

O neuropeptídeo kisspeptina e a reprodução animal: uma revisão

Julio Cesar Oliveira Dias¹, Cristina Mattos Veloso¹, Rita Flávia Miranda de Oliveira Donzele¹, Giovanni Ribeiro de Carvalho¹

RESUMO

A kisspeptina (Kp) é um neuropeptídeo que tem uma importante ação na regulação da fertilidade de mamíferos, devido a sua potente ação estimulatória sobre a secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). O objetivo com esta revisão é abordar a síntese da Kisspeptina e a sua sinalização via receptor GPR54, assim como a sua localização no SNC, funções fisiológicas e mecanismos de ação na fisiologia reprodutiva de mamíferos.

Palavras-chave: FSH; GnRH; gonadotrofinas; LH; melatonina.

The neuropeptide kisspeptin and animal reproduction: a review

ABSTRACT

The kisspeptin (Kp) is a neuropeptide which has an important action in regulating the fertility of mammals due to their potent stimulatory action on the secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). The aim of this review is to address the synthesis of Kisspeptin and its receptor GPR54 signaling pathway as well as its location in the Central Nervous System, physiological functions and mechanisms of action in the reproductive physiology of mammals.

Keywords: FSH; GnRH; gonadotropins; LH; melatonin.

Autor para correspondência: Julio Cesar Oliveira Dias
Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

E-mail: diasjuliovet@yahoo.com.br

Recebido em: 14 abr. 2015

Aceito em: 28 abr. 2015

Editor responsável: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os neurônios GnRH são os componentes principais do eixo reprodutivo. No entanto, essas células não expressam os receptores para estrógeno (ER α) e progesterona (PR) que traduzem os efeitos de feedback deste hormônio (Herbison & Theodosis, 1992, Skinner et al., 2001). A hipótese mais aceita é a que supõe a existência de interneurônios que fariam a mediação dos feedbacks (positivo ou negativo) realizados pelo estrógeno com neurônios GnRH. Assim, muitos estudos têm sido realizados para compreender os meios pelos quais os hormônios gonadais realizam os feedbacks regulatórios sobre as células GnRH.

O principal tipo de neurônio estudado é o que sintetiza o neuropeptídeo kisspeptina (neurônio kisspeptinérgico ou neurônio kiss1). Acredita-se que ele esteja envolvido na transmissão de sinais de feedbacks fisiológicos para os neurônios GnRH e, ou, na liberação pulsátil do GnRH/LH (Smith, 2012). Portanto, são consideradas importantes reguladores que integram sinais centrais e periféricos no controle da reprodução (Tassigny & Colledge, 2010).

Dentre os relatos que evidenciam a influência da kisspeptina na secreção de GnRH estão o efeito estimulatório deste neuropeptídeo na secreção de LH quando é injetada na área pré-óptica (hipotálamo) de ratos (Patterson et al., 2006), a ação direta no aumento da excitabilidade dos neurônios GnRH (Han et al., 2005, Pielecka-Fortuna et al., 2008), o estímulo para liberação de GnRH em culturas de tecidos hipotalâmicos (Tassigny et al., 2008), a presença de terminações dos neurônios Kisspeptina sobre os neurônios GnRH (Clarkson & Herbison, 2006, Smith et al., 2008b), e a produção de receptores de kisspeptina nos neurônios GnRH (Irwig et al., 2004, Han et al., 2005, Smith et al., 2009a).

Atuando de forma correlacionada ou independente da kisspeptina, já foram observados outros tipos neuronais que podem sintetizar neuropeptídeos reguladores da reprodução, como os fatores de crescimento derivados das células da glia (Ojeda et al., 2008), o glutamato (Glu), a norepinefrina (NE), e a neurocinina-B (NKB), os quais têm efeitos estimulatórios na liberação de GnRH (Ojeda et al., 2006, Ojeda et al., 2010, Rance et al., 2010). Por outro lado, o GABA (ácido γ -aminobutírico), o peptídeo opióide endógeno (EOP) (Ojeda et al., 2010), dinorfina (DIN) (Rance et al., 2010) e o hormônio inibidor de gonadotrofina (GnIH) (Quennell et al., 2010, Smith, 2012) são considerados os principais fatores inibidores da liberação do hormônio GnRH (Ojeda et al., 2010, Quennell et al., 2010, Rance et al., 2010) (Figura 1).

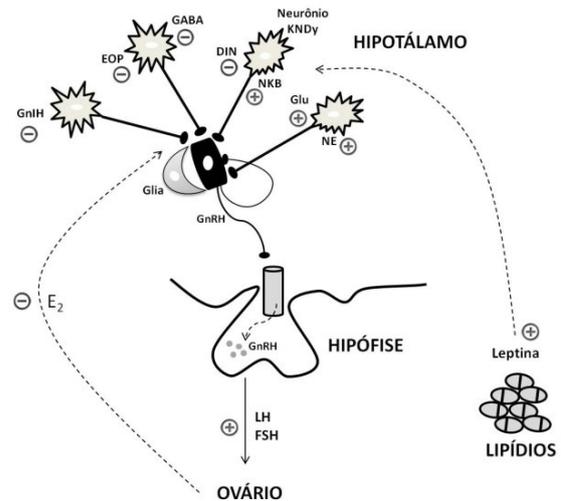


Figura 1. eixo hipotálamo-hipófise-gonadal com os seus principais reguladores. GnIH: hormônio inibidor de gonadotrofinas; EOP: peptídeo opióide endógeno; GABA: ácido γ -aminobutírico; DIN: dinorfina; NKB: neurocinina-B; Kp: kisspeptina; Glu: glutamato; NE: norepinefrina. Fonte: adaptado de Roa e Tena-Sempere (2010).

A modulação do eixo reprodutivo ainda pode ser regulada por sinais periféricos, como alguns dos elementos do metabolismo (leptina, grelina, neuropeptídeo Y) (Morton et al., 2006, Backholer et al., 2010). Assim, pode-se considerar que a geração de pulsos de GnRH não é direcionada por uma ação isolada de uma simples molécula, mas sim de um balanço dinâmico entre sinais excitatórios e inibitórios (Pinilla et al., 2012).

NOMENCLATURA E SÍNTESE DA KISSPEPTINA

A kisspeptina foi descoberta em 1996 por pesquisadores da Pensilvânia (Lee et al., 1996), os quais primeiramente a chamaram de metastina devido a sua habilidade de inibir a metástase tumoral (Ohtaki et al., 2001). Esse peptídeo é expresso pelo gene *Kiss1*, o qual possui esse nome em homenagem ao famoso chocolate da empresa Hershey Kisses® localizada no estado da Pensilvânia (Lee et al., 1996).

As kisspeptinas são uma família de neuropeptídeos sintetizadas principalmente pelos grupos neuronais dos núcleos hipotalâmicos (Pinilla et al., 2012). Até o momento, são conhecidas quatro moléculas, as quais são formadas a partir de clivagens proteolíticas ou degradação de um precursor comum (prepro-kisspeptina) codificado pelo gene *Kiss1* (Figura 2). No humano, este precursor é uma proteína hidrofóbica com 145 aminoácidos, que após a primeira clivagem forma a kisspeptina-54 (Kp-54), a maior kisspeptina já identificada com 54 aminoácidos (Kotani et al., 2001, Ohtaki et al., 2001). Os outros fragmentos de peptídeos que derivam da Kp-54 têm sido identificados como os peptídeos kisspeptina-14 (Kp-

14), kisspeptina-13 (Kp-13) e kisspeptina-10 (Kp-10) (Kotani et al., 2001, Bilban et al., 2004).

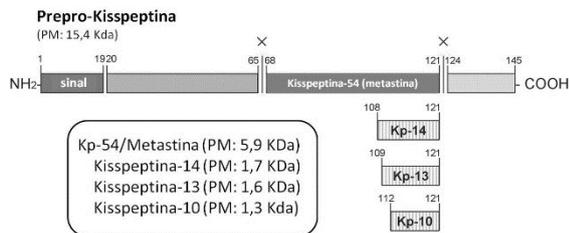


Figura 2. características estruturais das kisspeptinas de humanos, geradas por clivagem ou degradação a partir de um precursor comum (prepro-kisspeptina). Fonte: adaptado de Tena-Sempere (2006).

Quanto menor a kisspeptina, menor a variação de aminoácidos entre as espécies (Kotani et al., 2001, Muir et al., 2001, Ohtaki et al., 2001, Tena-Sempere, 2010). No entanto, ainda não há consenso quanto ao estímulo (específico ou inespecífico) para a formação dos peptídeos menores, assim como, quais são as formas dominantes produzidas nos diferentes tecidos a partir da clivagem da Kp-54 (Ohtaki et al., 2001, Pinilla et al., 2012).

A ação das kisspeptinas nas células ocorre através da ligação e ativação de um receptor acoplado a proteína G, o GPR54, atualmente mais chamado de Kiss1r (Roa et al., 2008, Oakley et al., 2009, Smith, 2012). Todas as kisspeptinas podem ativar eficientemente esse receptor, mas a Kp-10 retém a atividade máxima em termos de ativação (Kotani et al., 2001).

A ocorrência de mutação na proteína G acoplada ao Kiss1r não permite a correta ativação, pela kisspeptina, das ações intracelulares (ver adiante), podendo levar ao hipogonadismo hipogonadotrófico, uma condição de atraso ou ausência do desenvolvimento reprodutivo secundário que ocorre por deficiência de gonadotrofina (Roux et al., 2003, Seminara et al., 2003). Assim, a perfeita associação das kisspeptinas com seus receptores desempenham importante função na secreção de GnRH/LH no início da puberdade (Dungan et al., 2006) e, ou, na fase adulta (Messager et al., 2005).

Dessa forma, com o desenvolvimento de vários estudos, a kisspeptina e seu receptor (Kiss1r) foram sendo considerados os principais reguladores do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) à medida que se foi descobrindo a interrelação dos neurônios que os sintetizam com os neurônios GnRH, no hipotálamo. A kisspeptina é considerada um forte estimulador da secreção de GnRH/LH (Tena-Sempere, 2010) e a mais importante descoberta na neuroendocrinologia após o isolamento do GnRH (Roa et al., 2008).

SINALIZAÇÃO DA KISSPEPTINA VIA GPR54

O receptor Kiss1r (GPR54) é uma proteína com sete domínios transmembrana, acoplado a uma Proteína G_{q/11} (Castaño et al., 2009). Após a sua ligação com a Kisspeptina, ocorre a ativação da fosfolipase C (PLC), com a subsequente conversão do bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), que leva a mobilização de Ca²⁺ das reservas celulares (Roa et al., 2009), induzindo várias funções de ativação e bloqueio proteico no citosol. Além disso, o aumento da hidrólise de PIP₂ leva a formação de diacilglicerol (DAG) e, assim, a ativação da proteína quinase C (PKC), que induz a fosforilação de proteínas quinases ativada por mitógeno (MAPK), como as ERK1/2 e p38 (Castaño et al., 2009, Roa et al., 2009).

Análises utilizando culturas de tecidos do hipotálamo sugeriram que os efeitos estimulatórios da kisspeptina no organismo, como a secreção neuroendócrina, são mediados via ERK1/2 e p38 (Castellano et al., 2006a). No entanto, o mecanismo exato do estímulo secretório nas células neuronais ainda não foi totalmente esclarecido (Pinilla et al., 2012).

LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO SISTEMA KISSPEPTINA

O gene kiss1 é expresso em vários tecidos do sistema nervoso. Em vários mamíferos estudados, como roedores, equinos, humanos, ele é expresso nos neurônios Kiss1 dos núcleos hipotalâmicos arqueado (ARC) e periventricular anteroventral (AVPV) (Smith et al., 2005b, Clarkson et al., 2009, Magee et al., 2009, Hrabovszky et al., 2010). Nas ovelhas, os neurônios Kiss1 se encontram no ARC e na região dorsolateral da área pré-óptica (POA) do hipotálamo (Backholer et al., 2009, Franceschini et al., 2006).

As projeções (axônios) dos neurônios Kiss1 fazem sinapse com as membranas celulares de outros neurônios através dos seus receptores Kiss1r (GPR54), os quais se localizam em diferentes áreas do sistema nervoso central (Tena-Sempere, 2006). A falta de um antisoro (anticorpo) confiável contra a proteína do receptor não tem permitido, ainda, muitos trabalhos para a sua detecção exata e possível diferenciação (Pinilla et al., 2012). Mesmo assim, análises iniciais de hibridação *in situ* em ratos demonstraram a expressão de RNAm de GPR54 no hipotálamo, e, especificamente, em neurônios GnRH (Irwig et al., 2004). Assim, criou-se a hipótese de ação direta das kisspeptinas em neurônios GnRH, embora existam suspeitas da comunicação interneural ou não-sináptica entre estas duas populações (Ramaswamy et al., 2008, Pielecka-Fortuna e Moenter, 2010, Uenoyama et al., 2011).

Primeiramente só foram identificadas as

sinapses neuronais entre os neurônios Kiss1 do AVPV e os neurônios GnRH (Clarkson & Herbison, 2006, Backholer et al., 2009), porém, atualmente, acredita-se que é possível que ocorram interações diretas dos neurônios Kiss1 do ARC com os neurônios GnRH (Yeo & Herbison, 2011). Além disso, os neurônios Kiss1 do ARC inervam um grande número de outros núcleos hipotalâmicos e límbico, enquanto aqueles originados do AVPV exibem um padrão mais restrito de projeções no hipotálamo (Yeo & Herbison, 2011).

Em relação às respostas fisiológicas e expressão de substâncias, as duas populações de neurônios Kiss1 (ARC e AVPV) apresentam ações com diferentes importantes. A população neuronal kisspeptinérgica do ARC é a única que mostrou expressão de DIN, assim como NKB e seu receptor (Lehman et al., 2010). Além disso, marcantes diferenças entre neurônios kiss1 do ARC e AVPV foram reveladas ao mostrar as respostas totalmente opostas destes grupos na presença de esteroides sexuais (Smith et al., 2005a, 2005b).

Assim, mediante as variações anatômicas e funcionais já conhecidas, pode-se dizer que os neurônios Kiss1 do ARC e AVPV são passíveis de desempenhar ações substancialmente diferentes no controle do eixo HHG (Pinilla et al., 2012).

Os neurônios Kiss 1 localizados no ARC coexpressam, além da kisspeptina, os neuropeptídeos neurocinina-B (NKB) e dinorfina (DIN) (Goodman et al., 2007). A neurocinina-B (NKB) pertence à família das taucinininas, para qual já foram identificados os receptores NK1R, NK2R e NK3R, sendo o último preferencialmente ativado e por isso considerado o receptor da NKB (Rance et al., 2010). Já a dinorfina é peptídeo opióide endógeno e atua via receptor opióide kappa (KOR) (Eghlidi et al., 2010). Portanto, devido a habilidade de produzir esses três neuropeptídeos esses neurônios são conhecidos como neurônios KNDy (Lehman et al., 2010).

As evidências neuroanatômicas dos neurônios KNDy mostram que as projeções das suas fibras são para os corpos celulares dos neurônios GnRH no POA e também para terminações nervosas destes mesmos neurônios na eminência média (Lehman et al., 2010, Ramaswamy et al., 2010). Também já foram identificados que eles expressam receptores de estradiol (ER α), assim como de progesterona (PR) e andrógenos (AR), além da possibilidade de expressar outros neuropeptídeos e transmissores (Lehman et al., 2010). Dessa forma, tem-se sugerido que os neurônios KNDy têm um importante papel na regulação dos neurônios GnRH e no feedback de controle das gonadotrofinas (Lehman et al., 2010).

Outra classe de neurônios encontradas no

hipotálamo são os neurônios GnIH, os quais inibem a secreção de GnRH/gonadotrofina. Essas células estão localizadas dentro do núcleo dorsomedial, entendendo para a região ventral do núcleo paraventricular (Clarke et al., 2008, Dardente et al., 2008). As projeções neuronais das células GnIH são direcionadas para os locais onde estão localizados os neurônios GnRH (Ubuka et al., 2009), além de vários núcleos hipotalâmicos, sugerindo um papel de regulação de funções homeostáticas fisiológicas (Smith & Clarke, 2010a), e para dentro da zona secretória na eminência média (Kriegsfeld et al., 2006, Dardente et al., 2008), indicando uma ação hipofisiotrófica. Apesar que em mamíferos, os receptores para GnIH ainda não foram identificados nos neurônios GnRH e hipófise, em aves esses receptores já foram relatados (Bentley et al., 2008, Ubuka et al., 2008).

FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DAS KISSPEPTINAS

A Kisspeptina e a interação regulatória com estrógeno

O mecanismo completo de liberação do GnRH induzido pela ação da kisspeptina ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que esse neuropeptídeo leva a uma potente reposta de despolarização nos neurônios GnRH (Han et al., 2005, Liu et al., 2008) e induz a liberação do hormônio (Thompson et al., 2004, Castellano et al., 2006b). Essa despolarização acontece, principalmente, pelo fechamento dos canais de K da membrana celular pelo Ca²⁺ e da abertura dos canais Na⁺ dependentes, canais catiônicos não seletivos (Liu et al., 2008, Zhang et al., 2008).

A regulação da liberação do GnRH pela ação de kisspeptinas é influenciada por muitos fatores endógenos, como os hormônios gonadais, metabólicos e outros neuropeptídeos, e também exógenos, como o fotoperíodo (Caraty et al., 2007, Goodman et al., 2010, Tena-Sempere, 2010).

Os neurônios Kiss1 do ARC e do AVPV expressam receptores intracelulares para estrógeno e progesterona (Smith, 2009b, Pielecka-Fortuna & Moenter, 2010). Em camundongos machos muitas células Kiss1 no ARC coexpressam receptores para androgênio e E α (Smith et al., 2005a).

O estrógeno e testosterona são capazes de suprimir os níveis do RNAm de Kiss1 no hipotálamo, mais especificamente no ARC, de ovelhas (Shibata et al., 2007, Smith et al., 2007) e de roedores (Smith et al., 2005a, 2005b). Em estudos realizados com ovelhas, a gonadectomia aumentou a expressão de RNAm Kiss1 no ARC e o fornecimento exógeno de esteroides sexuais reduz a expressão de Kiss1

(Smith et al., 2009a). A partir de um modelo em roedores, pode-se observar a ação inibitória do estrógeno (estradiol e progesterona) na expressão nos neurônios Kiss1 contribuindo para o feedback negativo de GnRH/LH (Smith et al., 2006b).

Por outro lado, a gonadectomia diminui a expressão de RNAm Kiss1 no AVPV e a reposição dos esteroides sexuais restaurou, sugerindo a participação da kisspeptina no feedback positivo do estrógeno no ciclo estral das fêmeas (Smith et al., 2009a). Assim, o aumento dos níveis de E₂ no período pré-ovulatório estimularia a expressão do gene Kiss1 no AVPV que, na presença de receptores ativados para a progesterona, iria auxiliar na indução da onda de LH pré-ovulatória, durante a tarde/noite que antecede a ovulação (Adachi et al., 2007, Tena-Sempere, 2010, Smith et al., 2011). Esses mecanismos regulatórios em outras espécies de mamíferos estão ainda a ser definidos.

Esse padrão de resposta da kisspeptina à presença de estrógenos foi inicialmente detectado em machos e em fêmeas de rato, entretanto, a resposta em fêmeas foi muito mais proeminente (Smith et al., 2005a, 2005b). Assim, a kisspeptina pode intermediar tanto o feedback positivo quanto o negativo dos esteroides sexuais sobre a secreção de GnRH (Figura 3). No entanto, os mecanismos pelos quais o estrogênio contribui para secreção de gonadotrofinas são certamente mais complexos, e provavelmente envolvem ações em diferentes locais da rede neuroendócrina que regula a secreção de LH e FSH (Pinilla et al., 2012).

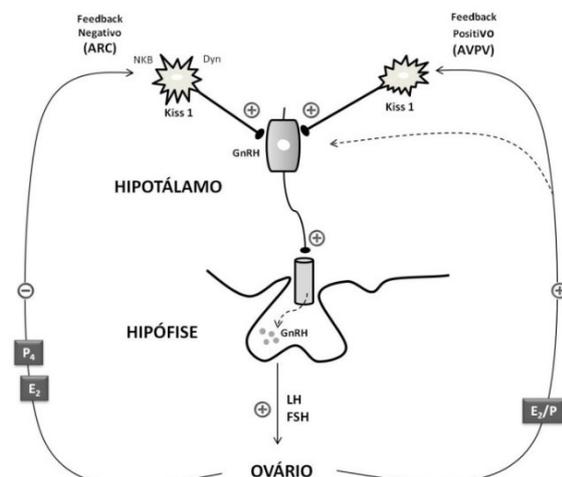


Figura 3. diferenças na regulação e ação dos neurônios Kiss 1 do ARC e AVPV no controle de GnRH em roedores. Fonte: adaptado de Pinilla *et al.* (2012).

Kisspeptinas e a secreção de gonadotrofinas

A kisspeptina apresenta papel crucial na regulação da secreção do GnRH, e assim, consequentemente, das gonadotrofinas LH e FSH (Dhillon et al., 2005, Hashizume et al., 2010). O pré-

tratamento com antagonistas de kisspeptina pode anular a expressão do gene *Kiss1r* (receptor) nos neurônios GnRH (Irwig et al., 2004, Han et al., 2005, Herbison et al., 2010) e da secreção de gonadotrofinas (Gottsch et al., 2004, Navarro et al., 2005a, 2005b). A administração de um antagonista de kisspeptina em ratas a partir da manhã do estro até a tarde do dia posterior, impediu o pico de LH pré-ovulatório (Pineda et al., 2010). Portanto, o sistema Kiss1/Kiss1r é um regulador excitatório essencial dos neurônios GnRH, de modo que a sua ausência levaria a supressão da secreção de GnRH (Thompson et al., 2004, Pinilla et al., 2012).

Uma comparação dos efeitos de liberação *in vivo* das formas de kisspeptinas pequenas (Kp-10) e longas (Kp-52, Kp-54) demonstrou maior secreção (duração) de LH com os peptídeos maiores, provavelmente devido uma maior meia-vida e resistência à degradação (Tovar et al., 2006, Mikkelsen et al., 2009, Pheng et al., 2009). Independente do tamanho da forma das kisspeptinas, pequenas doses podem levar a secreção de LH, demonstrando uma alta sensibilidade do sistema nervoso a estes neuropeptídeos (Gottsch et al., 2004, Navarro et al., 2005a, Tovar et al., 2006). Assim, a combinação de alta duração e sensibilidade nas respostas para liberação de gonadotrofinas definem as kisspeptinas como marcantes ativadores do eixo HHG (Pinilla et al., 2012).

Estudos em ratos machos adultos compararam as respostas das gonadotrofinas após injeção de Kp-10. O LH apresentou uma resposta de liberação rápida e forte, isto é, dentro de 5 a 15 minutos aumentou em até 10 vezes em relação aos níveis basais. Por outro lado, o FSH demonstrou uma resposta de liberação com maior atraso (a partir de 30 minutos em diante), menor magnitude (aproximadamente duas vezes maior), porém com maior persistência. Além disso, a capacidade de resposta do FSH ao Kp-10 parece ser aproximadamente 200 vezes menos sensível que a de LH (Navarro et al., 2005a, 2005b).

Essa diferença na resposta pode ser explicada por diferenças nos eventuais efeitos das kisspeptinas sobre os padrões de liberação de GnRH (Chan et al., 2011, George et al., 2011), ativando um perfil predominante de pulsos de alta frequência de GnRH, e assim, induzindo a secreção de LH. Também podem ter ocorrido diferenças nas ações regulatórias de fatores periféricos, principalmente peptídeos gonadais, como as inibinas, que regulam seletivamente a secreção de FSH (Burger et al., 2002, Kretser et al., 2002).

Além disso, estudos em roedores sugerem que o padrão de resposta do FSH a Kp-10 diverge entre os sexos, de modo que nos machos elas são

mais lentas e duradouras, enquanto nas fêmeas são mais rápidas e de menor duração (fêmeas não-ovariectomizadas) ou de maior duração (fêmeas ovariectomizadas) (Navarro et al., 2005a, 2005b). Isso leva a supor que talvez ocorra influência de esteroides gonadais na ação das kisspeptinas na fisiologia reprodutiva (Pinilla et al., 2012).

O aumento rápido dos níveis de LH é dose dependente, ou seja, quanto mais kisspeptina é fornecida ao organismo, maior é a secreção de LH (Dhillon et al., 2005), porém em alguns estudos, a administração de doses mais elevadas de kisspeptina levou a uma menor resposta de LH. Esse fato pode ocorrer devido uma dessensibilização rápida do hipotálamo a nível do seu próprio receptor (George et al., 2011), após uma repetida ou continuada exposição à kisspeptina (Seminara et al., 2006, Ramaswamy et al., 2007). Após a hiperativação, o complexo receptor-ligante é rapidamente internalizado através de um mecanismo mediado pela proteína clatrina (Pampillo et al., 2009). Apesar do mecanismo exato de internalização e processamento do Kiss1r ainda precisar ser elucidado por completo (Pinilla et al., 2012), sabe-se que ele pode ser degradado ou reciclado de volta para a membrana (Bianco et al., 2011).

Recentemente foi descrito que os neurônios Kiss1 expressam receptores para o hormônio prolactina (PRLr), sugerindo a regulação deste hormônio na síntese e secreção das kisspeptinas (Navarro et al., 2004), e, conseqüentemente, das gonadotrofinas. Durante a lactação, a ação inibitória da prolactina sobre o eixo gonadal envolveria a inibição dos neurônios Kiss1, os quais poderiam induzir redução dos níveis plasmáticos de LH (Lopes, 2012). Assim, a prolactina em altos níveis seria capaz de inibir a secreção de LH (Iwasa et al., 2011), através de um mecanismo envolvendo a inibição da atividade dos neurônios GnRH (Quennell et al., 2009). No entanto, quando a secreção de prolactina foi bloqueada durante a lactação foi observado apenas um pequeno aumento na expressão de kisspeptina e nos níveis plasmáticos de LH. Isso indica que na lactação a prolactina tem um efeito inibitório pequeno, e provavelmente, a inibição da fertilidade durante a fase lactacional é devido a outros fatores neuroendócrinos, como os sinais deflagrados pelo estímulo de sucção das tetas (Lopes, 2012)

Kisspeptinas tanto hipotalâmicas quanto ovarianas podem conduzir ações estimulatórias diretamente na hipófise para estimular a secreção gonadotrófica, principalmente de LH (Gutiérrez-Pascual et al., 2007, Balasch et al., 2009). Estudos in vitro mostraram que células da hipófise de ratos foram estimuladas a secretar LH quando

administrado Kp-10, enquanto a liberação de FSH foi somente marginal quando coincubada com GnRH (Navarro et al., 2005a, 2005b). Além disso, tanto RNAm de Kiss1 e GPR54 são expressos na hipófise através de uma regulação por estrógeno (Gutiérrez-Pascual et al., 2007, Richard et al., 2008). Em ovelhas, as kisspeptinas têm sido detectadas no sangue do sistema portal hipofisário, mas as concentrações não apresentam flutuações detectáveis durante períodos reprodutivos chaves, como na pré-ovulação. Assim, é possível que os gonadotrofos não sejam alvos diretos das kisspeptinas in vivo (Smith et al., 2008b).

Além das ações hipotalâmicas e possíveis ações na hipófise, ainda existem suspeitas da ação das kisspeptinas na terceira parte do eixo HHG: as gônadas. Nos ovários de ratas, enquanto os níveis de RNAm de GPR54 mantiveram-se bastante baixos e estáveis durante todo o ciclo ovariano, a expressão de Kiss 1 aumentou na tarde do proestro (antes da ovulação), permitindo supor que a expressão ovariana de Kiss1 parece estar sobre a regulação da gonadotrofinas (Castellano et al., 2006b). O suposto papel local da kisspeptina no controle da ovulação ainda precisa ser definido, mas já foi demonstrada sua presença em diversos compartimentos ovarianos, como na camada da teca em folículos em crescimento, no corpo lúteo e nas células intersticiais (Castellano et al., 2006b, Gaytán et al., 2009).

Estudos evidenciam ainda que o gene Kiss1 é expresso nos testículos de várias espécies mamíferas. Foi detectado kisspeptina no tecido testicular de ratos, principalmente nas células de Leydig (Pinilla et al., 2012) e também em espermatozoides de humanos, onde pode alterar a motilidade (Pinilla et al., 2012). Quando foram administradas contínuas doses de Kp-10, os níveis de testosterona foram maiores do que as concentrações de LH, sugerindo um potente efeito estimulatório das kisspeptinas diretamente a nível testicular (Ramaswamy et al., 2007).

A Kisspeptina e a interação regulatória com outros neuropeptídeos

Como observado na figura 1, muitos neuropeptídeos podem agir na regulação dos neurônios GnRH, juntamente com as kisspeptinas. Uma parte dos efeitos da kisspeptina nos neurônios GnRH pode ser indiretamente mediado via ativação de neurônios aferentes glutamato e, ou, GABA (Pinilla et al., 2012). Além dos efeitos diretos pós-sinápticos nos neurônios GnRH, Kp-10 é capaz de melhorar a transmissão glutamérgica e gabaérgica para esses neurônios, agindo de maneira pré-sináptica (Pielecka-Fortuna & Moenter, 2010).

Evidências da interação entre o GABA e Kisspeptina, demonstram que, dependendo das condições e receptores ativados, estes neuropeptídeos poderão causar efeitos excitatórios ou inibitórios aos neurônios GnRH (Christian & Moenter, 2010, Herbison & Moenter, 2011, Ojeda et al., 2008). A ativação de receptores GABA-B hiperpolariza e inibe os neurônios GnRH, mas este efeito pode ser bloqueado com doses de Kp-10, demonstrando mais uma ação estimulatória das kisspeptinas (Zhang et al., 2009). Por outro lado, o grande aumento de GABA no pico de GnRH/LH pré-ovulatório têm demonstrado os efeitos excitatórios do GABA nos neurônios GnRH em condições específicas (Christian & Moenter, 2010). No entanto, apesar de se constatar a existência da interação da Kisspeptina e GABA, os mecanismos completos das ações estimulatórias e inibitórias entre esses neuropeptídeos ainda são desconhecidos (Pinilla et al., 2012).

O hormônio inibidor de gonadotrofina (GnIH), membro da mesma família das kisspeptinas, é um sinal inibitório para o eixo gonadotrófico, agindo provavelmente no corpo central dos neurônios GnRH e a nível da hipófise (Smith et al., 2008a). Nos animais sazonais, durante a estação reprodutiva o número de aposições sobre os neurônios GnRH pode alterar, aumentando o número de neurônios Kiss1 e diminuindo dos neurônios GnIH (Smith et al., 2008a, Smith, 2012). Além disso, o tratamento com GnIH pode bloquear tanto a liberação pulsátil de LH, quanto a onda pré-ovulatória de LH durante a estação de reprodução (Smith, 2012). Assim, nos reprodutores sazonais as Kisspeptinas e GnIH interagem regulando a atividade neuronal, principalmente a nível de AVPV (Quennell et al., 2010).

A administração de GnIH reduz a secreção plasmática de LH, provavelmente devido a ação inibitória nos neurônios GnRH (Kriegsfeld et al., 2006) e na hipófise (Clarke et al., 2008). O GnIH elimina ainda, a mobilização de cálcio intracelular estimulada pelo GnRH em culturas de células hipofisárias (Clarke et al., 2008), além de inibir a estimulação do GnRH para síntese do RNAm de LH β e a fosforilação proteica importante na liberação do LH (Sari et al., 2009).

Os neurônios KNDy podem expressar além da kisspeptina, outros dois neuropeptídeos, a neurocinina-B (NKB) e a dinorfina (DIN). De modo geral, a NKB pode exercer um potente efeito estimulatório na secreção de GnRH. No entanto, pode depender de vários parâmetros fisiológicos, como a presença de esteroides gonadais e a fase de desenvolvimento (Pinilla et al., 2012). Já a DIN atua inibindo a secreção de gonadotrofina, como outros opióides endógenos (Yen et al., 1985, Eghlidi et al.,

2010). Devido as suas características fisiológicas, têm-se sugerido que NKB e DIN agiriam provavelmente de uma forma yin-yang, como modificadores positivos e negativos da liberação pulsátil de kisspeptinas por neurônios KNDy no ARC (Navarro et al., 2009, Wakabayashi et al., 2010). Assim, a NKB e a DIN agiriam autossinápticamente em neurônios KNDy, os quais iriam projetar suas terminações e ativar através de receptores Kiss1r (GPR54) os neurônios GnRH, tanto no corpo celular quanto na eminência média, por meio das kisspeptinas (Navarro et al., 2009, Wakabayashi et al., 2010). Alguns trabalhos também sugerem ao invés da regulação autossináptica dos neurônios KNDy, a possibilidade da existência de vários neurônios KNDy adjacentes, e, ou, contralaterais no ARC altamente interconectados, os quais fariam essa regulação (Rance et al., 2010).

Os reguladores metabólicos que influenciam o sistema Kiss1

A deficiência nutricional causa efeitos negativos no eixo HHG, principalmente pela inibição da liberação de GnRH e, conseqüentemente, de LH (Estrada et al., 2003). Os neurônios Kiss1 são os principais componentes das vias neuroendócrinas pelos quais a homeostase energética e a reprodução estão funcionalmente acoplados, porém parece que esses neurônios não estão envolvidos no controle da ingestão de alimentos (Castellano, 2005, Luque et al., 2007). A restrição alimentar é associada com inibição da expressão do gene de kisspeptina Kiss1 (Castellano, 2005). Em condições de déficit de energia persistente, observa-se a redução dos níveis de RNAm Kiss1 no ARC e POA em ovelhas, juntamente com a supressão da função gonadotrófica (Backholler et al., 2010). Assim, a kisspeptina foi vista como um possível mediador entre status metabólico e reprodução (Schneider, 2004, Dungan et al., 2006).

Dentre os principais sinais metabólicos, destaca-se o hormônio peptídico leptina, o qual é secretado pelos tecidos adiposos, sinalizando a abundância de energia no organismo (Casanueva & Dieguez, 1999, Fernandez-Fernandez et al., 2006, Hill et al., 2008). Os receptores de leptina (Ob-R) são expressos no ARC e POA (Smith et al., 2006a; Backholler et al., 2010), sendo já localizados nos neurônios neuropeptídeo Y (NPY) e kisspeptina, mas não nos neurônios GnRH (Quennell et al., 2009, Smith et al., 2009b). Portanto, é através de interneurônios sensíveis aos efeitos da leptina que sua ação é transmitida para os neurônios GnRH (Roa & Tena-Sempere, 2010).

A expressão hipotalâmica de Kiss1 está sob o controle positivo direto da leptina, permitindo a adequada maturação e função dos neurônios GnRH

e, conseqüentemente, do eixo HHG (Pinilla et al., 2012). Camundongos portadores de mutação inativadora no gene da leptina apresentam diminuição na expressão de kiss1 e, após o tratamento com leptina, elevam os níveis de expressão (Luque et al., 2007). Estudos em roedores e ovelhas mostraram que o balanço energético negativo pode induzir uma diminuição na expressão do gene kiss1 no hipotálamo (Castellano et al., 2005, Yamada et al., 2007, Xu et al., 2009, Backholer et al., 2010) e levar a incapacidade de gerar o pico pré-ovulatório de GnRH/LH (Quennell et al., 2009). Assim, o papel da leptina na reprodução é como modulador positivo da expressão do kiss1 no hipotálamo (Castellano et al., 2006a).

De forma contrária, a grelina tem sido considerada como um indicador de insuficiência de energia, pois sua concentração circulante parece estar inversamente correlacionada com o índice de massa corporal (Van der Lely et al., 2004, Tena-Sempere, 2006). Já foi demonstrado que a grelina inibe a expressão de RNAm de Kiss1 no hipotálamo de ratas (Forbes et al., 2009), e assim, suprime o eixo HHG.

O neuropeptídeo Y (NPY) é produzido principalmente por uma população de neurônios no ARC e tem sido bem caracterizado como um efetor hipotalâmico para parte das ações da leptina sobre a ingestão de alimentos (Schwartz et al., 2000, Morton et al., 2006). Leptina tem demonstrado suprimir a expressão de NPY em específicas populações neuronais no ARC (Schwartz et al., 1996), contendo tanto a leptina quanto o NPY parece regular positivamente a expressão de Kiss1 no hipotálamo (Luque et al., 2007, Kim et al., 2010). Da mesma forma, a Kisspeptina parece aumentar a expressão do gene NPY no ARC (Backholer et al., 2010).

Ainda existem muitos outros elementos do metabolismo animal que podem regular o sistema Kiss1 e a reprodução, como a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). Ainda existem poucas informações sobre a ação regulatória destes dois elementos, mas sabe-se que a baixa concentração circulante acarreta a diminuição da expressão do RNAm Kiss1 (Hiney et al., 2009, Pralong, 2010), e que o IGF-1 estimula a expressão do gene Kiss1 no AVPV (Hiney et al., 2009).

KISSPEPTINA E A SAZONALIDADE DA REPRODUÇÃO

O sistema kiss1 do hipotálamo é regulado não só por neuropeptídeos, hormônios sexuais, nutrição e sinais metabólicos, mas também por variáveis ambientais que sinalizam a estação do ano e o comprimento do dia (Goldman, 2001). Prova

disso são os hamsters sírio macho, espécie considerada de dia-longo, e que quando exposta à dias curtos, resultam em uma grande supressão dos níveis de RNAm de Kiss1 no ARC (Revel et al., 2006, Ansel et al., 2011) e este efeito é mediado pela melatonina (Mikkelsen et al., 2001). Essa mesma redução na concentração de Kisspeptina e no número de células que expressam o RNAm de Kiss1 ocorreu em ovelhas durante o período anestro (dias longos), uma vez que são considerados animais de dias-curtos (Smith et al., 2006b, 2007)

Na regulação desse sistema Kiss1/eixo HHG pode-se observar a interação entre os hormônios gonadais e o fotoperíodo no controle da expressão do RNAm de Kiss1, tanto em roedores quanto na ovelhas (Caraty et al., 2007, Ansel et al., 2010;). Em hamsters sírios, o efeito de supressão do estradiol na expressão de Kiss1 no ARC foi maior durante a estação não reprodutiva, onde a concentração de melatonina é maior. O efeito da melatonina depende da espécie, da estação reprodutiva, da concentração de esteroide sexual e, ou, núcleos hipotalâmicos (ARC ou AVPV/POA) (Revel et al., 2006, Greives et al., 2008, Ansel et al., 2010). Assim, os dados sugerem que os fatores gonadais e fotoperíodo participam de forma interativa do controle preciso do sistema Kiss1 em reprodutores sazonais.

A administração de kisspeptina em condições de fotoperíodo que suprimem a reprodução (estação de anestro) pode resgatar a função gonadotrófica dos testículos (gametogênese) e ovários (indução a ovulação) (Pinilla et al., 2012). A infusão de kisspeptina em ovelhas durante o anestro mostrou indução da ovulação em mais de 80% dos animais tratados, sugerindo que a restauração do tônus da kisspeptina, que está reduzido na contra-estação, pode reativar o eixo HHG (Caraty et al., 2007).

A expressão do RNAm de Kiss1 no ARC é maior durante a estação reprodutiva comparada com a estação não-reprodutiva (Wagner et al., 2008). Talvez o efeito inibitório do estrógeno sobre a expressão de Kiss1 no ARC seja maior durante a época de anestro que durante a estação de reprodução (Smith et al., 2008a), indicando uma mudança sazonal na sensibilidade dos neurônios Kiss1 ao estrógeno (Smith, 2012).

Contudo, os neurônios kiss1 no POA não parecem estar regulados pelo status sazonal (Smith et al., 2007, 2008a). Como discutido na seção 5.1, as células Kiss1 desta área hipotalâmica parecem estar somente envolvidas no mecanismo de feedback positivo do estrógeno, importante para a indução da onda pré-ovulatória (Smith et al., 2009b, Hoffman et al., 2011).

Durante a estação reprodutiva, o número

de células expressando Kiss1 no ARC e as terminações nervosas destas células sobre os neurônios GnRH aumentam (Smith, 2008a) (Figura 4). Entretanto, as células kiss1 da POA parecem projetar suas terminações nervosas diretamente para os neurônios GnRH (Backholer et al., 2009), enquanto aquelas de origem no ARC projetam poucas terminações (Pompolo et al., 2001, Wintermantel et al., 2006). Assim, tem sido proposto que a população de kiss1 do POA possa formar uma rede interneuronal que conecte as células Kiss no ARC aos neurônios GnRH (Backholer et al., 2009, Smith & Clarke, 2010).

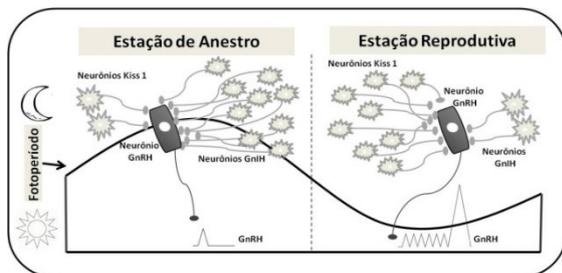


Figura 4. modelo de controle da estação reprodutiva em ovelhas envolvendo as mudanças na kisspeptina e GnIH. Fonte: adaptado de Smith (2012).

Em ovelhas, os dias curtos resultam em maior expressão de Kiss1 no ARC (Wagner, 2008), mostrando forte indicação de que o padrão de secreção da melatonina direciona a Kiss1 (Smith, 2012). No entanto, as células Kiss1 do ARC não expressam os receptores de melatonina (Li et al., 2011), também sugerindo a possibilidade de um sistema interneuronal entre o hormônio melatonina e as células kiss1 (Smith, 2012). Os neurônios dopaminérgicos A14/A15 são grandes candidatos para fazer essa intermediação (Goodman et al., 2010). As evidências que fundamentam essa hipótese, é que esses neurônios dopaminérgicos são estimulados pelo estrógeno, inibem a secreção de GnRH durante a fase de anestro nas ovelhas e enviam terminações nervosas para o ARC (neurônios kisspeptina) (Havern et al., 1991).

Já a expressão do neuropeptídeo GnIH no hipotálamo é maior durante a estação de anestro (Smith et al., 2008a), e assim, parece ser mais provável que ele possa ter um papel de inibição no eixo reprodutivo (Smith, 2012). Em ovelhas mantidas em fotoperíodo longo (anestro), a expressão de RNAm de GnIH foi maior quando comparadas com outras que permaneceram em fotoperíodos curtos (estação reprodutiva) (Dardente et al., 2008), porém não foi observado nenhum efeito do estradiol na expressão do GnIH durante as duas estações (Smith et al., 2008a).

Por outro lado, estudos com hamsters

mostraram que a expressão de GnIH foi menor durante a estação de anestro (Revel et al., 2008) e maior durante a estação reprodutiva (Paul et al., 2010). Estes dados aumentam a incerteza a respeito do papel do GnIH na reprodução e estação reprodutiva (Smith, 2012). No entanto, parece claro que a mudança sazonal das concentração de GnIH em hamsters é regulada pela melatonina (Revel et al., 2008), apesar de ainda não se terem estudos confirmando a presença de receptores de melatonina nos neurônios GnIH (Smith, 2012).

Durante a estação de anestro de ovelhas, as projeções das terminações nervosas dos neurônios GnIH sobre os neurônios GnRH aumentam (Smith, 2008a). Portanto, o mecanismo que o GnIH está envolvido na estação reprodutiva pode envolver o aumento da comunicação com os neurônios GnRH sem mudar substancialmente a expressão das células GnIH (Smith, 2012). O mecanismo pelo qual uma projeção axonal muda com a estação reprodutiva é desconhecido, mas pode envolver a secreção e ação da glândula tireoide.

Os hormônios tireoidianos são obrigatórios na transição das estações reprodutiva (Dahl et al., 1995). Em ovelhas, a retirada da tireoide mantém a ciclicidade ovariana sem interrupção (Nicholls et al., 1988). A tireoidectomia bloqueia as mudanças neuroendócrinas que levam a transição de fase reprodutiva para a fase de anestro (Moenter et al., 1991, Dahl et al., 1994), e assim, a estação reprodutiva não cessa. De forma contrária, se a retirada da glândula ocorrer na época do anestro, a época da reprodução começará normalmente (Parkinson & Follet, 1994, Thrun et al., 1997, Anderson et al., 2003). Portanto, os hormônios tireoidianos são necessários para que ocorra a transição da fase de estro para fase de anestro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ainda não estarem esclarecidas todas as ações exercidas pela melatonina na fisiologia reprodutiva, muitos trabalhos já apresentam a grande e importante influência desse neuropeptídeo na reprodução dos mamíferos. A correlação direta ou indireta com outros neuropeptídeos, hormônios, alimentação e ambiente (fotoperíodo) permite regular a produção de gonadotrofinas tanto nas fêmeas quanto nos machos. Assim, a evolução e desenvolvimento de novos estudos a respeito da Kisspeptina poderão auxiliar no tratamento de patologias e na fisiologia reprodutiva, como a regulação do início da puberdade, o aumento do período fértil e tratamento da infertilidade por desequilíbrio hormonal, além de um possível tratamento de tumores de mama e próstata por meio do bloqueio

de receptores cerebrais e desativação da produção de estrógeno e testosterona.

REFERÊNCIAS

Adachi, S., et al. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *The Journal of Reproduction and Development*, 53(2), 367–378.

Anderson, G. M., et al. (2003). Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology*, 144(7), 2892–2901.

Ansel, L., et al. (2010). Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*, 25(2), 81–91.

Ansel, L., et al. (2011). Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GnRH release. *Reproduction*, 142(3), 417–425.

Backholer, K., Smith, J., & Clarke, I. J. (2009). Melanocortins may stimulate reproduction by activating orexin neurons in the dorsomedial hypothalamus and kisspeptin neurons in the preoptic area of the ewe. *Endocrinology*, 150(12), 5488–5497.

Backholer, K., et al. (2010). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, 151(5), 2233–2243.

Balasz, J., Fábregues, F., Carmona, F., Casamitjana, R., & Tena-Sempere, M. (2009). Ovarian luteinizing hormone priming preceding follicle-stimulating hormone stimulation: clinical and endocrine effects in women with long-term hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(7), 2367–2373.

Bentley, G. E., et al. (2008). Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *General and Comparative Endocrinology*, 156(1), 34–43.

Bianco, S. D. C., et al. (2011). KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. *Endocrinology*, 152(4), 1616–1626.

Bilban, M., et al. (2004). Kisspeptin-10, a Kiss-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *Journal of Cell Science*, 11(8), 1319–1328.

Burger, L. L., Dalkin, A. C., Aylor, K. W., Haisenleder, D. J., & Marshall, J. C. (2002). GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes—assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology*, 143(9), 3243–3249.

Caraty, A., et al. (2007). Kisspeptin synchronizes

preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148(11), 5258–5267.

Casanueva, F. F., & Dieguez, C. (1999). Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20(4), 317–63.

Castaño, J. P., et al. (2009). Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function? *Peptides*, 30, 10–15.

Castellano, J. M., et al. (2005). Changes in hypothalamic KISS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 146, 3917–3925.

Castellano, J. M., et al. (2006a). Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 257–258, 75–83.

Castellano, J. M., et al. (2006b). Expression of KISS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*, 147(10), 4852–4862.

Chan, Y. M., et al. (2011). Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(6), E908–915.

Christian, C. A., & Moenter, S. M. (2010). The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocrine Reviews*, 31(4), 544–577.

Clarke, I. J., et al. (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology*, 149(11), 5811–5821.

Clarkson, J., & Herbison, A. E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147(12), 5817–5825.

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(8), 6736–6782.

Dahl, G. E., Evans, N. P., Moenter, S. M., & Karsch, F. J. (1994). The thyroid gland is required for reproductive neuroendocrine responses to photoperiod in the ewe. *Endocrinology*, 135, 10–15.

Dahl, G. E., Evans, N. P., Thrun, L. A., & Karsch, F. J. (1995). Thyroxine is permissive to seasonal transitions in reproductive neuroendocrine activity in the ewe. *Biology of Reproduction*, 52(3), 690–696.

Dardente, H., Birnie, M., Lincoln, G. A., & Hazlerigg, D. G. (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 1252–1259.

- Dhillon, W. S., et al. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(12), 6609–6615.
- Dungan, H. M., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2006). Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 147(3), 1154–1158.
- Eghlidi, D. H., Haley, G. E., Noriega, N. C., Kohama, S. G., & Urbanski, H. F. (2010). Influence of age and 17 beta-estradiol on kisspeptin, neurokinin B, and prodynorphin gene expression in the arcuate-median eminence of female rhesus macaques. *Endocrinology*, 151(8), 3783–3794.
- 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., et al. (2006). Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254–255, 127–132.
- Forbes, S., Li, X. F., Kinsey-Jones, J., & O'Byrne, K. (2009). Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neuroscience Letters*, 460(2), 143–147.
- Franceschini, I., et al. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, 401(3), 225–230.
- Gaytán, F., et al. (2009). KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 296(3), E520–E531.
- George, J. T., et al. (2011). Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(8), E1228–E1236.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian Photoperiodic System: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4), 283–301.
- Goodman, R. L., et al. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, 148(12), 5752–5760.
- Goodman, R. L., Jansen, H. T., Billings, H. J., Coolen, L. M., & Lehman, M. N. (2010). Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 674–681.
- Gottsch, M. L., et al. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9), 4073–4077.
- Greives, T. J., et al. (2008). Photoperiod and testosterone interact to drive seasonal changes in kisspeptin expression in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Neuroendocrinology*, 20(12), 1339–1347.
- Gutiérrez-Pascual, E., et al. (2007). Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(7), 521–530.
- Han, S. K., et al. (2005). Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. *The Journal of Neuroscience*, 25(49), 11349–11356.
- Hashizume, T., et al. (2010) Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Animal Reproduction Science*, 118, 37–41.
- Havern, R. L., Whisnant, C. S., & Goodman, R. L. (1991). Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrus ewe. *Biology of Reproduction*, 44(3), 476–482.
- Herbison, A. E., & Theodosis, D. T. (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*, 50(2), 283–298.
- Herbison, A. E., de Tassigny, X. D., Doran, J., & Colledge, W. H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 151(1), 312–321.
- Herbison, A. E., & Moenter, S. M. (2011). Depolarising and hyperpolarising actions of GABA receptor activation on GnRH neurons: towards an emerging consensus. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(7), 557–569.
- Hill, J. W., Elmquist, J. K., & Elias, C. F. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 294(5), E827–E832.
- Hiney, J. K., Srivastava, V. K., Pine, M. D., & Les Dees, W. (2009). Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. *Endocrinology*, 150(1), 376–384.
- Hoffman, G. E., Le, W. W., Franceschini, I., Caraty, A., & Advis, J. P. (2011). Expression of fos and in vivo median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe. *Endocrinology*, 152(1), 214–222.
- Hrabovszky, E., et al. (2010). The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 31(11), 1984–1998.
- Irwig, M. S., et al. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80(4), 264–272.

- Iwasa, T., et al. (2011). Delayed puberty in prenatally glucocorticoid administered female rats occurs independently of the hypothalamic Kiss1-Kiss1r-GnRH system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(2), 183–188.
- Kim, G. L., Dhillon, S. S., & Belsham, D. D. (2010). Kisspeptin directly regulates neuropeptide γ synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in NPY-secreting hypothalamic neurons. *Endocrinology*, 151, 5038–5047.
- Kotani, M., et al. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 34631–34636.
- Kretser, D. M., Hedger, M. P., Loveland, K. L., & Phillips, D. J. (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Human Reproduction Update*, 8(6), 529–541.
- Kriegsfeld, L. J., et al. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2410–2415.
- Lee, J. H., et al. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 1731–1737.
- Lehman, M. N., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), 3479–3489.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I. J., & Smith, J. T. (2011). Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 871–882.
- Liu, X., Lee, K., & Herbison, A. E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/Calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology*, 149(9), 4605–4614.
- Lopes, R. A. (2012). *Papel da prolactina na regulação da expressão de kisspeptina e secreção do hormônio luteinizante em fêmeas*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Luque, R. M., Kinema, 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(10), 4601–4611.
- Magee, C., et al. (2009). Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology*, 150(6), 2813–2821.
- Messenger, S., et al. (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(5), 1761–1766.
- Mikkelsen, J. D., et al. (2001). Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: A central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *European Journal of Neuroscience*, 14, 419–425.
- Mikkelsen, J. D., Bentsen, A. H., Ansel, L., Simonneaux, V., & Juul, A. (2009). Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regulatory Peptides*, 152(1-3), 95–100.
- Moenter, S. M., Woodfill, C. J., & Karsch, F. J. (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology*, 128, 1337–1344.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(21), 289–295.
- Muir, A. I., et al. (2001). AXOR 12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 28969–28975.
- Navarro, V. M., et al. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*, 145(10), 4565–4574.
- Navarro, V. M., et al. (2005a). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 146(4), 1689–1697.
- Navarro, V. M., et al. (2005b). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand. *Endocrinology*, 146(1), 156–163.
- Navarro, V. M., et al. (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 29(38), 11859–11866.
- Nicholls, T., J. et al., (1988). Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reproduction Nutrition Development*, 28, 375–385.
- Oakley, A. E., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*, 30(6), 713–743.
- Ohtaki, T., et al. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411 (6837), 613–617.
- Ojeda, S. R., et al. (2006). Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology*, 147(3), 1166–1174.
- Ojeda, S. R., Lomniczi, A., & Sandau, U. S. (2008). Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 732–742.

- Ojeda, S. R., Lomniczi, A., Sandau, U., & Matagne, V. (2010). New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocrine Development*, 17, 44-51.
- Pampillo, M., et al. (2009). Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and B-arrestin. *Molecular Endocrinology*, 23(12), 2060–2074.
- Parkinson, T. J., & Follett, B. K. (1994). Effect of thyroidectomy upon seasonality in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 51-58.
- Patterson, M., et al. (2006). Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(5), 349–354.
- Paul, M. J., Pyter, L. M., Freeman, D. A., Galang, J., & Prendergast, B. J. (2010). Photic and non-photic seasonal cues differentially engage hypothalamic kisspeptin and RFamide-related peptide mRNA expression in Siberian hamsters. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(12), 1007–1014.
- Pheng, V., et al. (2009). Potencies of centrally- or peripherally-injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(4), 378–382.
- Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z., & Moenter, S. M. (2008). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, 149(4), 1979–1986.
- Pielecka-Fortuna, J., & Moenter, S. M. (2010). Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology*, 151(1), 291–300.
- Pineda, R., et al. (2010). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology*, 151(2), 722–730.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological reviews*, 92(3), 1235–316.
- Pinto, F. M., et al. (2012). Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 35(1), 63–73.
- Pompolo, S., Rawson, J. A., & Clarke, I. J. (2001). Projections from the arcuate/ventromedial region of the hypothalamus to the preoptic area and bed nucleus of stria terminalis in the brain of the ewe; lack of direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Brain Research*, 904, 1–12.
- Pralong, F. P. (2010). Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324(1-2), 82–86.
- Quennell, J. H., et al. (2009). Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology*, 150(6), 2805–2812.
- Quennell, J. H., Rizwan, M. Z., Relf, H. L., Anderson, G. M. (2010). Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(4), 309–316.
- Ramaswamy, S., et al. (2007). Effect of continuous intravenous administration of human metastatin 45-54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, 148(7), 3364–3370.
- Ramaswamy, S., et al. (2008). Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, 149(9), 4387–4395.
- Ramaswamy, S., Guerriero, K. A., Gibbs, R. B., & Plant, T. M. (2010). Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, 151(9), 4494–4503.
- Rance, N. E., Krajewski, S. J., Smith, M. A., Cholanian, M., & Dacks, P. A. (2010). Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Research*, 1364, 116–128.
- Revel, F. G., et al. (2006). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Current Biology*, 16, 1730–1735.
- Revel, F. G., Saboureaux, M., Pévet, P., Simonneaux, V., & Mikkelsen, J. D. (2008). RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology*, 149(3), 902–912.
- Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A., & Kottler, M. L. (2008). KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(3), 381–393.
- Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., & Tena-Sempere, M. (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 48–69.
- Roa, J., et al. (2009). Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides*, 30, 57–66.
- Roa, J., & Tena-Sempere, M. (2010). Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(9), 519–528.
- Roux, N., et al. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 100(19), 10972–10976.
- Sari, I. P., Rao, A., Smith, J. T., Tilbrook, A. J., & Clarke, I. J. (2009). Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone

- synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology*, 150(12), 5549–5556.
- Schneider, J. E. (2004). Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior*, 81(2), 289–317.
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(5), 1101–1106.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. Jr, Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661–671.
- Seminara, S. B., et al. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*, 349(17), 1614–1627.
- Seminara, S. B., Dipietro, M. J., Ramaswamy, S., Crowley, W. F. Jr, & Plant, T. M. (2006). Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*, 147, 2122–2126.
- Shibata, M., et al. (2007). Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinizing hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Journal of Neuroendocrinology*, 19(6), 432–438.
- 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(2), 573–579.
- Smith, J. T., et al. (2005a). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, 146(7), 2976–2984.
- Smith, J. T., et al. (2005b). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146(9), 3686–3692.
- Smith, J. T., et al. (2006a). KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(4), 298–303.
- Smith, J. T., et al. (2006b). Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *The Journal of Neuroscience*, 26(25), 6687–6694.
- Smith, J. T., et al. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 148(3), 1150–1157.
- Smith, J. T., et al. (2008a). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 149(11), 5770–5782.
- Smith, J. T., et al. (2008b). 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(4), 1951–1959.
- Smith, J. T., et al. (2009a). Sex steroid control of hypothalamic Kiss 1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides*, 30(1), 94–102.
- Smith, J. T., et al. (2009b). Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrine Reviews*, 150(12), 5530–5538.
- Smith, J. T., & Clarke, I. J. (2010). Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(4), 255–260.
- Smith, J. T., et al. (2011). Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology*, 152(3), 1001–1012.
- Smith, J. T. (2012). The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(2), 75–84.
- Tassigny, X. A., et al. (2008). Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology*, 149(8), 3926–3932.
- Tassigny, X. A., & Colledge, W. H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology*, 25(4), 207–217.
- Tena-Sempere, M. (2006). GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update*, 12(5), 631–639.
- Tena-Sempere, M. (2010). Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314, 164–169.
- Thompson, E. L., et al. (2004). Central and peripheral administration of Kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(10), 850–858.
- Thrun, L. A., et al. (1997). Effect of thyroidectomy on maintenance of seasonal reproductive suppression in the ewe. *Biology of Reproduction*, 56(4), 1035–1040.
- Tovar, S., et al. (2006). Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology*, 147(6), 2696–2704.
- Ubuka, T., et al. (2008). Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology*, 149(1), 268–278.
- Ubuka, T., et al. (2009). Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *Journal of Comparative Neurology*, 517, 841–855.
- Uenoyama, Y., et al. (2011). Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotropin-releasing hormone (GnRH)

interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(10), 863–870.

Van Der Lely, A. J., et al. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews*, 25(3), 426–457.

Wagner, G. C., et al. (2008). Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology*, 149(1), 32–39.

Wakabayashi, Y. et al. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *The Journal of neuroscience*, 30(8), 3124–3132.

Wintermantel, T. M., et al. (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*, 52(2), 271–280.

Xu, J., et al. (2009). Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: role of insulin and leptin. *Endocrinology*, 150(9), 4231–4240.

Yamada, S., et al. (2007). Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus/median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology*, 148(5), 2226–2232.

Yeo, S. H., & Herbison, A. E. (2011). Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology*, 152(6), 2387–2399.

Yen, S. S., et al. (1985). Neuroendocrinology of opioid peptides and their role in the control of gonadotropin and prolactin secretion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 152, 485–493.

Zhang, C., et al. (2008). Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *The Journal of Neuroscience*, 28(17), 4423–4434.

Zhang, C., et al. (2009). Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology*, 150(5), 2388–2394.