, respectively. Thus, this study determined that NPY containing axons are in close contact with kisspeptin cell bodies and dendrites in POA and ARC of

ovariectomized ewes with estradiol implant. It suggests that NPY may regulate neuroendocrine functions acting directly on kisspeptin neurons.

1 INTRODUÇÃO¹

O sucesso reprodutivo é dependente de nutrição adequada. Atualmente, há pouca dúvida de que a eficiência reprodutiva é minimizada durante momentos de restrição nutricional (Ahima et al. 1996, Estrada et al. 2003, Fernandez-Fernandez et al. 2006). Na verdade, o funcionamento dos órgãos reprodutivos está sujeito ao *status* energético que limita a fertilidade a momentos de reserva energética adequada. Algumas espécies incorporam um mecanismo preditivo para aumentar a probabilidade de sucesso reprodutivo, limitando a atividade reprodutiva a momentos do ano nos quais nascimento e amamentação são propícios.

O conhecimento das bases neuroendócrinas da interação nutrição vs reprodução é indispensável para o desenvolvimento de novas terapias aplicadas à várias áreas desde à saúde humana e animal, ou aumento da produtividade de animais de produção. Um exemplo a ser citado é a síndrome dos ovários policísticos em adolescentes obesas que tem sua puberdade antecipada devido à suas altas taxas metabólicas; ou mesmo a tentativa de antecipação da ciclicidade de vacas pós-parto que estão em balanço energético negativo.

¹ Esta tese segue as normas e formato da revista *Reproduction in Domestic Animals*. Programas de computador utilizados: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Adobe Photoshop CS5, NIS-Elements BR 3.00 e EndNote X4.

A deficiência nutricional causa efeitos negativos no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG), principalmente pela inibição da liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e conseqüentemente de hormônio luteinizante (LH) (Estrada et al. 2003). Desta forma, tanto a puberdade como a recorrência normal de ciclos estrais (ou menstruais) são acometidos pela deficiência nutricional (Prasad et al. 1993). Apesar de haver consenso de que estes distúrbios tenham em grande parte origem no sistema nervoso central, as interações neuroanatômicas e processos celulares e moleculares, mediando efeitos adversos da condição metabólica na neurobiologia reprodutiva, permanecem pouco compreendidos (Crown et al. 2007). Iniciou-se a busca pelo entendimento de como o eixo reprodutivo pode ser sinalizado sobre o *status* metabólico.

Sabe-se que o neuropeptídeo Y (NPY) tem papel importante na comunicação metabolismo/reprodução. Este neuropeptídeo tem um potente efeito orexigênico (estimulante do apetite) e é inibido pela leptina (Finn et al. 1998, Ahima et al. 1996). Seu papel na reprodução passa por uma atuação direta na secreção de GnRH (Li et al. 1999), sendo que a presença de concentração elevada de NPY no hipotálamo causa distúrbios no ciclo estral e atraso na maturidade sexual (Pierroz et al. 1995, Toufexis et al. 2002). Injeções icv de NPY em ovelhas ovariectomizadas, com ou sem implante de E₂, mostraram que em ambos os casos o NPY diminui a frequência e amplitude dos pulsos de LH (McShane et al. 1992, Morrison et al. 2003), assim como em animais subnutridos (McShane et al. 1993). Em vacas, também é observada

diminuição da pulsatilidade de GnRH/LH com administração icv de NPY (Gazal et al. 1998). Entretanto, há indícios de que o NPY pode atuar de forma indireta na liberação de GnRH em determinados momentos da vida do animal.

Dois artigos independentes mostraram que animais com ausência do receptor *Kiss1r*, ligante natural do hormônio peptídico, apresentam hipogonadismo hipogonadotrófico (Seminara et al. 2003, de Roux et al. 2003). Esta descoberta estabeleceu um dos papéis-chave da kisspeptina no controle reprodutivo. Desde então, diversos trabalhos, nas áreas molecular e farmacológica, mostram que a kisspeptina é fundamental no início da puberdade e na regulação da secreção de gonadotrofinas em adultos (via *feedback* de esteróides ou não). Esse peptídeo é um dos mais poderosos estimuladores da secreção de GnRH/LH (Tena-Sempere 2010), sendo considerado uma das mais importantes descobertas em neuroendocrinologia reprodutiva desde o isolamento do GnRH, no início da década de 70 (Roa et al. 2008).

As células secretoras de kisspeptina no hipotálamo, respondem a sinais metabólicos e podem transmitir informações importantes às células produtoras de GnRH. Isso porque por meio de seu receptor protéico-G (GPR54), a kisspeptina tem ação direta nos neurônios que contêm GnRH, estimulando a liberação deste hormônio (Clarkson et al. 2008). O envolvimento potencial no controle metabólico e fertilidade foi inicialmente demonstrado em camundongos pré-púberes que sob restrição alimentar tiveram diminuída a expressão hipotalâmica do gene *Kiss1* e aumentado o RNAm do *Kiss1r*, associado à uma

diminuição da secreção de gonadotrofina. Adicionalmente, kisspeptina não altera o consumo alimentar (Castellano 2005, Luque et al. 2007). Embora, até o momento os mecanismos moleculares pelos quais a função reprodutiva é interrompida em situações de insuficiência energética, permanecem não caracterizados.

Existe evidência de que kisspeptina e NPY possam mediar os efeitos da nutrição no controle da reprodução. Restrição alimentar é associada com inibição da expressão do gene de kisspeptina *KISS1* (Castellano 2005). Adicionalmente, a leptina exógena (hormônio produzido pelos adipócitos, com função no desencadeamento da puberdade) quando aplicada em camundongos com deficiência de produção de leptina, aumenta a expressão de RNAm do *Kiss1* no ARC (Smith et al. 2006). Por outro lado, a leptina inibe a expressão de RNAm de NPY no ARC (Ahima et al. 2000).

Assim, com o presente estudo espera-se aumentar o entendimento das bases fisiológicas da regulação da liberação de gonadotrofinas via interação nutricional. A identificação de interações neuroendócrinas mediando a informação metabólica no controle da reprodução, pode levar a uma grande variedade de aplicações, tanto na ciência básica quanto na aplicada, como novas terapias farmacológicas ou estratégias de manejo para aumentar a eficiência reprodutiva em animais de produção.

2 OBJETIVO

Foi hipotetizado que o papel modulatório da nutrição na reprodução envolve a ação direta do NPY na liberação de kisspeptina. Para comprovar esta hipótese, foi verificado se há relação anatômica entre neurônios que contém kisspeptina e NPY. Mais especificamente a possibilidade de contatos próximos entre axônios com NPY e corpos celulares ou dendritos imunorreativos à kisspeptina na área pré-óptica e hipotálamo de ovelhas, utilizando imunofluorescência de dupla marcação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura do sistema nervoso central e comunicações neuronais

O cérebro é o principal órgão do SNC, localizado no interior do crânio, com dois hemisférios relativamente simétricos. A parte externa do cérebro é chamada de córtex ou substância cinzenta, e a interna é denominada encéfalo, substância branca ou medular (Kolb e Whishaw, 2001).

O cérebro de mamíferos é formado por uma grande população de células nervosas, divididas basicamente em dois tipos celulares, sendo as - células da Glia e os neurônios. As células Gliais (84 bilhões) fornecem aos neurônios suporte físico, metabólico, sintetizam diversos fatores de crescimento e estimulam o estabelecimento de diferentes sinapses axosomáticas em neurônios específicos (Galbiati et al. 2003, Witcher et al. 2007, Azevedo et al. 2009). Há uma certa divergência entre autores quanto ao tamanho da população de neurônios, entretanto estudos recentes mostram que ela é estimada em aproximadamente 86 bilhões de células em humanos. Os neurônios são a unidade funcional do sistema nervoso, responsáveis por receber, integrar, processar, transmitir informação na forma de sinal elétrico ou químico para outra célula neuronal ou não, assim como sintetizar fatores e neurohormônios que regulam diversas funções fisiológicas (Azevedo et al.

2009, Pozo e Goda 2010). De forma geral, os neurônios excitam ou inibem outros neurônios. Assim, um neurônio será estimulado a agir se os estímulos excitatórios excederem inibitórios (Kolb e Whishaw, 2001).

Dependendo de sua localização, os neurônios podem variar consideravelmente quanto à sua forma e função. Entretanto, as capacidades cerebrais surgem não apenas do formato dos neurônios, mas também das conexões que fazem entre si, da seletividade dos canais iônicos e dos receptores de membranas (Reece, 2006). Neurônios podem ser excitatórios, inibitórios ou modulatórios. Com relação à sua função, podem ser motores, sensoriais ou secretórios (Raine, 1994). Basicamente, os neurônios são constituídos por dendritos, que surgem do corpo celular e são a área de recepção de informações; corpo celular (soma, pericário) contendo organelas para a maior parte das atividades metabólicas da célula; axônios (fibra nervosa, geralmente longa, podendo alcançar mais de 1 m em grandes animais), que são prolongamentos da célula que transmite informações; e terminações pré-sinápticas ou botões sinápticos na extremidade do axônio, que são tumefações que contêm vesículas contendo neurotransmissores e formam sinapses químicas com outros neurônios (Eurell, 2004; Cunningham e Klein, 2008).

A mielina de um axônio é uma estrutura isolante que quando no sistema nervoso periférico, é formada pelas células de Schwann, que circundam toda a extensão da fibra. Já no SNC, a mielina é formada por oligodentrócitos. Esta estrutura é interrompida em intervalos regulares ao longo do comprimento do axônio, formando os nódulos de Ranvier, local onde ocorre um rápido

intercâmbio iônico. Assim, esta condução saltatória pelos nódulos de Ranvier, aumenta consideravelmente a velocidade de condução do impulso nervoso, chegando em alguns casos a 140 m/s (Perrett et al. 1982, Reece, 2006). Desta forma, um neurônio, quando estimulado, pode gerar um potencial de ação no segmento inicial do axônio junto ao soma, que percorre toda sua extensão, estimulando a liberação das vesículas neurosecretórias (contendo peptídeos e aminas) do botão sináptico (Eurell, 2004). Outra característica importante dos axônios é que não possuem ribossomos. Assim, não podem sintetizar peptídeos e proteínas, servindo apenas como meio de transporte dos neurotransmissores do corpo celular até as terminações pré-sinápticas (Cunningham e Klein, 2008).

Os pontos de contato dos neurônios são chamados de sinapses. O citoplasma de um neurônio pré-sináptico possui múltiplas vesículas sinápticas contendo neurotransmissor, e sob determinado estímulo nervoso ocorre a exocitose após a fusão da vesícula à membrana pré-sináptica, liberando seu conteúdo na fenda sináptica. Os neurotransmissores atravessam a fenda e se ligam a receptores na membrana pós-sináptica, desencadeando eventos específicos no neurônio (Maio, 2008, Pozo e Goda, 2010). As sinapses podem ser encontradas nos corpos celulares, dendritos, segmento inicial dos axônios, botões sinápticos e nas gêmulas dos axônios (Reece, 2006). Outra forma mais rápida e simples, porém menos comum de sinalização intercelular, são as sinapses elétricas, que são junções especializadas (tipo *gap*) que permitem a

passagem da corrente iônica diretamente entre os neurônios (Bennett, 1977), de forma bidirecional (Connors e Long, 2004).

Os neurotransmissores são pequenas moléculas orgânicas capazes de transmitir uma mensagem de um neurônio à outro. Quimicamente esses transmissores podem ser aminas biogênicas (*p.e.* catecolaminas norepinefrina e dopamina e as indolaminas serotonina e histamina), acetilcolina ou aminoácidos (*p.e.* ácido γ -aminobutírico [GABA], glutamato, glicina), ou peptídeos que são sintetizados no corpo celular, atingindo o axônio por transporte axoplasmático. A ação pós-sináptica de certo neurotransmissor em dada sinapse, não é uma propriedade inerente do transmissor, mas sim determinada pelo tipo específico de receptor para o transmissor encontrado no neurônio pós-sináptico. Isso explica o fato de alguns neurotransmissores causarem despolarização pós-sináptica em algumas sinapses e hiperpolarização em outras (Reece, 2006). Neste sentido, a comunicação neuronal é mais complexa do que parece. Um neurônio geralmente tem receptores de membrana para mais de uma substância. Isso implica que a função de um neurônio pode mudar conforme a combinação de substâncias liberadas. Desta forma, neurônios sintetizadores de um neuropeptídeo específico podem ser considerados de diferentes populações em uma mesma região cerebral, como no caso do hipotálamo.

3.2 Desenvolvimento hipotalâmico e hipofisário

O SNC pode ser dividido em sete regiões principais, em sentido caudal para rostral: medula espinhal, medula oblonga (bulbo), ponte, cerebelo, mesencéfalo, diencéfalo e telencéfalo (Frandsen et al. 2009). O diencéfalo é a região do cérebro que inclui o tálamo, metatálamo, hipotálamo, epitálamo, subtálamo e pré-teto. Como o nome diz, o hipotálamo se localiza ventral ao tálamo, constituindo a parte ventral do diencéfalo, estendendo-se do quiasma óptico aos corpos mamilares (Feeman, 1995). É subdividido em 22 pequenos núcleos e responsável por aspectos comportamentais como alimentação, comportamento sexual e emocional, sono, termoregulação, movimento, ritmos de atividade e vida vegetativa (Kolb e Whishaw, 2001).

O hipotálamo é uma região complexa e cada pequeno núcleo é envolvido em várias funções, respondendo a estímulos gerados no próprio hipotálamo ou não, estando assim conectado a muitas partes do SNC. As funções reprodutiva e nutricional são reguladas por regiões específicas como o núcleo supra-óptico (SO), supraquiasmático (SQM), paraventricular (PAV), lateral (LT), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH), área pré-óptica (POA) e núcleo arqueado (ARC), eminência mediana (ME) (Pelletier 1990, Frandsen et al. 2009).

Alguns neuroanatomistas consideram a POA como parte não integrante do hipotálamo, outros a classificam como parte do hipotálamo anterior (AHA).

De qualquer forma, a POA está situada imediatamente ventral a comissura anterior, dorsal ao quiasma óptico no AHA e lateralmente ao terceiro ventrículo (Merriam-Webster, 2010), como visto na Figura 1A, B.

O ARC (também chamado de núcleo infundibular) está localizado no hipotálamo médio basal (MBH), circundando a parte ventral do terceiro ventrículo, adjacente à ME (Figura 1C, D). Contém uma densa população de pequenos neurônios com 1-3 dendritos. O ARC se comunica primariamente com a hipófise, hipotálamo, sistema límbico, periarqueduto do mesencéfalo e núcleo autônomo do tronco encefálico (Chronwall, 1985).

Uma das funções mais importantes do hipotálamo é fazer a ligação entre sistema nervoso e endócrino via glândula hipófise, tendo assim influência direta na secreção da última. Isto se deve a diferentes fatores liberadores e inibidores, atualmente reconhecidos como hormônios hipotalâmicos, transmitidos para a adenohipófise via sistema porta-hipofisário. São reconhecidos oito hormônios hipotalâmicos liberadores e inibidores: GnRH; hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH); hormônio liberador de corticotrofina (CRH); hormônio liberador de tireotrofina (TRH); hormônio liberador de hormônio do crescimento (GRH); somatostatina (SS, também conhecida como hormônio inibidor do GRH); hormônio de liberação de prolactina (PRH) e dopamina (também chamado de hormônio inibidor de prolactina). A oxitocina e o hormônio anti-diurético, também são sintetizados pelo hipotálamo nos núcleos paraventricular e supra-óptico, respectivamente (Neill, 2006).

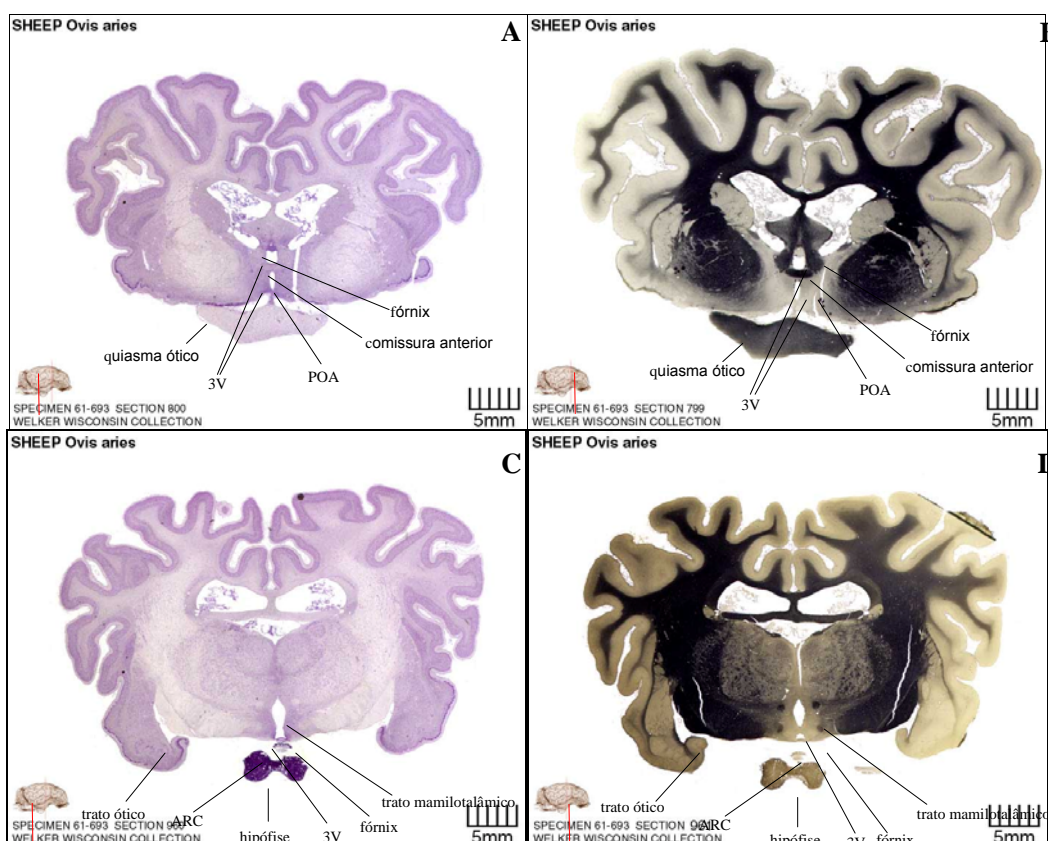


Figura 1. Secção transversal de 35 μ m de cérebro ovino. A) Secção corada para células, utilizando hematoxilina-eosina (HE) mostrando a relação anatômica da área pré-ótica (POA) com o quiasma ótico, 3^o ventrículo (3V), comissura anterior e fórnix. B) Imagem em nível da POA mostrando coloração para axônios. C) Secção em nível de núcleo arqueado (ARC) com coloração HE para células e em D) para axônios. No canto inferior esquerdo há a vista lateral mostrando em que nível se encontra a secção. (*The Sheep Brain Atlas*, John I. Johnson et al. Suporte financeiro: U. S. National Science Foundation).

A ME do hipotálamo, é a área na qual os hormônios liberadores e inibidores são secretados. Esta região contém poucos corpos celulares; porém, possui uma densa rede de terminações nervosas circundando os capilares sanguíneos, os quais originam o sistema porta. Corpos celulares de neurônios que se projetam para a camada externa da ME e secretam os hormônios liberadores ou inibidores, são organizados dentro dos núcleos hipotalâmicos.

Os neurônios que secretam GnRH estão primariamente próximos à área pré-optica medial (POA). Os neurônios secretores de kisspeptina estão também na POA, assim como no DMH e ARC (Franceschini et al. 2006). Os neurônios secretores de NPY estão localizados no ARC e no PAV (Morris, 1989).

A hipófise (também chamada de pituitária) é dividida em adeno-hipófise e neuro-hipófise. A primeira é composta pelas partes tuberal, intermédia e distal. É uma estrutura bastante vascularizada e contém diferentes tipos de células glandulares, capazes de sintetizar e secretar os seguintes hormônios: hormônio tireotrófico (TSH), adrenocorticotrófico (ACTH), FSH, LH, GH e prolactina. A neuro-hipófise se divide em parte nervosa e infundíbulo hipofisário. É composta por fibras nervosas não-mielinizadas derivadas de neurônios neurosecretores do hipotálamo, contendo oxitocina e hormônio antidiurético (vasopressina) que são liberados diretamente na circulação sistêmica (Reece, 2006).

3.3 Eixo hipotalâmico-hipofisário

Os eventos reprodutivos, tanto em machos quanto em fêmeas, são fundamentalmente dependentes de um sistema complexo de interações hormonais, que ocorrem principalmente entre o hipotálamo, a hipófise e as gônadas. As gonadotrofinas hipofisárias, LH e FSH, são hormônios glicoprotéicos envolvidos principalmente no controle de funções gonadais como

ovulação, gametogênese e esteroidogênese (Fevold et al. 1931). Em mamíferos, a secreção de LH e FSH é controlada por uma rede neuroendócrina complexa integrando sinais centrais e periféricos. Hierarquicamente, o fator crucial no controle central da secreção de gonadotrofinas é o peptídeo GnRH, sintetizado pelo hipotálamo e transportado para a adenohipófise, onde se liga a seu receptor específico nos gonadotrofos (Herbison, 2006).

Hormônio liberador de gonadotrofina

O GnRH é um hormônio peptídeo composto por 10 resíduos de aminoácidos (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) (Schally et al. 1971, Matsuo et al. 1971, Baba et al. 1971), fator-chave da regulação dos órgãos reprodutivos em uma grande variedade de vertebrados. O GnRH é o principal peptídeo na regulação do eixo HHG. Essa forma clássica de GnRH é encontrada desde peixes à humanos, possuindo função similar na reprodução (Jimenez-Linan et al. 1997). Outra forma bastante encontrada em mamíferos é o GnRH-II, originalmente isolado do cérebro de aves (Miyamoto et al. 1984). O GnRH-II é uma estrutura conservada por mais de 500 milhões de anos na história evolucionária, com ampla distribuição tecidual sugerindo uma variedade de funções reprodutivas (como comportamento sexual) e não-reprodutivas (Millar 2005). Entretanto, estudos estruturais de GnRH em vertebrados identificaram 16 novos peptídeos (Millar 2003).

No período embrionário, os neurônios secretores de GnRH aparecem no bulbo olfatório; entretanto, com o desenvolvimento, migram para a POA projetando axônios para a ME (Fujioka et al. 2007). Há um aumento gradual da expressão hipotalâmica de GnRH desde o período pós-natal até a puberdade, e esse aumento é crucial para o estabelecimento da mesma (Ebling e Cronin 2000). Os neurônios que contêm GnRH são encontrados em várias regiões do hipotálamo; no entanto, estudos com aplicação retrógrada de marcador demonstram que neurônios contendo GnRH que projetam para a ME têm seus corpos celulares na região septal, POA medial e região periventricular (PEV) (Silverman et al. 1987, Merchenthaler et al. 1989). As células produtoras de GnRH são fusiformes, com um ou dois dendritos principais, e um único axônio (Lehman et al. 1988).

O GnRH é transportado intraneuronalmente para as junções neurovasculares na ME do hipotálamo. Assim, em resposta a um sinal nervoso elétrico, o GnRH é liberado no sistema porta-hipofisário provendo uma ligação humoral entre o SNC e o sistema endócrino (Harris 1955, Squires 2003). Sua liberação se dá de forma pulsátil e em ondas (Woller et al. 1998), assim como a expressão do seu gene (*GnRH*) (Nunez et al. 1998). A natureza intermitente da liberação de GnRH é essencial para manutenção da sensibilidade da hipófise ao estímulo de GnRH, sendo desta forma indispensável para o suporte normal da reprodução (Knobil, 1980).

O GnRH é transportado da ME para a adenohipófise onde estimula a liberação das gonadotrofinas. Os gonadotrofos liberam LH e FSH de forma

basal, independente do estímulo de GnRH; porém, a liberação pulsátil de LH é dependente dos pulsos de GnRH (Kile e Nett 1994, Pawson e McNeilly 2005). Neste sentido, pequenos pulsos de GnRH aumentam preferencialmente a secreção de FSH, enquanto a alta frequência dos pulsos favorecem a secreção de LH (Padmanabhan and McNeilly 2001).

Desta forma, observa-se que o GnRH é essencial para o processo reprodutivo. Contudo, sua síntese e liberação resultam de uma complexa interação de mecanismos regulatórios. Entre esses, estão os esteróides e peptídeos gonadais, que regulam o GnRH por mecanismo de *feedback* negativo ou positivo. Da mesma forma, vários fatores foram recentemente identificados como participantes da complexa e dinâmica regulação da liberação de GnRH, como aqueles estimulatórios (*p.e.* glutamato e norepinefrina) ou inibitórios (*p.e.* GABA e opióides endógenos), embora alguns atuem de forma contrária em determinadas condições como o GABA (Herbison 2006).

3.4 Kisspeptina como principal regulador do neurônio secretor de GnRH

Descoberta do gene Kiss1/kisspeptinas e Kiss1r

Há pouco tempo foi descoberto que uma família emergente de peptídeos, chamada kisspeptina, possui um papel indispensável no controle da maturação e função dos órgãos reprodutivos. Essas kisspeptinas são codificadas pelo gene *Kiss1* (*KISS1* em humanos) com afinidade pelo receptor *Kiss1r* (*human orphan G-protein-coupled receptor*) (Kotani et al. 2001); anteriormente conhecido como GPR54 (Gottsch et al. 2009).

Em 1996, Lee e colaboradores descobriram o gene supressor de câncer, *KISS1*, em Hershey (Pensilvânia), e assim o nomearam em homenagem ao famoso chocolate Hershey Kisses. Para isto, transferiram o gene *KISS1* a células cancerígenas, clonando-as e separando-as para maior ou menor expressão do mesmo. Sequencialmente, o transferiram intravenosa (iv) ou subcutaneamente a camundongos e identificaram que os animais que apresentavam menor expressão do gene foram aqueles com mais metástases. Menos de um ano após, Lee e Welch (1997) demonstraram que *KISS1* tem a capacidade de suprimir em até 95% a metástase da linhagem de células MDA-MB-435 de carcinoma de mama humano. Estes estudos resultaram em uma das mais promissoras descobertas na pesquisa do câncer, o que justifica o grande suporte financeiro que tem havido nesta área, visto que, o entendimento da regulação da metástase com base molecular se faz necessário para o

desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico, prognóstico e terapia de câncer.

O *Kiss1* codifica uma proteína hidrofóbica de 145 aminoácidos (Kotani et al. 2001), a qual pode ser clivada em sequência de 54 aminoácidos (Figura 2), originalmente chamada de metastina devido à sua habilidade em inibir a metástase das células de melanoma (Ohtaki et al. 2001). Estes mesmos autores observaram que a metastina é sintetizada por vários tecidos sendo principalmente placenta, testículo, pâncreas e intestino delgado.

Por conveniência, a metastina-54 e suas formas menores 14, 13 e 10; (Figura 2) foram nomeadas kisspeptinas, visto que, derivam do mesmo gene *Kiss1* (Kotani et al. 2001). Quanto menor a kisspeptina, menor a variação entre as espécies. A kisspeptina-10, com peso molecular de 1,3 kDa, em roedores, ruminantes, equinos (Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH₂) difere em apenas um aminoácido do decapeptídeo em humanos e primatas (Kotani et al. 2001, Muir et al. 2001, Ohtaki et al. 2001, Roa e Tena-Sempere 2007).

Estudos funcionais mostram que todas as kisspeptinas são altamente potentes em relação à ativação do seu receptor Kiss1r, sendo que as formas mais curtas são mais ativas que a kisspeptina-54 (Muir et al. 2001, Kotani et al. 2001, Terao et al. 2004). Esses receptores de proteína-G acoplada constituem a maior família dos receptores de membrana (Bockaert e Pin, 1999).

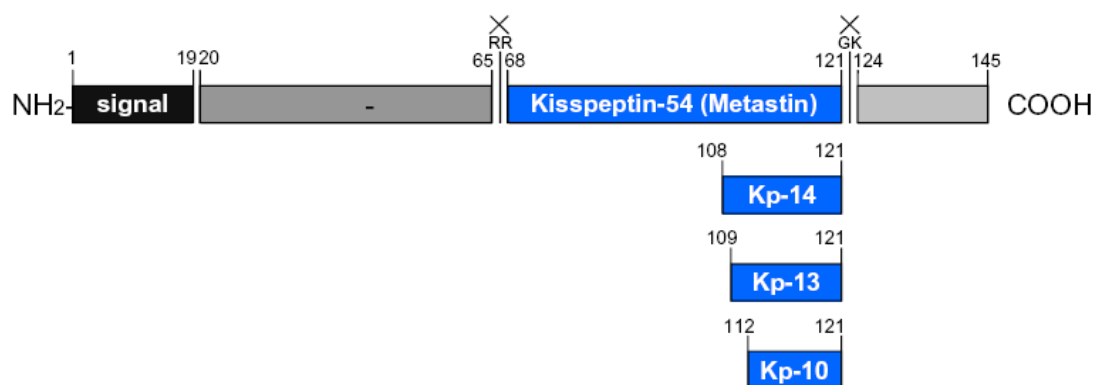


Figura 2. Estrutura das kisspeptinas, produto do gene *Kiss1*. Diferentes kisspeptinas são geradas pela clivagem proteolítica de um precursor comum de 145 aminoácidos. A pré-kisspeptina contém 19 aminoácidos, e há uma região central de 54 aminoácidos, kisspeptina-54. Formas de baixo peso molecular incluem a kp-14, kp-13 e a kp-10. A porção final da cadeia corresponde à C-terminal 10 aminoácidos de comprimento que contém o RF-amido, fator suficiente para ativar o Kiss1r (Roa et al., 2008)

Após cinco anos da descoberta de Seminara et al. (2003), aproximadamente 150 artigos originais haviam sido publicados na área, o que causou confusão quanto ao estabelecimento da nomenclatura. Por exemplo, com referência apenas ao receptor, o mesmo pode ser encontrado como AXOR12, hOT7T175, GPR54, *KISS1R*, *KiSS1*. Assim, para uniformidade foi estabelecido que *KISS1* e *Kiss1* seriam usados para o nome do gene em humanos e não-humanos, respectivamente (Gottsch et al. 2009). Da mesma forma, o receptor GPR54 seria chamado KISS1R ou Kiss1r dependendo da espécie. O peptídeo, produto do gene *KISS1*, seria referido como kisspeptina (Kp), com um extensão numérica para indicar o comprimento do peptídeo (Kp-54, Kp-14, Kp-13 e Kp-10) quando considerado relevante.

Distribuição hipotalâmica de neurônios expressando Kiss1 e contendo kisspeptina

Pela hibridização *in situ*, foi feito um mapeamento do hipotálamo de diferentes espécies para identificar a distribuição de células expressando RNAm *Kiss1*. Em roedores foi observada maior concentração no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), POA anterodorsal, *bed nucleus* da *stria terminalis*, PEV e ARC (Gottsch et al. 2004, Smith et al. 2005). Em primatas, a expressão de *Kiss1* ou presença de kisspeptina em neurônios foi observada na POA e ARC (Shahab et al. 2005); e em ovelhas na POA, PEV, DMH e ARC (Pompolo et al. 2006, Franceschini et al. 2006, Redmond et al. 2009).

Em ovinos foi encontrada maior densidade da rede de axônios (ou varicosidades) imunoreativos a Kp no ARC e na zona interna da ME, projetando para os capilares sanguíneos desta região, e menor densidade na POA, PEV e DMH (Franceschini et al. 2006).

O papel fisiológico da kisspeptina/Kiss1r na função reprodutiva

Os primeiros indícios de uma relação entre kisspeptina e reprodução foram observados por meio de análises genéticas em humanos e roedores, que revelaram que mutações causando a perda da funcionalidade do gene codificador do Kiss1r foram associadas a atraso no início da puberdade e

hipogonadismo-hipogonadotrófico, causado pela deficiência de GnRH (de Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003). Essa descoberta, de que um simples receptor tem um efeito tão profundo na puberdade, intensificou as pesquisas na busca do entendimento de como é feita a ativação do eixo HHG e o início da puberdade. As células produtoras de kisspeptina no hipotálamo são consideradas o fator que faltava no *feedback* de esteróide sexual no controle da secreção de GnRH.

Atualmente, é bem estabelecido que a Kp-10 despolariza neurônios secretores de GnRH, estimulando a liberação deste e de gonadotrofinas (Pielecka-Fortuna et al. 2008, Han et al. 2005). Estudos imunohistoquímicos mostraram que o Kiss1r co-localiza com o GnRH nos neurônios, sugerindo assim que a kisspeptina atua diretamente nesses neurônios (Messenger et al. 2005). No mesmo trabalho, houve administração intraperitoneal de kisspeptina em camundongos, e foi observado um aumento na secreção de LH e FSH, assim como a administração intracerebroventricular (icv) de kisspeptina com grande liberação de GnRH. Quantidade minúscula (pmol) de kisspeptina tem uma capacidade poderosa de liberar GnRH/gonadotrofinas (principalmente LH) não só em roedores (Gottsch 2004, Irwig et al. 2004, Matsui et al. 2004, Navarro et al. 2004, Thompson et al. 2004), mas também em várias espécies incluindo ovinos (Messenger et al. 2005, Redmond et al. 2011), primatas (Dhillon et al. 2005, Shahab et al. 2005), bovinos (Kadokawa et al. 2008) e suínos (Lents et al. 2008). Foi observado que além da Kp-10, a Kp-52 quando administrada iv (3 nmol/kg) tem capacidade similar de liberar picos de 6 ng/mL

de LH (Tovar et al. 2006). A ação direta da Kp é feita não só no pericario dos neurônios contendo GnRH, mas também nas terminações nervosas dos mesmos, localizadas na ME (Pineda et al. 2010).

Recentemente, foi evidenciado que além do efeito direto da Kp nos neurônios que contém GnRH, há também ações em que a Kp ativa vias indiretas de liberação GnRH, como o sistema glutamato e GABA (Pielecka-Fortuna e Moenter 2010). Estes efeitos diretos ou indiretos da Kp na liberação de GnRH ainda não são compreendidos e precisam ser caracterizados; entretanto, dão substrato ao fato da Kp ser o mais potente estimulador da liberação de GnRH.

A Kp também atua na hipófise, com ação direta nos gonadotrofos, promovendo liberação de LH. Isto foi observado *in vitro* em cultura de hipófise de roedor (Gutiérrez-Pascual et al. 2007). Da mesma forma, gonadotrofos, lactotrofos e somatotrofos de ovelhas expressam Kiss1r (Smith et al. 2008). Estes últimos autores observaram aumento de 80% na quantidade de LH liberado em cultura de células de hipófise obtidas na fase folicular do ciclo estral, na presença de meio enriquecido com Kp, embora não observado *in vivo*.

Kisspeptina como reguladora da puberdade

O eixo HHG é controlado centralmente por uma complexa rede regulatória de sinais inibitórios e estimulatórios que são ativados na puberdade. Por definição, puberdade é a transição de imaturidade para maturidade sexual expressa pela capacidade fértil de um animal, ou seja, em fêmeas é o período em que há a manifestação do primeiro comportamento de estro, seguida de ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo (Kinder et al. 1995). Em mamíferos, os eventos neuroendócrinos que levam ao início da puberdade envolvem o aumento da liberação pulsátil de GnRH e LH. A ativação do eixo HHG durante a maturação puberal envolve o aumento da tonicidade de Kp endógena, assim como a sensibilidade de Kiss1r ao efeito estimulatório de Kp na liberação de GnRH/LH (Pineda et al. 2010).

Em novilhas pré-púberes, a administração iv de Kp-10 induz a liberação de LH e GH (Kadokawa et al. 2008). No mesmo sentido, Redmond et al. (2011) observaram que ovelhas pré-púberes são responsivas a injeções iv de Kp-10, resultando em aumento da frequência e da amplitude dos pulsos de LH assim como sua concentração média. Como consequência, quatro das seis ovelhas do tratamento Kp-10 apresentaram pico pré-ovulatório de LH, com consequente ovulação, ao contrário de todos os animais do grupo controle (solução salina). Estes dados indicam que a ativação dos neurônios contendo Kp estão envolvidos na maturação puberal do eixo HHG.

Outro fator desencadeante da puberdade seria a ação direta da Kp na hipófise de animais peripuberais, visto que, há aumento da expressão de Kiss1r em células hipofisárias desses indivíduos cultivadas *in vitro* (Gutiérrez-Pascual et al. 2007).

Regulação dos neurônios secretores de kisspeptina

A idéia de que outros neurônios, não os que contém GnRH, mediavam o *feedback* de esteróides gonadais, iniciou-se após a identificação da não expressão de receptores de progesterona (Skinner et al. 2001) e estrógeno β (Er_{β}) (Petersen et al. 2003) pelos neurônios secretores de GnRH.

Posteriormente, foi conduzido um estudo em camundongo (Smith et al. 2005) para avaliar se o estradiol (E_2) tem papel na regulação da expressão de RNAm *Kiss1*. Para isso, utilizaram-se fêmeas com ovário intacto (diestro), fêmeas ovariectomizadas (OVX) e fêmeas OVX tratadas com E_2 . Assim, observou-se que há aumento na expressão de *Kiss1* no ARC após a ovariectomia e diminuição com o tratamento com E_2 . Entretanto, na área AVPV (referente à POA de ruminantes e primatas) a expressão de *Kiss1* foi reduzida após a ovariectomia e aumentada após o tratamento com E_2 . Além do mais, animais OVX com ausência de Er_{α} (deleção do gene para o receptor) não respondem ao tratamento com E_2 , seja no ARC ou AVPV. Por outro lado, animais OVX com ausência de Er_{β} , respondem normalmente ao tratamento

com E₂. Assim, neurônios *Kiss1* no ARC são inibidos pelo E₂ e têm papel no *feedback* negativo regulatório da secreção de GnRH, enquanto neurônios *Kiss1* na AVPV são estimulados pelo E₂ e participam do *feedback* positivo regulatório da secreção de GnRH.

Indiretamente, Pielecka-Fortuna e Moenter (2010) estabeleceram que a Kp medeia o *feedback* de E₂ visto que, o aumento de E₂ habilita o sistema Kp – GABA/glutamato – liberação de GnRH.

3.5 Mediadores metabólicos e neuroendócrinos com efeito nos eventos reprodutivos

Uma vez que animais sob estresse metabólico devem investir sua energia inicialmente na sobrevivência e a seguir na reprodução, o eixo reprodutivo tem a capacidade de responder a mudanças no *status* calórico. Na verdade, cada órgão do eixo reprodutivo, seja o hipotálamo, a hipófise ou as gônadas, têm capacidade de responder aos estímulos metabólicos. Não seria produtivo a reprodução sem nenhum estoque energético para assegurar a sobrevivência da cria. Assim, o SNC em sincronia com os órgãos reprodutivos monitoram o *status* energético e limitam a fertilidade a momentos de reserva energética adequada. Vários hormônios metabólicos e mediadores neuroendócrinos são reconhecidos como sinais importantes ligando as

reservas energéticas à reprodução, como a leptina, a insulina, os hormônios da tireóide, o peptídeo semelhante à galanina, o NPY, dentre outros

Leptina

O controle central da reprodução requer que o hipotálamo receba informações a respeito do *status* energético do animal. É necessária sensibilidade hipotalâmica a sinais hormonais secretados na circulação em relação às reservas adiposas do corpo; neste sentido atua a leptina.

O gene da leptina (*ob*) foi identificado em 1994, em camundongos que apresentavam mutação para este gene, expressando o genótipo *ob/ob*, e que se destacavam por serem animais de extrema obesidade e inférteis (Zhang et al. 1994). Posteriormente, observou-se que tratamento com leptina recuperava a fertilidade de animais *ob/ob* (Barash et al. 1996).

A leptina é um hormônio protéico de 167 aminoácidos (16kDa), derivado do gene *ob* com uma sequência amino-terminal de 21 aminoácidos. Em ruminantes, a leptina é sintetizada e secretada principalmente por adipócitos (Chilliard et al. 2001), embora a expressão de seu gene *ob* tenha sido observada em tecidos fetais (Ehrhardt et al. 2002), glândula mamária (Bonnet et al. 2002, Smith e Sheffield 2002), rumen, abomaso e/ou duodeno (Yonekura et al. 2002) e adenohipófise (Yonekura et al. 2003).

A leptina está envolvida com o controle da homeostase, ingestão, armazenamento e metabolismo energético, funções imunológicas assim como

importante sinal nos órgãos reprodutores, comunicando o *status* nutricional ao SNC (Kershaw e Flier 2004, Ahima et al. 2000). A ativação do eixo HHG pode ser desencadeada pela ação central da leptina, estimulando a liberação de FSH e LH da hipófise (McCann et al. 1998). A leptina atua no hipotálamo e hipófise, e há uma variação quanto a espécie, observada quando camundongos bem alimentados respondem ao aumento da leptina com liberação de GnRH/LH/FSH (Yu et al. 1997). Entretanto, em vacas ovariectomizadas, a leptina aumenta a concentração de LH somente em animais sob restrição alimentar (Amstalden et al. 2002), tendo efeito limitado em bovinos bem nutridos (Amstalden et al. 2005). O receptor de leptina (Lr) é encontrado em vários tecidos como o hipotálamo, hipófise e tecido adiposo (Dyer et al. 1997), entretanto, os neurônios contendo GnRH não expressam Lr (Finn et al. 1998), sugerindo uma ação interneuronal na liberação de GnRH. Esta ação poderia ocorrer via neurônios que contém Kp, que são alvos da leptina por expressarem LR, onde uma menor concentração de leptina diminui a expressão do gene *Kiss1* no ARC (Smith et al. 2006).

Insulina

A insulina é o hormônio protéico central na regulação do metabolismo de energia e glicose. Seu estímulo secretório inclui a ingestão de proteína ou aumento da glicose sanguínea após a ingestão de alimento, e promove o

armazenamento celular desta energia ingerida. Em mamíferos é sintetizada pelas células β das ilhotas de pancreáticas (Cunningham e Klein 2008).

A função da insulina não é apenas refletir o *status* de reservas de energia, mas também transmitir essa informação metabólica ao sistema neuroendócrino que controla a função reprodutiva (Krasnow e Steiner 2006). Aplicações agudas de insulina icv não alteram o padrão de liberação de LH (Hileman et al. 1993). Estes últimos autores mostraram que o aumento da ingestão de alimentos é associada ao aumento na média e frequência de pulsos de LH e insulina. Assim, se somente a injeção icv de insulina não causa alterações no LH, mas a alimentação o faz, fica claro que o sinal metabólico não parte apenas da insulina, e sim da ativação de outras vias.

Fator de crescimento semelhante à insulina – 1

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) é um peptídeo produzido em órgãos de significância reprodutiva como hipotálamo, ovários, tuba uterina e útero (Watson et al. 1999, Daftary e Gore 2005). Entretanto, a maior parte da IGF-1 mensurada no sangue é originada do fígado (Yakar et al. 1999). O estímulo para síntese e liberação de IGF-1 pelo fígado é feito pelo GH (Butler e Roith 2001).

Em bovinos, o IGF-1 tem influência no desenvolvimento folicular e luteal, atuando nas células luteais, da granulosa e da teca (Perks et al. 1999).

Também é observado o efeito central do IGF-1 no eixo hipotalâmico-hipofisário, visto que, o IGF-1 aumenta a quantidade de GnRH ligado a gonadotrofos da hipófise de bovinos, aumentando significativamente a liberação de LH (Hashizume et al. 2002). Em novilhas, é observado que há aumento gradual na concentração sanguínea de IGF-1 conforme a puberdade se aproxima (Yelich et al. 1996).

Hormônios da tireóide

O TSH é produzido pela hipófise e atua nas células da tireóide estimulando-as a produzir e secretar seus hormônios (tiroxina e triiodotironina). Os hormônios da tireóide são conhecidos por atuarem no metabolismo, crescimento e reprodução, sendo essenciais na regulação da sazonalidade. Em ovelhas, a secreção de tiroxina após o início da atividade reprodutiva é requerida para uma mudança endógena no eixo neuroendócrino, levando a um *feedback* negativo de E_2 intensificado no fim da estação reprodutiva (Webster et al. 1991b). Assim, animais tireoidectomizados continuam com pulsatilidade normal de GnRH, falhando no estabelecimento do anestro fisiológico no fim da estação reprodutiva (Webster et al. 1991a). Animais com hipotireoidismo têm disfunção no ciclo estral e na dinâmica folicular, entretanto, o tratamento com triiodotironina restabelece a função reprodutiva normal (Ortega et al. 1990).

Neuropeptídeo Y

O neuropeptídeo Y (NPY) foi descoberto em 1982 por Tatemoto et al. (1982), isolado de extrato de cérebro suíno e caracterizado como um peptídeo de 36 aminoácidos amplamente distribuído pelo SNC tanto de vertebrados como de invertebrados. No cérebro, é encontrado principalmente no córtex, putâmen caudal e hipocampo (Danger et al. 1990). No hipotálamo, os axônios de NPY são encontrados no PAV, núcleo supraquiasmático (SQM) e com maior densidade no ARC, onde se encontram também corpos celulares, e na ME (Pelletier 1990). Os vários efeitos do NPY são mediados pela ativação de pelo menos cinco subtipos de receptores transmembrana acoplados à proteína-G, denominados Y₁, Y₂, Y₄, Y₅ e Y₆ (Michel et al. 1998).

O NPY é conhecido como um dos mais potentes neuropeptídios orexigênicos, envolvido diretamente no comportamento de consumo em mamíferos. Assim, o NPY é ativado no hipotálamo em situações de jejum, estímulo de fome e comportamento de busca de comida (Morton e Schwartz 2001). Para ilustrar a capacidade orexigênica do NPY Miner et al. (1989) injetaram esse peptídeo diretamente no ventrículo lateral e nessas condições experimentais observaram um aumento em torno de 809% o consumo de comida, além de elevar significativamente o consumo de água. Adicionalmente, a concentração de NPY é elevada no liquor de animais mal nutridos (McShane et al. 1992). No hipotálamo, a expressão do RNAm de NPY é reduzida pela leptina, além do mais, neurônios contendo NPY expressam receptor de leptina,

demonstrando serem alvos diretos da ação da leptina (Ahima et al. 1996, Håkansson et al. 1996, Finn et al. 1998, Baskin et al. 1999).

Atualmente, é bem aceito o fato do NPY influenciar a liberação de GnRH/LH, porém por mecanismo não bem compreendido. Por meio de técnica de imunohistoquímica dupla para detecção de NPY e GnRH foi observado que fibras contendo NPY estão em contato próximo com neurônios que secretam GnRH na POA (Tillet et al. 1989), e essas fibras são prolongamentos dos corpos celulares da população de células de NPY do ARC (Li et al. 1999). Da mesma forma, fibras de NPY estão em contato muito próximo com as terminações nervosas dos neurônios que secretam GnRH na ME, evidenciando uma possível função do NPY na modulação da secreção de GnRH nesta região (Li et al. 1999). Outra evidência do papel do NPY na modulação direta ou indireta da liberação de GnRH foi a observação de receptores de NPY Y_5 nos neurônios contendo GnRH e GABA (Campbell et al. 2001).

Em novilhas, cultivo *in vitro*, com NPY, de células da hipófise na fase luteal, folicular ou provenientes de animais ovariectomizados, não interfere na liberação de LH, sugerindo que o efeito do NPY no eixo reprodutivo deve ocorrer primariamente no hipotálamo (Denniston et al. 2003), o que foi posteriormente observado em suínos (Barb e Barrett 2005). A administração de NPY no hipotálamo suprime o eixo reprodutivo causando atraso na maturidade sexual (Pierroz et al. 1995), e em tratamento crônico causa distúrbios ao ciclo estral (Toufexis et al. 2002). O NPY participa do *feedback* de E_2 no hipotálamo, visto que, em ovelhas, 10% dos neurônios que contém NPY do ARC

apresentam Er (Skinner e Herbison 1997). Infusão icv de NPY em ovelhas e vacas ovariectomizadas com ou sem reposição de E₂, causa atenuação da frequência e dos pulsos de LH, chegando à supressão da secreção de LH, sendo o efeito do NPY no hipotálamo e não na hipófise (Malven et al. 1992, Thomas et al. 1999, Estrada et al. 2003).

Em roedores, esteróides gonadais modulam diretamente a secreção de NPY em uma sub-população de neurônios do ARC, estimulando a liberação hipotalâmica de NPY (Sar et al. 1990). Ao contrário de outros animais, em roedores o NPY parece estimular a secreção de LH quando em presença de esteróides. Assim, animais imunizados contra NPY e recebendo estradiol e progesterona icv, não expressam aumento na concentração de LH, ao contrário de animais não imunizados (Wehrenberg et al. 1989).

O aumento da atividade do NPY durante a hiperfagia crônica na lactação em função do balanço energético negativo, é um dos mecanismos responsáveis pela supressão da atividade neuronal do GnRH (Xu et al. 2008). Assim, o NPY se mostra como importante sinalizador nutricional aos eventos reprodutivos. Entretanto, isto se dá de forma complexa e muito pouco compreendida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental envolvendo animais foi realizada no *Physiology Field Laboratory of Animal Science Department (Texas A&M University)*, durante a estação reprodutiva do hemisfério Norte (Novembro/2008-Fevereiro/2009). Todos os procedimentos com animais utilizados neste estudo foram aprovados pelo *Institutional Agricultural Animal Care and Use Committee of the Texas A&M University System*, protocolo AUP 2001-245.

Animais e procedimento de ovariectomia

Foram utilizadas três ovelhas adultas cruzadas, mestiças Suffolk com boa condição corporal e cíclicas, sendo criadas em condições intensivas em galpões cobertos. As ovelhas foram mantidas sob regime de iluminação que simulava a natural (12 h de luz), recebendo ração para manutenção do peso corporal e água, *ad libitum*.

Foram efetuadas ovariectomias um mês antes da coleta de material. O procedimento foi realizado por laparotomia paramediana. Antes da intervenção cirúrgica, o animal foi devidamente sedado, tricotomizado e feita assepsia da pele com subsequente anestesia geral inalatória utilizando isoflurano. Após incisão paramediana, os ovários foram localizados, isolados e seccionado os hilos ovarianos com retirada dos ovários; peritônio, músculo, tecido subcutâneo

e pele foram suturados em planos distintos. Antes de finalizar a sutura de pele, foi introduzido no tecido subcutâneo um implante de 40 mm de comprimento, contendo uma coluna de 10 à 15 mm de E₂ 17-β cristalino (Figura 1). Este implante de E₂ foi desenvolvido para produzir concentrações circulantes basais de E₂ de aproximadamente 2 pg/mL. Visto vez, que a kisspeptina medeia o *feedback* de estradiol na liberação de GnRH no hipotálamo, ou seja, a expressão do RNAm de kisspeptina é aumentada ou diminuída em função da concentração de E₂ circulante (Smith et al. 2007, Tomikawa et al. 2010), faz-se necessário o controle do E₂ sanguíneo.

Após a cirurgia foi administrado 2,2 mg/kg de flunixinina meglumina (Banamine[®], Schering-Plough Animal Health Corporation, USA) e 40.000 UI de penicilina, ambas injeções intramusculares. Para a recuperação da cirurgia, os animais foram mantidos em um galpão aberto com boa condição higiênica.



Figura 3. Implante subcutâneo de estradiol contendo em seu interior uma coluna de 10 mm de estradiol 17-β cristalino em pó.

Coleta de sangue e radioimunoensaio para estradiol

Aproximadamente um mês após a cirurgia e imediatamente antes da eutanásia, foi coletado sangue da veia jugular em tubo com vácuo. As amostras foram mantidas caixa isotérmica com gelo até a centrifugação a 1500 x g por 20 min à 4 °C. Posteriormente o soro foi retirado e estocado em tubos plásticos à -20°C até o dia do processamento em radioimunoensaio (RIA) para determinação do E₂ circulante, utilizando kit comercial de estradiol duplo anticorpo (*Estradiol double antibody*[®]; Siemens, Los Angeles, USA) . Para isto, foi necessário extrair o E₂ da amostra, não só para aumentar a massa de estradiol a ser mensurado, visto que, a concentração na amostra é muito baixa, mas também porque proteínas séricas interferem no ensaio. Para o processo de extração utilizou-se 1 mL do soro e referências do kit em 4 mL de éter metil-terciário butílico (MTBE). O solvente foi extraído utilizando nitrogênio gasoso, e os extratos foram reidratados com 200 µL do calibrador “0” do kit de RIA, e mantidos à 4 °C.

O RIA foi efetuado conforme instruções do fabricante, com a adição de 1 pg/mL de solução padrão. A concentração de E₂ foi determinada em um único ensaio, o qual alcançou 35% de ligação a B/O e limite de detecção de 0,5 pg/tubo a 93% de ligação. A eficiência da extração foi de 76% e a estimativa de extratos brancos tiveram média de 99,8% de ligação. O coeficiente de variação intraensaio foi de 8,8%.

Eutanásia e coleta de tecido cerebral

O processo de eutanásia consistiu da injeção de duas doses de heparina de 25.000 UI cada, por via iv (pela veia jugular), com 10 minutos de intervalo. Após isto, os animais receberam uma overdose de pentobarbital sódico (10 mL de Beuthanasia-D; Schering-Plough Animal Health Corp., Union, MJ). Com a confirmação da morte dos animais pela ausência de batimentos cardíacos e movimentos respiratórios, as ovelhas foram decapitadas. Utilizando-se uma bomba peristáltica, foi feita a perfusão da cabeça por ambas artérias carótidas, com 6 litros de tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,3) contendo 4% de paraformaldeído (PAF) e 0,1% de nitrito de sódio.

Após a perfusão, foi feita a remoção do cérebro. Para isto a caixa craniana foi serrada no osso frontal partindo de um ponto medial entre os forames supra-orbitais, atingindo a porção média de ambos arcos zigomáticos e finalizando no ponto medial da porção caudal do osso occipital. O diencéfalo foi dissecado e um bloco de tecido contendo a região do septum, POA e o hipotálamo foi coletado para posteriores análises. Esse bloco de tecido foi armazenado em um recipiente com PAF a 4% por 12 horas a 4 °C, e depois colocado em uma solução crioprotetora de sacarose 30%. Após o tecido afundar até a base do frasco, indicando infiltração da sacarose. Posteriormente o tecido foi congelado por contato direto com gelo seco e foram feitas secções transversais de 50 µm utilizando um micrótomo com plataforma de congelamento. As secções foram separadas em quatro recipientes diferentes,

de forma que em cada um mantivessem 200 µm de distância entre si, em uma sequência rostro-caudal. Os cortes histológicos foram armazenados a -20 °C em solução crioprotetora, composta por NaCl, polivinilpirrolidona, etilenoglicol e sacarose, até serem processadas para detecção de kisspeptina e NPY por imunofluorescência.

Imunofluorescência dupla para detecção de NPY e kisspeptina

O tecido foi processado para imunofluorescência de dupla marcação para NPY e kisspeptina. Para isso, em uma bandeja contendo PB 0,2 M, as secções foram organizadas em sentido rostro-caudal, e selecionadas desde o início da formação da comissura rostral até o desaparecimento do fórnix.

O processo de imunofluorescência foi realizado em temperatura ambiente, com as secções flutuantes no meio imunohistoquímico. Para isto, foram utilizadas placas multipoços sobre um agitador, em velocidade baixa para que a agitação se procedesse sutilmente e nenhuma secção aderisse na parede dos poços. O protocolo de imunofluorescência foi dividido em três dias; no dia 1, as secções selecionadas foram lavadas em PB 0,1 M com 0,9% de NaCl (PBS) por quatro horas para remover o crioprotetor. Posteriormente o tecido foi incubado em PBS contendo 4% de soro normal caprino (NGS; Jacson Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) e 0,4% de Triton-X100 (TX, Sigma, St Louis, MO, USA) por uma hora. Após este período, o tecido foi incubado

durante a noite (~16 h) em temperatura ambiente, em anticorpo de coelho anti-kp-10 de camundongo (Caraty #564, INRA/Universite´ Tours, Nouzilly, France) diluído em PBSTX + 4% NGS na proporção de 1:100.000.

No dia 2, o tecido foi lavado três vezes em PBS, por cinco minutos cada, e incubado por uma hora em IgG caprina biotinizada anti-IgG de coelho (Vector Labs Cat #BA-1000) diluída em PBSTX + 4% NGS na proporção de 1:400. Após este processo, o tecido foi lavado três vezes em PBS, por cinco minutos cada. A partir deste ponto, as placas foram protegidas de luminosidade e incubadas por 30 minutos no fluorocromo Alexa 555 conjugada com streptavidina (Molecular Probes Cat. # S-21381) diluída em PBS na proporção de 1:250. Sequencialmente, foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada, em PBS para retirada de todo meio com fluorocromo. Após uma hora de incubação do tecido em PBSTX + 4% NGS, essas secções foram então incubadas em anticorpo de coelho anti-NPY (Sigma, Cat # N9528), na diluição de 1:50.000 em PBSTX + 4% NGS, durante a noite (~16 h) em temperatura ambiente.

No dia 3, o tecido foi lavado por três vezes, cinco minutos cada, em PBS e incubado por 30 minutos no fluorocromo Alexa 488 conjugado com IgG caprina anti-coelho (Molecular Probes Cat. # A-11070), diluído em PBS a 1:200. As secções foram novamente lavadas por 3 vezes, cinco minutos cada, montadas em lâminas de vidro, secas, cobertas com lamínula usando gelvatol, e armazenadas sob proteção de luz a 4°C até a análise microscópica (tempo mínimo de uma semana e máximo de 3 meses para análise das lâminas).

O teste controle incluiu omissão de cada anticorpo primário do protocolo de dupla marcação. O objetivo de se omitir o anticorpo primário é verificar se o secundário reage especificamente. A confirmação da falta de colocalização dos dois antígenos evidenciou que não houve reação cruzada (Ramos-Vara 2005). O teste de pré-absorção foi realizado para medir a capacidade do anticorpo se ligar ao antígeno. Para isto, foi preparada uma solução com anticorpos contra kisspeptina ou NPY com concentrações do peptídeo purificado correspondente ($Kp = 0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; $NPY = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e mantidas em repouso por 24 horas a 4°C . Esta solução foi posteriormente filtrada e utilizada no protocolo em substituição à solução de anticorpo primário, em secções da POA e do ARC. O resultado foi ausência de coloração para o antígeno testado, enquanto para o outro peptídeo não houve efeito.

Análises

As secções de tecido hipotalâmico foram observadas em um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Inc., Melville, NY, USA). A kisspeptina, com coloração vermelha, foi analisada em um filtro de emissão de 567 nm, enquanto o NPY (verde) foi observado com um filtro de 505 nm. Nas secções da POA e ARC nas regiões rostral, médio e caudal foram contados: número de corpos celulares imunorreativos à kisspeptina (kp10-ir); número de varicosidades contendo imunoreatividade ao NPY (NPY-ir) em

contato próximo com corpo celular ou dendritos kp10-ir; densidade das fibras NPY-ir em diferentes regiões estudadas em escala de 1 (+) à 4 (++++). O contato próximo foi definido como a aposição direta entre as varicosidades contendo NPY-ir e o corpo celular ou dendrito kp10-ir no mesmo plano focal em magnificação de 400X. Também foram observados os corpos celulares NPY-ir.

As imagens das secções duplamente marcadas para kisspeptina e NPY foram capturadas usando objetivas de 10X e 40X, com câmera monocromática de alta resolução (DS-Qi1Mc, Nikon Inc., Melville, NY, USA) instalada no microscópio, utilizando o *software* NIS-Elements BR 3.00 (SP3, Hotfix2, Laboratory Imaging, Nikon, Melville, NY, USA). As imagens digitais foram importadas ao Adobe Photoshop (CS3 Extended, version 10.0.1, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) para composição das figuras, e ajustes de brilho e contraste.

As células quantificadas foram usadas para calcular a percentagem média de corpos celulares ou dendritos kp10-ir que estão em contato próximo com varicosidades de NPY. No presente estudo, os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

A concentração de estradiol sanguíneo observada foi de $3,7 \pm 0,7$ pg/mL.

Embora não realizando um trabalho morfométrico, Franceschini et al. (2006) descreveram o corpo celular de kp10-ir como sendo piriforme, geralmente com um dendrito principal curto, similar ao presente estudo (Figura 4). A imunoreatividade foi claramente citoplasmática e detectável no corpo celular e axônio (Figura 4). No total, foram analisadas 3.037 células imunorreativas para kisspeptina, sendo que 837 dessas estavam com seu dendrito ou corpo celular em contato próximo a axônios contendo NPY (Tabela 1).

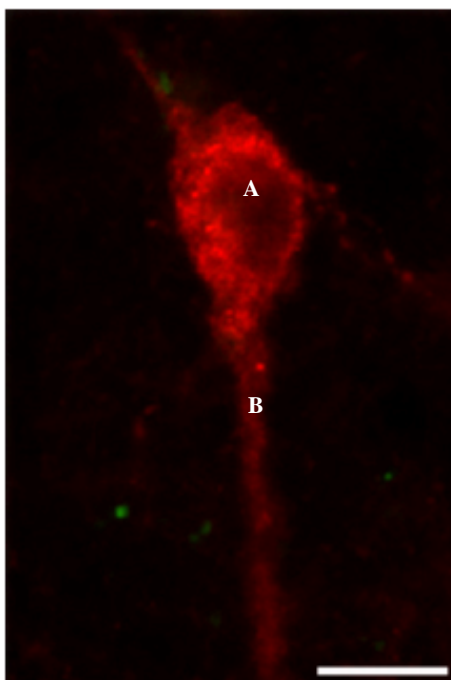


Figura 4. Corpo celular imunoreativo à kisspeptina-10 no núcleo arqueado do hipotálamo de ovelha ovariectomizada e com implante de E₂. A) Corpo celular e B) dendrito imunoreativo à kisspeptina. Barra: 20µm

Tabela 1. Distribuição dos corpos celulares imunorreativos para kisspeptina (kp10-ir), número de contatos próximos entre axônios contendo NPY e corpos celulares ou dendritos kp10-ir, e densidade das fibras contendo NPY na área pré-óptica (POA) e núcleo arqueado (ARC) rostral, médio e caudal, de ovelhas ovariectomizadas com implante de estradiol.

	POA	ARC			Total
		Rostral	Médio	Caudal	
Corpos celulares de neurônios kp10-ir	265	242	1624	906	3037
NPY: contato próximo a corpos celulares kp10-ir	27 (10%)	104 (43%)	346 (21%)	253 (28%)	730 (24%)
NPY: contato próximo com dendritos kp10-ir	2 (0,8%)	33 (14%)	88 (5%)	72 (8%)	195 (6%)
Densidade das fibras contendo NPY	++	++++	++++	++++	

+ baixa densidade de fibras contendo NPY

++++ alta densidade de fibras contendo NPY

Na POA, os corpos celulares e fibras kp10-ir se apresentavam dispersos e em menor densidade e imunoreatividade que no ARC. As varicosidades kp10-ir e NPY-ir foram encontradas em alta densidade na ME, projetando-se ao redor de pequenos capilares na zona externa. A população de corpos celulares kp10-ir no ARC é aproximadamente dez vezes maior que na POA (Tabela 2), neste modelo animal. Essas células estão mais concentradas no ARC médio,

em uma rede densa de axônios, e seu padrão de distribuição foi similar entre as três ovelhas (Figura 5).

Tabela 2. Número de corpos celulares imunorreativos à kisspeptina (média \pm DP), percentagem de células e dendritos em contato com fibras de NPY, média de contatos por corpo celular ou dendrito de kisspeptina na área pré-optica (POA) e núcleo arqueado (ARC) de ovelhas ovariectomizadas com implante de estradiol.

	POA	ARC
Corpos celulares de neurônios kp10-ir	88,0 \pm 130,0	924,0 \pm 351,7
NPY: contato próximo a corpos celulares kp10-ir (%)	26,8 \pm 16,9	27,6 \pm 9,7
Média de contatos de NPY com corpo celular kp10-ir	1,6 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3
NPY: contato próximo com dendritos kp10-ir (%)	0,7 \pm 1,2	7,6 \pm 2,4
Média de contatos de NPY com dendritos kp10-ir	1,5 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1



Figura 5. Imunofluorescência de dupla marcação para kisspeptina (vermelho) e NPY (verde) no ARC. Setas indicam corpos celulares imunorreativos à kisspeptina. Pontos verdes ou vermelhos indicam axônios imunorreativos ao NPY e à kisspeptina, respectivamente. O terceiro ventrículo está indicado por 3V. Barra: 100µm

A imunofluorescência de dupla marcação para kisspeptina e NPY nas áreas estudadas demonstrou que os dois peptídeos não se co-localizam. Na POA e no ARC foram encontrados contatos próximos entre fibras de NPY e corpos celulares ou dendritos de kp10-ir (Figura 6).

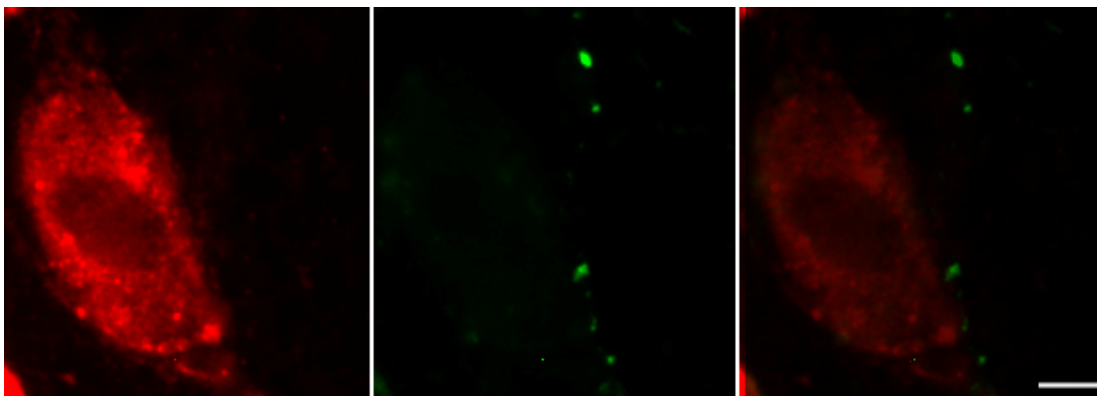


Figura 6. Imunofluorescência de dupla marcação para kisspeptina e NPY no e ARC de secção de 50 μm de espessura. Cada imagem representa o mesmo campo visual e plano focal com magnificação de 400X. A) Corpo celular contendo kisspeptina (em vermelho, Alexa 555); B) Axônio contendo NPY (em verde, Alexa 488), indicado pelas setas; C) Contato próximo entre axônio contendo NPY e o corpo celular e dendrito de kisspeptina, indicado pelas setas. Barra: 10 μm .

Em geral, 27,2% das células de kisspeptina estiveram em contato próximo com fibras de NPY, seja contato com corpo celular ou dendrito. O número médio de contatos de axônios de NPY por corpo celular de kisspeptina foi de 1,6 e 2,1 para POA e ARC, respectivamente (Tabela 2). Por outro lado, foi menor a proporção de dendritos de kisspeptina em contato a varicosidades contendo NPY, assim como o número de varicosidades de NPY em contato próximo a esses dendritos de kisspeptina sendo 1,5 e 1,6 contatos para POA e ARC, respectivamente (Tabela 2).

As células de kisspeptina no processo infundibular do ARC mostraram ter mais contatos com axônios de NPY que as células posicionadas dorsal ou lateralmente no ARC. Não foram observados corpos celulares de NPY na POA, ao contrário do ARC, principalmente na área periventricular e próxima à ME.

Axônios imunorreativos à NPY foram observados em cortes desde a banda diagonal até a parte caudal do ARC, sendo mais denso na região do ARC e ME que na POA. Em todos os níveis da ME e na região de transição entre ME e ARC, as fibras de kisspeptina e NPY mostraram estar intimamente associadas.

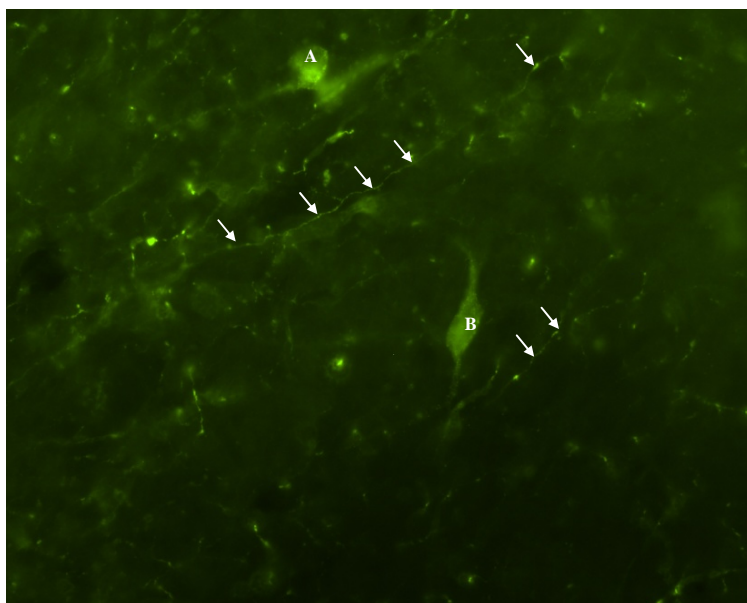


Figura 7. Imunofluorescência de secção na região do núcleo arqueado do hipotálamo de ovelha ovariectomizada com implante de E₂, utilizando o fluorocromo Alexa 488. Fluorescências verdes são reativas para anticorpo anti-NPY. Corpos celulares estão indicados pelas letras A e B, e as setas indicam axônios.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo determinou que axônios contendo NPY estão em contato próximo a corpos celulares e dendritos de uma subpopulação de

neurônios contendo kisspeptina na POA e hipotálamo de ovelhas. Isto indica que o NPY possa regular funções neuroendócrinas, atuando diretamente em neurônios secretores kisspeptina. O anticorpo primário utilizado na identificação de kisspeptina foi desenvolvido em coelhos imunizados com kisspeptina sintética de camundongo. Este antisoro tem a mesma origem daquele utilizado por Franceschini et al. (2006), os quais mapearam a distribuição de células kp10-ir no hipotálamo ovino. A reação cruzada com GnRH, galanina, substância P, NPY, CRH, α MSH, somatostatina e peptídeo liberador de prolactina foi menor que 0,0001%. No presente estudo não houve co-localização na mesma célula de imunoreatividade para kisspeptina e NPY.

A distribuição de células e fibras de kisspeptina na POA e hipotálamo foi, em geral, similar àquela reportada previamente em camundongos (Smith 2005), ratos (Kauffman et al. 2007), ovelhas (Franceschini et al. 2006, Goodman et al. 2007) e em macacos e humanos (Rometo et al. 2007). No presente estudo, células kp10-ir foram observadas em menor abundância na POA do que aquela descrita por Franceschini *et al.* (2006), talvez pelo fato de terem utilizado animais em final de fase luteínica e de terem aplicado colchicina antes do sacrifício, que inibe o transporte axoplasmático neuronal e conseqüentemente a exocitose das vesículas sinápticas, facilitando assim a identificação do peptídeo dentro da célula.

A ovariectomia seguida de implante de E₂ para a manutenção de concentrações basais deste esteróide, não permite que haja variação da concentração sanguínea de E₂ entre os animais, não havendo assim

interferência do *feedback* do esteróide na presença de kisspeptina nos neurônios (Smith et al. 2007). Com o RIA para estradiol, foi verificado uma concentração baixa (basal) deste esteróide na circulação, fato que valida o modelo experimental. A validação deste implante de E₂ no laboratório em questão foi feita via recente publicação de Redmond et al. (2011)

Estudos nos últimos 7 anos sugere fortemente que a regulação do GnRH pelo *feedback* de esteróides sexuais é predominantemente exercida por células de kisspeptina (Clarke et al. 2011), talvez pelo fato de virtualmente todas as células de kisspeptina do ARC expressarem Er α , visto que o Er α é isoforma crítica para o mecanismo de *feedback* positivo do estradiol (Wintermantel et al. 2006). Acredita-se que existem diferentes sub-populações de neurônios que contém kisspeptina no ARC, as quais participam tanto do *feedback* negativo quanto positivo de esteróide sexual no GnRH (Smith 2009). Células do ARC caudal aumentam a expressão de KISS1 RNAm na presença da onda pré-ovulatória de E₂ (Estrada et al. 2006). Por outro lado, neurônios dispersos nas outras partes do ARC aumentam a expressão de RNAm para *Kiss1* em ovelhas ovariectomizadas com implante de E₂ (Smith et al. 2007), sendo também observado no presente estudo, no qual foi possível identificar mais células kp10-ir no ARC médio que no ARC caudal.

Recentemente, foi publicado um trabalho mostrando evidência anatômica de proximidade de contato de axônios com kisspeptina com neurônios contendo NPY no ARC (Backholer et al. 2010). Entretanto, não foi apresentada a extensão dos contatos com relação aos neurônios que secretam

kisspeptina no ARC ou mesmo se estes contatos se estendiam na população da POA. No presente estudo analisou criteriosamente cada uma das 3.037 células kp10-ir, sendo que aproximadamente 27% destas, estavam contato próximo com fibras contendo NPY. Backholer et al. (2010) fez injeções icv de kisspeptina e observaram pela hibridização *in situ* um aumento da expressão do gene de NPY. Se kisspeptina realmente regulasse a liberação de NPY, animais *knockout* para kisspeptina perderiam peso (Clarkson et al. 2009, Clarkson et al. 2008). Entretanto isso não foi observado, ou seja, kisspeptina não alterou a ingestão de alimentos (Castellano 2005, Luque et al. 2007). Neste sentido específico, o referido trabalho (Backholer et al., 2010) não possui função fisiológica.

Existe um consenso geral de que a kisspeptina estimula a liberação de GnRH e LH (Irwig et al. 2004, Thompson et al. 2004, Caraty et al. 2007). Provavelmente, este estímulo é feito por células com kisspeptina que se projetam diretamente para células secretoras de GnRH na POA (Pompolo et al. 2005). Assim, um aspecto interessante do presente estudo foi a identificação de que 26,8% das células da população de kisspeptina da POA faz contato próximo com fibras de NPY. Desta forma, a população de neurônios secretores de kisspeptina na POA suporta um ligação entre metabolismo e reprodução nesta região.

Neste modelo animal, aproximadamente uma em cada três células de kisspeptina tanto, na POA como no ARC, estão em contato próximo com fibras de NPY. Além do mais, a comunicação entre NPY e kisspeptina ocorre

predominantemente no corpo celular que nos dendritos. Estas observações demonstram a interação parácrina e/ou sináptica entre células contendo NPY e kisspeptina. Estudo anterior (Li et al. 1999), mostrou que fibras de NPY estão em contato próximo a fibras contendo GnRH na ME, e sugerem o papel do NPY na modulação da secreção de GnRH via ações diretas. O presente estudo observou que axônios de NPY e kisspeptina estão em alta densidade e conseqüentemente proximidade circundando capilares na ME. Assim como com GnRH, NPY pode também estar atuando em terminais sinápticos de kisspeptina nesta região.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho evidenciam a existência de relação anatômica entre neurônios imunorreativos a kisspeptina e NPY na área pré-óptica e hipotálamo de ovelhas, utilizando imunofluorescência de dupla marcação. A proximidade de contato é de axônios com NPY com corpos celulares e dendritos contendo kisspeptina. Isto indica que a informação é no sentido NPY-kisspeptina, ou seja, NPY estaria regulando a liberação de kisspeptina. No presente estudo, as análises realizadas sugerem a possibilidade adicional de que a ação do NPY na inibição da liberação de GnRH pode ocorrer indiretamente via neurônios contendo kisspeptina, em momentos como pós-parto, pré-puberdade ou deficiência nutricional, evidenciando o papel da kisspeptina na sinalização do *status* nutricional ao eixo reprodutivo. O conhecimento completo destas interações neuroendócrinas propiciará futuramente o desenvolvimento de terapias farmacológicas ou estratégias de manejo buscando melhorar a saúde e eficiência reprodutiva.

8 REFERÊNCIAS

- Ahima R. S.; Prabakaran D.; Mantzoros C.; Qu D.; Lowell B.; Maratos-Flier E.; Flier J. S., 1996: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382 250-252.
- Ahima R. S.; Saper C. B.; Flier J. S.; Elmquist J. K., 2000: Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21 263-307.
- Amstalden M.; Garcia M. R.; Stanko R. L.; Nizielski S. E.; Morrison C. D.; Keisler D. H.; Williams G. L., 2002: Central Infusion of Recombinant Ovine Leptin Normalizes Plasma Insulin and Stimulates a Novel Hypersecretion of Luteinizing Hormone after Short-Term Fasting in Mature Beef Cows. *Biology of Reproduction*, 66 1555-1561.
- Amstalden M.; Harms P. G.; Welsh T. H.; Randel R. D.; Williams G. L., 2005: Effects of leptin on gonadotropin-releasing hormone release from hypothalamic-infundibular explants and gonadotropin release from adenohypophyseal primary cell cultures: further evidence that fully nourished cattle are resistant to leptin. *Animal Reproduction Science*, 85 41-52.
- Azevedo F. A. C.; Carvalho L. R. B.; Grinberg L. T.; Farfel J. M.; Ferretti R. E. L.; Leite R. E. P.; Filho W. J.; Lent R.; Herculano-Houzel S., 2009: Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an

isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 513 532-541.

Baba Y.; Matsuo H.; Schally A., 1971: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44 459-463.

Backholer K.; Smith J. T.; Rao A.; Pereira A.; Iqbal J.; Ogawa S.; Li Q.; Clarke I. J., 2010: Kisspeptin Cells in the Ewe Brain Respond to Leptin and Communicate with Neuropeptide Y and Proopiomelanocortin Cells. *Endocrinology*, 151 2233-2243.

Barash I.; Cheung C.; Weigle D.; Ren H.; Kabigting E.; Kuijper J.; Clifton D.; Steiner R., 1996: Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, 137 3144-3147.

Barb C.; Barrett J., 2005: Neuropeptide Y modulates growth hormone but not luteinizing hormone secretion from prepuberal gilt anterior pituitary cells in culture. *Domestic Animal Endocrinology*, 29 548-555.

Baskin D. G.; Schwartz M. W.; Seeley R. J.; Woods S. C.; Porte D., Jr.; Breininger J. F.; Jonak Z.; Schaefer J.; Krouse M.; Burghardt C.; Campfield L. A.; Burn P.; Kochan J. P., 1999: Leptin Receptor Long-form Splice-variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and

Co-localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus. *J. Histochem. Cytochem.*, 47 353-362.

Bennet M.V.L., 1977: Electrical transmission: a functional analysis and comparison with chemical transmission. In *Cellular Biology of Neurons*, handbook of physiology, The Nervous System, ed. ER Kandel 1 (1):357-416. Baltimore: Williams & Wilkins. 717pp.

Bonnet M.; Gourdou I.; Leroux C.; Chilliard Y.; Djiane J., 2002: Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci*, 80 723-728.

Butler A. A.; Roith D. L., 2001: CONTROL OF GROWTH BY THE SOMATROPIC AXIS: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles¹. *Annual Review of Physiology*, 63 141-164.

Campbell R. E.; French-Mullen J. M. H.; Cowley M. A.; Smith M. S.; Grove K. L., 2001: Hypothalamic Circuitry of Neuropeptide Y Regulation of Neuroendocrine Function and Food Intake via the Y5 Receptor Subtype. *Neuroendocrinology*, 74 106-119.

Caraty A.; Smith J. T.; Lomet D.; Ben Saïd S.; Morrissey A.; Cognie J.; Doughton B.; Baril G.; Briant C.; Clarke I. J., 2007: Kisspeptin

synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148 5258-5267.

Castellano J. M., 2005: Changes in Hypothalamic KiSS-1 System and Restoration of Pubertal Activation of the Reproductive Axis by Kisspeptin in Undernutrition. *Endocrinology*, 146 3917-3925.

Chilliard Y.; Bonnet M.; Delavaud C.; Faulconnier Y.; Leroux C.; Djiane J., 2001: Leptin in ruminants. Geneexpression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology*, 21 271-295.

Chronwall B.M., 1985: Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, 6 Suppl 2:1-11.

Clarke I.J., 2011: Control of GnRH secretion: One step back. *Neuroendocrinology*, 10.1016/j.yfrne.2011.01.001.

Clarkson J.; d'Anglemont de Tassigny X.; Moreno A. S.; Colledge W. H.; Herbison A. E., 2008: Kisspeptin-GPR54 Signaling Is Essential for Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activation and the Luteinizing Hormone Surge. *Journal of Neuroscience*, 28 8691-8697.

Clarkson J.; d'Anglemont de Tassigny X.; Colledge W. H.; Caraty A.; Herbison A. E., 2009: Distribution of Kisspeptin Neurones in the Adult Female Mouse Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 21 673-682.

- Connors B.W.; Long M.A., 2004: Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci*, 27 393-418.
- Crown A.; Clifton D. K.; Steiner R. A., 2007: Neuropeptide Signaling in the Integration of Metabolism and Reproduction. *Neuroendocrinology*, 86 175-182.
- Cunningham J.G.; Klein B.G., 2008: Tratado de fisiologia veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 710p.
- Cunningham M.; Clifton D.; Steiner R., 1999: Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction*, 60 616-622.
- Daftary S. S.; Gore A. C., 2005: IGF-1 in the Brain as a Regulator of Reproductive Neuroendocrine Function. *Exp. Biol. Med.*, 230 292-306.
- Danger J.; Tonon M.; Jenks B.; Saint-Pierre S.; Martel J.; Fasolo A.; Breton B.; Quirion R.; Pelletier G.; Vaudry H., 1990: Neuropeptide Y: localization in the central nervous system and neuroendocrine functions. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 4 307-340.
- de Roux N.; Genin E.; Carel J.; Matsuda F.; Chaussain J.; Milgrom E., 2003: Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 10972-10976.

- Denniston D.; Thomasa M. G.; Kanea K. K.; Roybal C. N.; Canales L.; Hallford D. M.; Remmenga M. D.; Hawkins D. E., 2003: Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state. *Animal Reproduction Science*, 78 25-31.
- Dhillon W. S.; Chaudhri O. B.; Patterson M.; Thompson E. L.; Murphy K. G.; Badman M. K.; McGowan B. M.; Amber V.; Patel S.; Ghatei M. A.; Bloom S. R., 2005: Kisspeptin-54 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis in Human Males. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 6609-6615.
- Dyer C. J.; Simmons J. M.; Matteri R. L.; Keisler D. H., 1997: Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, 14 119-128.
- Ebling F.J.; Cronin A.S., 2000: The neurobiology of reproductive development. *Neuroreport*, 11 23–33.
- Ehrhardt R.; Bell A.; Boisclair Y., 2002: Spatial and developmental regulation of leptin in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 1628-1635.
- Estrada K. M.; Clay C. M.; Pompolo S.; Smith J. T.; Clarke I. J., 2006: Elevated KISS-1 Expression in the Arcuate Nucleus Prior to the Cyclic

Preovulatory Gonadotrophin-Releasing Hormone/Lutenising Hormone Surge in the Ewe Suggests a Stimulatory Role for Kisspeptin in Oestrogen-Positive Feedback. *Journal of Neuroendocrinology*, 18 806-809.

Estrada K. M.; Pompolo S.; Morris M. J.; Tilbrook A. J.; Clarke I. J., 2003: Neuropeptide Y (NPY) Delays the Oestrogen-Induced Luteinizing Hormone (LH) Surge in the Ovariectomized Ewe: Further Evidence That NPY has a Predominant Negative Effect on LH Secretion in the Ewe. *Journal of Neuroendocrinology*, 15 1011-1020.

Fernandez-Fernandez R.; Martini A. C.; Navarro V. M.; Castellano J. M.; Dieguez C.; Aguilar E.; Pinilla L.; Tena-Sempere M., 2006: Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254 127-132.

Fevold H. L.; Hisaw F. L.; Leonard S. L., 1931: The gonad stimulating and the luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *American Journal of Physiology*, 97 291–301, 1931.

Finn P. D.; Cunningham M. J.; Pau K.-Y. F.; Spies H. G.; Clifton D. K.; Steiner R. A., 1998: The Stimulatory Effect of Leptin on the Neuroendocrine Reproductive Axis of the Monkey. *Endocrinology*, 139 4652-4662.

Franceschini I.; Lomet D.; Cateau M.; Delsol G.; Tillet Y.; Caraty A., 2006: Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate

nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, 401 225-230.

Frandsen R.D.; Wilke W.L.; Fails A.D., 2009: *Anatomy and physiology of farm animals*. 7 ed. Iowa: Blackwell, 512p.

Freeman M.E. The Hypothalamus. *In*: Conn, P.M. *Neuroscience in medicine*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1995. P. 261-300.

Fujioka H.; Yamanouchi K.; Akema T.; Nishihara M., 2007: The effects of GABA on embryonic gonadotropin-releasing hormone neurons in rat hypothalamic primary culture. *J Reprod Dev*, 53 323–331.

Galbiati M.; Martini L.; Melcangi R. C., 2003: Role of glial cells, growth factors and steroid hormones in the control of LHRH-secreting neurons. *Domestic Animal Endocrinology*, 25 101-108.

Gazal O. S.; Leshin L. S.; Stanko R. L.; Thomas M. G.; Keisler D. H.; Anderson L. L.; Williams G. L., 1998: Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion into Third-Ventricle Cerebrospinal Fluid of Cattle: Correspondence with the Tonic and Surge Release of Luteinizing Hormone and Its Tonic Inhibition by Suckling and Neuropeptide Y. *Biology of Reproduction*, 59 676-683.

Goodman R. L.; Lehman M. N.; Smith J. T.; Coolen L. M.; de Oliveira C. V. R.; Jafarzadehshirazi M. R.; Pereira A.; Iqbal J.; Caraty A.; Ciofi P.; Clarke I.

- J., 2007: Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Ewe Express Both Dynorphin A and Neurokinin B. *Endocrinology*, 148 5752-5760.
- Gottsch M. L., 2004: A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse. *Endocrinology*, 145 4073-4077.
- Gottsch M. L.; Clifton D. K.; Steiner R. A., 2009: From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30 4-9.
- Gutiérrez-Pascual E.; Martínez-Fuentes A. J.; Pinilla L.; Tena-Sempere M.; Malagón M. M.; Castaño J. P., 2007: Direct Pituitary Effects of Kisspeptin: Activation of Gonadotrophs and Somatotrophs and Stimulation of Luteinising Hormone and Growth Hormone Secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 19 521-530.
- Håkansson M. L.; Hulting A. L.; Meister B., 1996: Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus--relationship with NPY neurones. *Neuroreport*, 7 3087-3092.
- Han S.; Gottsch M.; Lee K.; Popa S.; Smith J.; Jakawich S., 2005: Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience*, 25 11349-11356.
- Harris G. W., 1955. Pituitary-hypothalamic mechanisms. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 73 124-126.

- Hashizume T.; Kumahara A.; Fujino M.; Okada K., 2002: Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, *70* 13-21.
- Herbison A. E., 2006. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In J. D. Neill (Ed.), *The Physiology of Reproduction*. Elsevier/Academic Press, San Diego (USA), 1415-1482
- Hileman S. M.; Schillo K. K.; Hall J. B., 1993: Effects of acute, intracerebroventricular administration of insulin on serum concentrations of luteinizing hormone, insulin, and glucose in ovariectomized lambs during restricted and ad libitum feed intake. *Biology of Reproduction*, *48* 117-124.
- Irwig M. S.; Fraley G. S.; Smith J. T.; Acohido B. V.; Popa S. M.; Cunningham M. J.; Gottsch M. L.; Clifton D. K.; Steiner R. A., 2004: Kisspeptin Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons and Regulation of KiSS-1 mRNA in the Male Rat. *Neuroendocrinology*, *80* 264-272.
- Jimenez-Linan M.; Rubin B.S.; King J.C., 1997. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology*, *138* 4123-4130.

Johnson J.I.; Sudheimer K.D.; Davis K.K.; Kerndt G.M.; Winn B.M. The sheep brain atlas. U. S. National Science Foundation support. Disponível em <https://www.msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>, acesso em 02/02/2011.

Kadokawa H.; Matsui M.; Hayashi K.; Matsunaga N.; Kawashima C.; Shimizu T.; Kida K.; Miyamoto A., 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J Endocrinol*, 196 331–4.

Kauffman A.; Clifton D.; Steiner R., 2007: Emerging ideas about kisspeptin–GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in Neurosciences*, 30 504-511.

Keisler D. H.; Lucy M. C., 1996: Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. *Journal of Animal Science*, 74 1-17.

Kershaw E.; Flier J., 2004: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89 2548-2556.

Kile J. P.; Nett T.M., 1994: Differential secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone from ovine pituitary cells following activation of protein kinase A, protein kinase C, or increased intracellular calcium. *Biol Reprod*, 50 49-54.

- Kinder J.E.; Bergfeld E.G.; Wehrman M.E.; Peters K.E.; Kojima F.N., 1995: Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J Reprod Fertil*, 49(Suppl.) 393–407.
- Knobil E., 1983: The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*, 36 53–88.
- Kolb, B, Whishaw, IQ. *Neurociência do comportamento*. Barueri:Manole. 601p. 2001.
- Kotani M.; Detheux M.; Vandenberghe A.; Communi D.; Vanderwinden J.-M.; Le Poul E.; Brézillon S.; Tyldesley R.; Suarez-Huerta N.; Vandeput F.; Blanpain C.; Schiffmann S. N.; Vassart G.; Parmentier M., 2001: The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, 276 34631-34636.
- Krasnow S. M.; Steiner R.A., 2006: Physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction. Pages 2553-2625 in Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. 3 ed. J. D. Neill, ed. Elsevier, St. Louis.
- Lee J.H.; Miele M.E.; Hicks D.J.; Phillips K.K.; Trent J.M.; Weissman B.E.; Welch D.R., 1996: KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*, 88 1731–1737.

- Lee J. H.; Welch D.R., 1997: Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57 2384-2387.
- Lehman M. N.; Silverman A.J.; Witkin J. W.; Millar R. P., 1988. Ultrastructure of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and their projections in the golden hamster. *Brain Res Bull*, 20 211–221.
- Lents C.; Heidorn N.; Barb C.; Ford J., 2008: Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 2008, 135 879-887.
- Li C.; Chen P.; Smith M. S., 1999: Morphological Evidence for Direct Interaction between Arcuate Nucleus Neuropeptide Y (NPY) Neurons and Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and the Possible Involvement of NPY Y1 Receptors. *Endocrinology*, 140 5382-5390.
- Luque R. M.; Kineman R. D.; Tena-Sempere M., 2007: Regulation of Hypothalamic Expression of KiSS-1 and GPR54 Genes by Metabolic Factors: Analyses Using Mouse Models and a Cell Line. *Endocrinology*, 148 4601-4611.
- Maio V.D., 2008. Regulation of information passing by synaptic transmission: A short review. *Brain Research*, 1225 26-38.

- Malven P. V.; Haglof S. A.; Degroot H., 1992: Effects of intracerebral administration of neuropeptide-Y on secretion of luteinizing hormone in ovariectomized sheep. *Brain Research Bulletin*, 28 871-875.
- Matsui H.; Takatsu Y.; Kumano S.; Matsumoto H.; Ohtaki T., 2004: Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320 383-388.
- Matsuo H.; Baba Y.; Nair R.; Arimura A.; Schally A., 1971: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43 1334-1339.
- McCann S. M.; Kimura M.; Walczewska A.; Karanth S.; Rettori V.; Yu W. H., 1998: Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. *Domestic Animal Endocrinology*, 15 333-344.
- McShane T. M.; May T.; Miner J. L.; Keisler D. H., 1992: Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biology of Reproduction*, 46 1151-1157.
- McShane T. M.; Petersen S. L.; McCrone S.; Keisler D. H., 1993: Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of Reproduction*, 49 831-839.

Merchenthaler I.; Setalo G.; Csontos C.; Petrusz P.; Flerko B.; Negro-Vilar A., 1989. Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*, *125* 2812–2821.

Merriam-Webster's Collegiate® Dictionary, Eleventh Edition. Merriam-Webster Online Dictionary copyright © 2010 by Merriam-Webster, Incorporated <http://www.merriam-webster.com/>

Messenger S.; Chatzidaki E. E.; Ma D.; Hendrick A. G.; Zahn D.; Dixon J.; Thresher R. R.; Malinge I.; Lomet D.; Carlton M. B. L.; Colledge W. H.; Caraty A.; Aparicio S. A. J. R., 2005: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102* 1761-1766.

Miyamoto K.; Hasegawa Y.; Nomura M.; Igarashi M.; Kangawa K.; Matsuo H., 1984. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA*, *81* 3874–3878.

Michel M. C.; Beck-Sickinger A.; Cox H.; Doods H. N.; Herzog H.; Larhammar D.; Quirion R.; Schwartz T.; Westfall T., 1998: XVI. International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide

- Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors. *Pharmacological Reviews*, 50 143-150.
- Millar R. P., 2003: GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14 35-43.
- Millar R. P., 2005: GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 88 5-28.
- Miller D. W.; Blache D.; Martin G. B., 1995: The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. *J Endocrinol*, 147 321-329.
- Miner J. L.; Della-Fera M. A.; Paterson J. A.; Baile C. A., 1989: Lateral cerebroventricular injection of neuropeptide Y stimulates feeding in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 257 R383-387.
- Morris B.J., 1989. Neuronal localization of neuropeptide Y gene expression in the rat brain. *J Comp Neurol*, 290 358–368.
- Morrison C. D.; Daniel J. A.; Hampton J. H.; Buff P. R.; McShane T. M.; Thomas M. G.; Keisler D. H., 2003: Luteinizing hormone and growth hormone secretion in ewes infused intracerebroventricularly with neuropeptide Y. *Domestic Animal Endocrinology*, 24 69-80.
- Morton G. J.; Schwartz M.W., 2001. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 Suppl 5:56-62.

- Muir A.; Chamberlain L.; Elshourbagy N.; Michalovich D.; Moore D.; Calamari A.; Szekeres P.; Sarau H.; Chambers J.; Murdock P.; Steplewski K.; Shabon U.; Miller J.; Middleton S.; Darker J.; Larminie C.; Wilson S.; Bergsma D.; Emson P.; Faull R.; Philpott K.; Harrison D., 2001: AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276 28969-28975.
- Navarro V. M.; Castellano J. M.; Fernández-Fernández R.; Barreiro M. L.; Roa J.; Sanchez-Criado J. E.; Aguilar E.; Dieguez C.; Pinilla L.; Tena-Sempere M., 2004: Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and Its Putative Receptor, GPR54, in Rat Hypothalamus and Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide. *Endocrinology*, 145 4565-4574.
- Ohtaki T.; Shintani Y.; Honda S.; Matsumoto H.; Hori A.; Kanehashi K.; Terao Y.; Kumano S.; Takatsu Y.; Masuda Y.; Ishibashi Y.; Watanabe T.; Asada M.; Yamada T.; Suenaga M.; Kitada C.; Usuki S.; Kurokawa T.; Onda H.; Nishimura O.; Fujino M., 2001: Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G protein-coupled receptor. *Nature*, 411 613-617.
- Ortega E.; Rodriguez E.; Ruiz E.; Osorio C., 1990: Activity of the hypothalamo-pituitary ovarian axis in hypothyroid rats with or without triiodothyronine replacement. *Life Sciences*, 46 391-395.

- Padmanabhan V.; McNeilly A., 2001: Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*, *121* 21-30.
- Pawson A. J.; McNeilly A.S., 2005. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci*, *88* 75-94.
- Pelletier G., 1990: Ultrastructural Localization of Neuropeptide Y in the Hypothalamus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *611* 232-246.
- Perks C. M.; Peters A. R.; Wathes D. C., 1999: Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, *116* 157-165.
- Perret D.I.; Rolls E.T.; Caan W.C., 1982. Visual neurons responsive to faces in the monkey temporal cortex. *Experimental Brain Research*, *47* 329-342.
- Petersen S.L.; Ottem E.N.; Carpenter C.D., 2003. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod*, *69* 1771– 1778
- Pielecka-Fortuna J.; Chu Z.; Moenter S., 2008: Kisspeptin acts directly and indirectly to increase GnRH neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, *149* 1979-1986.
- Pielecka-Fortuna J.; Moenter S. M., 2010: Kisspeptin Increases γ -Aminobutyric Acidergic and Glutamatergic Transmission Directly to

Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in an Estradiol-Dependent Manner. *Endocrinology*, 151 291-300.

Pierroz D. D.; Gruaz N. M.; d'Allèves V.; Aubert M. L., 1995: Chronic Administration of Neuropeptide Y into the Lateral Ventricle Starting at 30 Days of Life Delays Sexual Maturation in the Female Rat. *Neuroendocrinology*, 61 293-300.

Pineda R.; Aguilar E.; Pinilla L.; Tena-Sempere M., 2010: Physiological Roles of the Kisspeptin/GPR54 System in the Neuroendocrine Control of Reproduction. In: M. Luciano, (ed), *Progress in Brain Research*, Vol. Volume 181. Elsevier, pp. 55-77.

Pompolo S.; Ischenko O.; Pereira A.; Iqbal J.; Clarke I. J., 2005: Evidence that projections from the bed nucleus of the stria terminalis and from the lateral and medial regions of the preoptic area provide input to gonadotropin releasing hormone (GNRH) neurons in the female sheep brain. *Neuroscience*, 132 421-436.

Pompolo S.; Pereira A.; Estrada K. M.; Clarke I. J., 2006: Colocalization of Kisspeptin and Gonadotropin-Releasing Hormone in the Ovine Brain. *Endocrinology*, 147 804-810.

Pozo K.; Goda Y., 2010: Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66 337-351.

- Prasad B. M.; Conover C. D.; Sarkar D. K.; Rabii J.; Advis J. P., 1993: Feed restriction in prepubertal lambs: effect on puberty onset and on in vivo release of luteinizing-hormone-releasing hormone, neuropeptide Y and beta-endorphin from the posterior-lateral median eminence. *Neuroendocrinology*, *57* 1171-1181.
- Raine, C.S. Neurocellular Anatomy. *In*: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, W., Molinoff, P.B. Basic neurochemistry. 5 ed. New York:Raven Press, 1994. p. 3-32.
- Ramos-Vara J. A., 2005: Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology Online*, *42* 405-426.
- Redmond J. S.; Macedo G. G.; Velez I. C.; Caraty A.; Williams G.; Amstalden M., 2011: Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction*, REP-10-0467.
- Redmond J. S.; Macedo G. G.; Velez I. C.; Caraty A.; Williams G. L.; Amstalden M., 2009: Kisspeptin Activates the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis of Prepubertal Ewe Lambs. *Biology of Reproduction*, *81* 484-484.
- Reece, W.O. Dukes, fisiologia dos animais domésticos. 12 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006. 926p.
- Roa J.; Aguilar E.; Dieguez C.; Pinilla L.; Tenasempere M., 2008: New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29* 48-69.

- Roa J.; Tena-Sempere M., 2007: KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol*, 153 132-140.
- Rometo A. M.; Krajewski S. J.; Voytko M. L.; Rance N. E., 2007: Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 2744-2750.
- Sar M.; Sahu A.; Crowley W. R.; Kalra S. P., 1990: Localization of Neuropeptide-Y Immunoreactivity in Estradiol-Concentrating Cells in the Hypothalamus. *Endocrinology*, 127 2752-2756.
- Schally A.; Arimura A.; Baba Y.; Nair R.; Matsuo H.; Redding T.; Debeijuk L., 1971: Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43 393-399.
- Seminara S.; Messenger S.; Chatzidaki E.; Thresher R.; Acierno J.; Shagoury J.; Bo-Abbas Y.; Kuohung W.; Schwinof K.; Hendrick A.; Zahn D.; Dixon J.; Kaiser U.; Slaugenhaupt S.; Gusella J.; O'Rahilly S.; Carlton M.; Crowley W.; Aparicio S.; Colledge W., 2003: The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The new england journal of medicine*, 346 1614-1627.
- Shahab M.; Mastronardi C.; Seminara S. B.; Crowley W. F.; Ojeda S. R.; Plant T. M., 2005: Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential

mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 2129-2134.

Silverman A.; Jhamandas J.; Renaud L., 1987: Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J. Neurosci.*, 7 2312-2319.

Skinner D. C.; Caraty A.; Allingham R., 2001: Unmasking the Progesterone Receptor in the Preoptic Area and Hypothalamus of the Ewe: No Colocalization with Gonadotropin-Releasing Neurons. *Endocrinology*, 142 573-579.

Skinner D. C.; Herbison A. E., 1997: Effects of Photoperiod on Estrogen Receptor, Tyrosine Hydroxylase, Neuropeptide Y, and β -Endorphin Immunoreactivity in the Ewe Hypothalamus. *Endocrinology*, 138 2585-2595.

Smith J., 2009: Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: Comparative aspects☆. *Peptides*, 30 94-102.

Smith J.; Sheffield L., 2002: Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 22 145-154.

Smith J. T., 2005: Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. *Endocrinology*, 146 3686-3692.

- Smith J. T.; Acohido B. V.; Clifton D. K.; Steiner R. A., 2006: KiSS-1 Neurones Are Direct Targets for Leptin in the ob/ob Mouse. *Journal of Neuroendocrinology*, 18 298-303.
- Smith J. T.; Clay C. M.; Caraty A.; Clarke I. J., 2007: KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 148 1150-1157.
- Smith J. T.; Rao A.; Pereira A.; Caraty A.; Millar R. P.; Clarke I. J., 2008: Kisspeptin Is Present in Ovine Hypophysial Portal Blood But Does Not Increase during the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge: Evidence that Gonadotropes Are Not Direct Targets of Kisspeptin in Vivo. *Endocrinology*, 149 1951-1959.
- Tatemoto K.; Carlquist M.; Mutt V., 1982: Neuropeptide Y[mdash]a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296 659-660.
- Tena-Sempere M., 2010: Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments and future challenges. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314 164-169.
- Terao Y.; Kumano S.; Takatsu Y.; Hattori M.; Nishimura A.; Ohtaki T.; Shintani Y., 2004: Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1678 102-110.

- Tomikawa J.; Homma T.; Tajima S.; Shibata T.; Inamoto Y.; Takase K.; Inoue N.; Ohkura S.; Uenoyama Y.; Maeda K.; Tsukamura H., 2010. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig. *Biology of Reproduction*, 82 313-319.
- Thomas M. G.; Gazal O. S.; Williams G. L.; Stanko R. L.; Keisler D. H., 1999: Injection of neuropeptide Y into the third cerebroventricle differentially influences pituitary secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 16 159-169.
- Thompson E. L.; Patterson M.; Murphy K. G.; Smith K. L.; Dhillon W. S.; Todd J. F.; Ghatei M. A.; Bloom S. R., 2004: Central and Peripheral Administration of Kisspeptin-10 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 16 850-858.
- Tillet Y.; Caldani M.; Batailler M., 1989: Anatomical relationships of monoaminergic and neuropeptide Y-containing fibres with luteinizing hormone-releasing hormone systems in the preoptic area of the sheep brain: immunohistochemical studies. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26 319-326.
- Toufexis D. J.; Kyriazis D.; Woodside B., 2002: Chronic Neuropeptide Y Y5 Receptor Stimulation Suppresses Reproduction in Virgin Female and Lactating Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 14 492-497.

- Tovar S.; Vazquez M. J.; Navarro V. M.; Fernandez-Fernandez R.; Castellano J. M.; Vigo E.; Roa J.; Casanueva F. F.; Aguilar E.; Pinilla L.; Dieguez C.; Tena-Sempere M., 2006: Effects of Single or Repeated Intravenous Administration of Kisspeptin upon Dynamic LH Secretion in Conscious Male Rats. *Endocrinology*, 147 2696-2704.
- Watson A.J.; Westhusin M.E.; Winger Q.A., 1999. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil*, 54 303–15.
- Webster J. R.; Moenter S. M.; Barrell G. K.; Lehman M. N.; Karsch F. J., 1991a: Role of the Thyroid Gland in Seasonal Reproduction. III. Thyroidectomy Blocks Seasonal Suppression of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in Sheep. *Endocrinology*, 129 1635-1643.
- Webster J. R.; Moenter S. M.; Woodfill C. J. I.; Karch F. J., 1991b: Role of the Thyroid Gland in Seasonal Reproduction. II. Thyroxine Allows a Season-Specific Suppression of Gonadotropin Secretion in Sheep. *Endocrinology*, 129 176-183.
- Wehrenberg W. B.; Corder R.; Gaillard R. C., 1989: A Physiological Role for Neuropeptide Y in Regulating the Estrogen/Progesterone Induced Luteinizing Hormone Surge in Ovariectomized Rats. *Neuroendocrinology*, 49 680-682.
- Wintermantel T.M.; Campbell R.E.; Porteous R.; Bock D.; Grone H.J.; Todman M.G.; Korach K.S.; Greiner E.; Perez C.A.; Schutz G.; Herbison A.E., 2006. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen

positive feedback to gonadotrophin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*, 52 271–280.

Witcher M. R.; Kirov S. A.; Harris K. M., 2007: Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia*, 55 13-23.

Woller M.; Nichols E.; Herdendorf T.; Tutton D., 1998. Release of luteinizing hormone-releasing hormone from enzymatically dispersed rat hypothalamic explants is pulsatile. *Biol Reprod*, 59 587–590.

Xu J.; Kirigiti M. A.; Cowley M. A.; Grove K. L.; Smith M. S., 2008: Suppression of Basal Spontaneous Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Activity during Lactation: Role of Inhibitory Effects of Neuropeptide Y. *Endocrinology*, 150 333-340.

Yakar S.; Liu J.-L.; Stannard B.; Butler A.; Accili D.; Sauer B.; LeRoith D., 1999: Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 7324-7329.

Yelich J. V.; Wettemann R. P.; Marston T. T.; Spicer L. J., 1996: Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-i, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domestic Animal Endocrinology*, 13 325-338.

Yonekura S.; Kitade K.; Furukawa G.; Takahashi K.; Katsumata N.; Katoh K., 2002: Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and

CCK receptors in the calf rumen and abomasum. *Domestic Animal Endocrinology*, 22 25-35.

Yonekura S.; Senoo T.; Kobayashi Y.; Yonezawa T.; Katoh K.; Obara Y., 2003: Effects of acetate and butyrate on the expression of leptin and short-form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells. *Gen Comp Endocrinol*, 133 165-172.

Yu W. H.; Kimura M.; Walczewska A.; Karanth S.; McCann S. M., 1997: Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 1023-1028.

Zhang Y.; Proenca R.; Maffei M.; Barone M.; Leopold L.; Friedman J. M., 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 425-432.