

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

LETÍCIA BÜHLER

**ESTUDO SOBRE A AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO DORSAL DE RATOS:
VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES PARA HORMÔNIOS
GONADAIS E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR EM MACHOS E EM
FÊMEAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL E A INFLUÊNCIA DA PROLACTINA
NO COMPORTAMENTO SEXUAL FEMININO**

PORTO ALEGRE

2023

LETÍCIA BÜHLER

**ESTUDO SOBRE A AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO DORSAL DE RATOS:
VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES PARA HORMÔNIOS
GONADAIS E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR EM MACHOS E EM
FÊMEAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL E A INFLUÊNCIA DA PROLACTINA
NO COMPORTAMENTO SEXUAL FEMININO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Neurociências.

Orientador: Dr. Alberto Antônio Rasia-Filho

PORTO ALEGRE

2023

LETÍCIA BÜHLER

**ESTUDO SOBRE A AMÍGDALA MEDIAL PÓSTERO DORSAL DE RATOS:
VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES PARA HORMÔNIOS
GONADAIS E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR EM MACHOS E EM
FÊMEAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL E A INFLUÊNCIA DA PROLACTINA
NO COMPORTAMENTO SEXUAL FEMININO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Neurociências.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Lenir Orlandi Pereira Silva – UFRGS

Silvana de Almeida – UFCSPA

Denise Zancan – UFRGS

Taís Malysz – UFRGS (suplente)

Ilma Simoni Brum da Silva – UFRGS (suplente)

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais e ao meu irmão, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Ao meu avô Walter Bühler (*in memoriam*), que indiretamente me apresentou às Neurociências. A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente no desenvolvimento deste projeto. E também a todos que acreditam na ciência!

AGRADECIMENTOS

O amadurecimento científico desta dissertação, de várias maneiras, pode ser refletido pelo desenvolvimento como ser humano e como pesquisadora. Contudo, esse processo não se consolida sem influência sinérgica de seres a quem gostaria de agradecer imensamente.

Agradeço à Deus por ter sido a minha fortaleza, me permitindo a contornar todos os obstáculos me proporcionando reencontrar a minha essência e vocação, podendo, assim, ser a pessoa íntegra que sou.

Aos meus pais, **Marcia** e **Nicolau**, por todo apoio, incentivo e auxílio em todos os momentos da minha vida. E também pelas infinitas conversas. Todas as minhas conquistas se devem a vocês. Sou muito grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim e pelo meu irmão, amo muito vocês!

Ao meu irmão, **Lucas**, pela parceria, cumplicidade, risadas, pelo carinho, paciência e aprendizados que foram essenciais durante a rotina pesada. E muito obrigada pela ajuda no uso no software de edição de imagem. Te amo meu irmão, e tenho certeza de que terá um futuro brilhante. Pode sempre contar comigo.

À minha cachorrinha, Liebe, pela assistência emocional que foi essencial durante a rotina pesada de experimentos e durante a pandemia. Será sempre a minha eterna companheira

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia-Filho**, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela paciência, pela confiança e pela dedicação. Muito obrigada pela oportunidade de ser a sua aluna.

À **Prof.^a Dr.^a Márcia Giovenardi** e à **Dr.^a Ana Carolina de Moura** pelos ensinamentos, pela confiança, pela dedicação e pelas contribuições.

Ao **Prof. Dr. Vicent Goffin** pela confiança, pelas contribuições e pela doação do antagonista da prolactina que foi essencial para a realização desta dissertação.

Às técnicas do laboratório de Fisiologia da UFCSPA, **Carmen Lúcia Andrades**, **Alexandra Guimarães** e **Milena Silveira** pela ajuda na preparação dos materiais para a realização dos experimentos e pelas conversas descontraídas.

Aos funcionários do biotério da UFCSPA, pela criação e pelos cuidados dos animais utilizados neste trabalho. Em especial a veterinária **Clarissa Hollenbach** pelo

cuidado excepcional com os animais durante os experimentos. Sou extremamente grata!

Às técnicas do laboratório de Biologia Molecular, **Grasiela Agnes e Marília Remuzzi Zandona** pela disponibilidade, suporte, compreensão e excelência de sempre. Muito obrigada!

Ao Prof. **Dr. Pedro Dal Lago** por disponibilizar o seu laboratório quando necessário. Muito obrigada!

Ao grupo de Pesquisa Clínica em Nefrologia e Transplante Renal da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em especial à **Dr^a. Elizete Keitel** e à **Dr^a. Gisele Meinerz** por sempre me incentivarem e me inspirarem. E ao meu colega de trabalho, **Ronivan Luis Dal Prá**, muito obrigada por todas as oportunidades, pelos ensinamentos, pelas experiências, e por me ajudar a conciliar o trabalho com o mestrado, sendo fundamental para eu conseguir concluir essa etapa. Serei eternamente grata a vocês.

À UFRGS e seus funcionários, em especial ao corpo docente e a equipe do PPG Neurociências da UFRGS.

À UFCSPA e seus funcionários, em especial aos funcionários da segurança e da higienização que me proporcionaram todo suporte necessário durante a pandemia.

A todos que dedicaram a sua vida no laboratório ou na linha de frente no combate da pandemia por COVID19, vocês são os verdadeiros heróis. Obrigada por existirem.

*"In summary, all great work is the fruit
of patience and perseverance,
combined with tenacious
concentration on a subject over a
period of months or years."*

Santiago Ramón y Cajal

RESUMO

A amígdala medial modula diversos comportamentos sociais, incluindo o reprodutivo. O subnúcleo posterodorsal (MePD) é sexualmente dimórfico, possui alta concentração de receptores para hormônios gonadais e para prolactina, além de fazer parte do circuito neural para ocorrência do comportamento sexual, atuando também no controle da secreção neuroendócrina hipotalâmica de gonadotrofinas ao longo do ciclo ovariano. O presente estudo avalia a variação da expressão gênica de *receptor α e β para estradiol (ER α e ER β)*, *receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1)*, *kisspeptina 1 e seu receptor (KISS1 e KISS1R)*, *receptor da progesterona (PRGR)*, *prolactina e seu receptor curto e longo (PRL e PRLR curto e longo)*, *gene de resposta ao crescimento inicial-1 (EGR1)*, *gene Janus quinase 2 (JAK2)*, *transdutor de sinal e ativador de transcrição 5A e B (STAT5A e STAT5B)* no MePD de ambos os hemisférios cerebrais em ratos e ratas em diestro, proestro e estro além de estudar a modulação da prolactina no MePD sobre o comportamento sexual de ratas em proestro. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) foi empregada no MePD do hemisfério direito e esquerdo (n = 6-8 por grupo) para a avaliação da expressão de cada gene entre machos e fêmeas. Os resultados foram comparados pelo teste da análise da variância de duas vias seguido do teste de Tukey; ou pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn. Para avaliação do comportamento sexual, ratas (n = 6-7 por grupo) foram submetidas à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no MePD direito e, posteriormente, microinjeção de salina (0,3 μ L), antagonista dos receptores para prolactina (Del1-9-G129R-hPRL nas doses de 1 μ g/0,3 μ L e 10 μ g/0,3 μ L) e Del1-9-G129R-hPRL (10 μ g) juntamente com prolactina (1 nM/0,3 μ L) quando as fêmeas estavam em proestro e 3h antes do início do ciclo escuro para teste de comportamento sexual. Comparado com registros controle de cada rata, foi avaliada pós-microinjeção a expressão do comportamento sexual feminino de lordose evidente. Os resultados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn. Em todos os casos, o nível de significância estatístico foi estabelecido em $p < 0,05$. Os resultados mostraram que a expressão de ER α , PRL e STAT5B é maior em fêmeas que em machos. Já a expressão de KISS1 é maior em machos do que em fêmeas, e a expressão de GPER1 é maior em fêmeas em diestro do que em proestro. Há

também diferenças entre os hemisférios cerebrais, ora com maior expressão no lado direito, ou no lado esquerdo, sugerindo também uma modulação lateralizada dos efeitos dos hormônios gonadais sobre os genes testados. Também foi observada redução significativa na ocorrência do comportamento de lordose após microinjeção de antagonista dos receptores para prolactina Del1-9-G129R-hPRL, efeito revertido pela coadministração de prolactina, no MePD. Tais dados inéditos demonstram que a prolactina está envolvida na modulação do comportamento sexual feminino em proestro e a MePD é parte integrante de circuitaria neural relevante para tanto.

Palavras-chave: Complexo amigdalóide; prolactina; receptores para prolactina; estrogênio; comportamento sexual.

ABSTRACT

The medial amygdala modulates several social behaviors, including reproductive behavior. The posterodorsal medial amygdala (MePD) is sexually dimorphic, has a high concentration of receptors for gonadal hormones and prolactin. It is part of the neural circuit for sexual behavior, and also acting to control hypothalamic neuroendocrine secretion of gonadotropins across the ovarian cycle. The present study evaluates the variation of gene expression of α and β estradiol receptor (*ER α* and *ER β*), *G protein-coupled estrogen receptor (GPER1)*, *kisspeptin 1* and its receptor (*KISS1* and *KISS1R*), *progesterone receptor (PRGR)*, *prolactin* and its short and long receptor (*PRL* and *PRLR short and long*), *early growth response 1 (EGR1)*, *Janus kinase 2 (JAK2)*, *signal transducer and activator of transcription 5A and B (STAT5A and STAT5B)* in the MePD of both cerebral hemispheres of males and females cycling female rats in diestrus, proestrus, and estrus. In addition, we investigated whether PRL effects in the MePD would affect the sexual behavior display of female rats during proestrus. Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) technique was applied in the MePD from the right and the left hemisphere (n = 6-8 per group) to evaluate expression of each gene between male and female rats. The results were compared using the two-way analysis of variance test followed by the Tukey test; or by the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. For the assessment of sexual behavior, female rats (n = 6-7 per group) underwent stereotaxic surgery for cannula implantation in the right MePD and subsequently received microinjections of saline (0.3 μ L), a prolactin receptor antagonist (Del1-9-G129R-hPRL; at doses of 1 μ g/0.3 μ L and 10 μ g/0.3 μ L), and Del1-9-G129R-hPRL (10 μ g/0.3 μ L) combined with prolactin (1 nM/0.3 μ L), while at proestrus and 3 h before the onset of the dark cycle sexual behavior testing. Compared with control recordings from each rat, the expression of female sexual behavior of evident lordosis was evaluated post-microinjection. Results were compared using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. In all cases, the level of statistical significance was set at $p < 0.05$. *ER α* , *PRL*, and *STAT5B* expression is higher in females than in males. *KISS1* expression is higher in males than in females, and *GPER1* is higher during diestrus

than in proestrus. The expression of these genes depends on sex, being higher in males than in females and others in females in different phases of estrus cycle, and cerebral hemisphere, also suggesting a potential lateralized modulation of gonadal hormones on these genes. A significant reduction in the occurrence of lordosis behavior was observed after microinjection of Del1-9-G129R-hPRL among the experimental groups, this effect reversed by the coadministration of prolactin in the MePD. This data demonstrate that prolactin is involved in the modulation of female sexual behavior in proestrus and MePD is an integral part relevant of the neural circuitry.

Keywords: Amygdaloid complex; prolactin; prolactin receptor; estrogen; sexual behavior.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------|
| ACe | Núcleo central da amígdala |
| Del1-9-G129R-hPRL | Antagonista seletivo do receptor da prolactina |
| EGR1 | Gene de resposta ao crescimento inicial-1 |
| ER α | Receptor α para estradiol |
| ER β | Receptor β para estradiol |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GABA _B | Receptor de ácido gama-aminobutírico tipo B |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| GP _{ER} 1 | Receptor de estrogênio acoplado à proteína G |
| HPA | Hipotálamo-hipófise-adrenal |
| KISS1 | Kisspeptina 1 |
| KISS1R | Receptor de kisspeptina 1 |
| JAK2 | Gene Janus quinase 2 |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| MAP-quinases | Proteínas quinases ativadas por mitógenos |
| MeA | Núcleo medial da amígdala |
| MeAD | Subnúcleo anterodorsal do núcleo medial da amígdala |
| MeAV | Subnúcleo anteroventral do núcleo medial da amígdala |
| MePD | Subnúcleo posterodorsal do núcleo medial da amígdala |
| MePV | Subnúcleo posteroventral do núcleo medial da amígdala |
| PRGR | Receptor da progesterona |
| PRL | Prolactina |
| PRLR | Receptor da prolactina |
| pSTAT5 | STAT5 fosforilado |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensageiro |
| RT-qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| STAT5 | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 |
| TIDA | Dopamina tuberoinfundibular |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 AMÍGDALA | 13 |
| 1.2 AMÍGDALA MEDIAL E SEU SUBNÚCLEO POSTERODORSAL..... | 14 |
| 1.3 HORMÔNIOS GONADAIS, DIMORFISMO SEXUAL E EFEITOS DA VARIAÇÃO HORMONAL OVARIANA CÍCLICA | 16 |
| 1.3.1 Receptores α e β para estradiol e receptor de estrogênio acoplado à proteína G | 17 |
| 1.3.2 Kisspeptina 1 e seu receptor | 19 |
| 1.3.3 Receptor de progesterona | 20 |
| 1.3.4 Prolactina e seus receptores, EGR1, JAK2, STAT5A e STAT5B | 21 |
| 1.4 COMPORTAMENTO DE LORDOSE EM RATAS..... | 24 |
| 1.5. JUSTIFICATIVA | 25 |
| 2 OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 26 |
| 2.1.1 Objetivos específicos | 26 |
| 3 RESULTADOS | 28 |
| 3.1 ARTIGO CIENTÍFICO | 28 |
| 4 DISCUSSÃO | 61 |
| 5 CONCLUSÃO | 69 |
| 6 PERSPECTIVAS | 70 |
| 7 REFERÊNCIAS | 71 |
| 8 ANEXO I | 86 |
| 9 ANEXO II | 92 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 AMÍGDALA

Localizada na borda medial do lobo temporal, a amígdala é formada por vários núcleos e subnúcleos que formam uma rede estrutural inter-relacionada envolvida na modulação de diversos comportamentos sociais e ajustes homeostáticos cardiovasculares e neuroendócrinos (De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004; Petrovich, 2013; Rasia-Filho; Londero; Achaval, 2000; Swanson; Petrovich, 1998). A amígdala de ratos é dividida em quatro grandes partes: a amígdala “expandida”, constituída pelos núcleos medial (MeA) e central (ACe); a amígdala com característica cortical em cuja subdivisão encontra-se o complexo basolateral; as áreas de transição, entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e, os núcleos ainda não classificados, como os com aspecto de células dispersas na substância branca e no interior do núcleo próprio da estria terminal (Canteras; Simerly; Swanson, 1995; De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004).

De modo geral, a amígdala não tem uma função unitária simples, mas um papel de integração de atividades comportamentais, endócrinas e simpático/parassimpática. Destacam-se os processamentos de estímulos olfativos e vomeronasais, a ação de esteroides (como o dos esteroides sexuais e os glicocorticoides), processamento e respostas comportamentais a estímulos gerados por medo e ansiedade, modulação do comportamento alimentar, reprodutivo, maternal e agressivo, e participação na aquisição de memória e aprendizado condicionados (Canteras; Simerly; Swanson, 1995; Coolen; Wood, 1998; Dall’Oglio *et al.*, 2008b, 2008a). Para desempenhar adequadamente todas as suas funções, os diversos núcleos da amígdala recebem diferentes modalidades de informações sensoriais, tanto interoreceptivas quanto exteroceptivas, que acabam por modificar sua atividade e estimular diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) em resposta ao estímulo inicial com relevância social para o indivíduo e sua espécie (Cooke; Woolley, 2009).

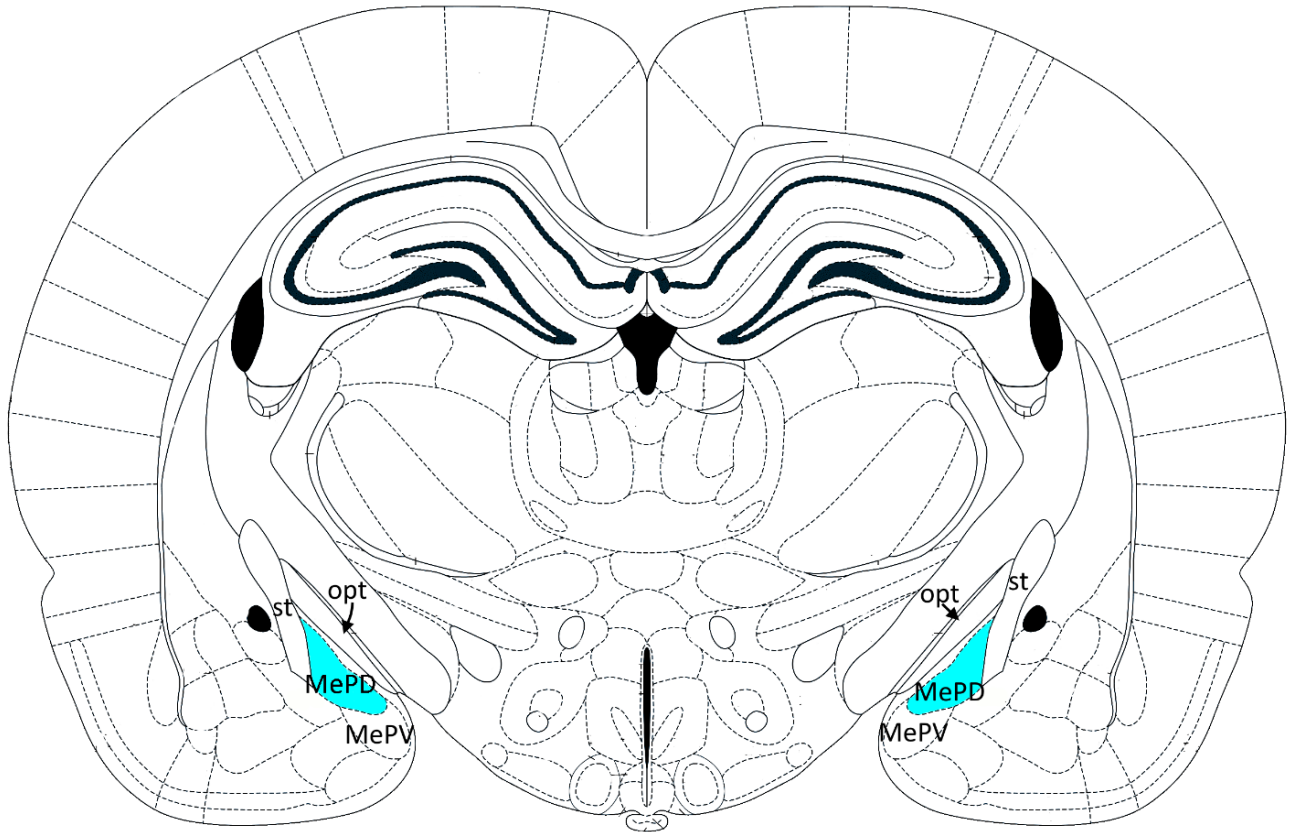
Alguns núcleos da amígdala são sexualmente dimórficos em ratos. Esse dimorfismo está na dependência da ação dos hormônios gonadais em ambos os

sexos. Por exemplo, o MeA possui neurônios que apresentam receptores para os esteroides sexuais testosterona, progesterona, e α e β para estradiol (ER α ; ER β) (De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004; Gréco et al., 2001). Devido à sua capacidade de gerar alterações nos circuitos neurais, esses hormônios influenciam a plasticidade do SNC e causam alterações morfológicas neuronais no corpo celular, dendritos e espinhos (Rasia-Filho *et al.*, 2004; Zancan *et al.*, 2015, 2018).

1.2 AMÍGDALA MEDIAL E SEU SUBNÚCLEO POSTERODORSAL

O MeA é um dos núcleos superficiais amigdalianos (De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004). É formado por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral do trato óptico e, posteriormente, em posição ventral em relação à estria terminal (De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004). Encontra-se em posição medial e posterior ao núcleo do trato olfatório e, como limite posterior, está aproximadamente onde surgem as porções temporais dos ventrículos cerebrais (Canteras; Simerly; Swanson, 1995; De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004). Em ratos, o MeA é dividido nos subnúcleos anterodorsal (MeAD), anteroventral (MeAV), posterodorsal (MePD) e posteroventral (MePV) (Canteras; Simerly; Swanson, 1995; Dall'Oglio *et al.*, 2008b, 2008a; De Olmos; Beltramino; Alheid, 2004; Newman, 1999).

Figura 1 – Representação esquemática do MePD de encéfalo de rato em corte coronal



MePD, subnúcleo posterodorsal do núcleo medial da amígdala; MePV, subnúcleo posteroventral do núcleo medial da amígdala; opt, trato óptico; st, estria terminal. Reproduzido e adaptado de Paxinos, G., and Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* Elsevier, 2006. (PAXINOS; WATSON, 2006).

Dentre as funções do MePD destacam-se: participação no processamento de informações olfativas e vomeronasais (Dielenberg; Hunt; McGregor, 2001; Guillamón; Segovia, 1997), regulação de comportamentos sociais (Newman, 1999), incluindo-se os comportamentos agressivo (Rasia-Filho *et al.*, 2012), sexual de machos e fêmeas (de Castilhos *et al.*, 2006), maternal, de ansiedade e medo condicionado ou inato e modulação emocional com respostas neuroendócrinas a estímulos estressantes (Rasia-Filho *et al.*, 2012). O MePD também desencadeia ajustes cardiovasculares simpáticos e parassimpáticos muito provavelmente relacionados à gênese e à modulação de comportamentos sociais (Rasia-Filho *et al.*, 2012).

Dentre suas ações, o papel do MePD na gênese e regulação do comportamento reprodutivo em ratos tem sido mais estudado (Mazzucco *et al.*, 2008; Pfaff *et al.*, 2006; Spiteri *et al.*, 2010a). Tal estrutura está em posição estratégica para modular a estimulação quimiossensorial proveniente das aferências oriundas do bulbo

olfatório, do órgão vomeronasal (Dominguez; Hull, 2001) e de diversos núcleos do hipotálamo (McDonald, 1998). A atividade do MePD é relevante para o comportamento sexual em machos (Dominguez; Hull, 2001), mormente para a intromissão peniana e para a ejaculação (de Castilhos *et al.*, 2008; Dominguez; Hull, 2001; Newman, 1999). Por exemplo, ratos com lesão no MePD perderam a ereção peniana provocada pelo odor da fêmea em estro, reduzindo o comportamento copulatório (Dominguez; Hull, 2001). De outro modo, a investigação olfativa genital, feita por machos em fêmeas, leva a um aumento da proteína Fos no MePD, o que igualmente ocorre após a ejaculação neste subnúcleo (Coolen *et al.*, 1997). Em fêmeas, o MePD é um componente neural de circuitaria neural que desinibe a ocorrência do comportamento de cópula feminina (Dalpian; Rasia-Filho; Calcagnotto, 2019). Isso coloca o MePD como importante área de estudo de possível modulação feita pelos hormônios gonadais em estrutura relevante para a organização de comportamentos necessários para a reprodução e perpetuação de espécie animal. Contudo, ainda não existem dados sobre a expressão gênica de receptores para hormônios gonadais ou para prolactina no MePD que possam ser correlacionados com sua modulação funcional.

1.3 HORMÔNIOS GONADAIS, DIMORFISMO SEXUAL E EFEITOS DA VARIAÇÃO HORMONAL OVARIANA CÍCLICA

Durante o ciclo estral de ratas, o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), a progesterona e a prolactina apresentam altos níveis plasmáticos especificamente em proestro (Sato; Nasu; Tsuchitani, 2016; Smith; Freeman; Neill, 1975). Já os níveis de estradiol começam a aumentar no diestro, atingindo níveis máximos durante o proestro e retornando à linha de base no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o diestro e em proestro ocorre o segundo pico maior desse hormônio (Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002; Sato; Nasu; Tsuchitani, 2016).

Hormônios gonadais, atuando em seus receptores, são reguladores da transcrição gênica no sistema nervoso central (SNC). A distribuição dos receptores para esteroides sexuais no MeA não é uniforme (Simerly *et al.*, 1990; Swann;

Newman, 1992). Em machos, cerca de 80 a 90% dos neurônios no MePD que possuem receptores para estrógeno também expressam os para andrógenos (Gréco *et al.*, 1998). Também são encontrados no MePD neurônios com ER α e ER β em machos e fêmeas (DonCarlos *et al.*, 2006; Petruilis, 2013) sendo que a concentração de receptores é tão evidente que chega a ter a mesma intensidade que nos diversos núcleos hipotalâmicos relacionados com a secreção neuroendócrina do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Shughrue; Lane; Merchenthaler, 1997; Voigt *et al.*, 2014). O MePD também apresenta receptores para a progesterona (De Vries; Simerly, 2002). Todos esses receptores mostram uma organização local complexa e dinâmica durante o ciclo estral ou, experimentalmente, na ausência de hormônios gonadais após a castração em adultos (De Vries; Simerly, 2002). Em conjunto, esses dados sugerem fortemente que os esteroides sexuais são capazes de modular a morfologia e a função das células presentes no MePD de machos e fêmeas (donde o termo “dimorfismo sexual”), embora devam existir diferenças entre os sexos dada a fisiologia reprodutiva que cada um apresenta (Guerra-Araiza; Coyoy-Salgado; Camacho-Arroyo, 2002). O MePD é sexualmente dimórfico (Dalpian; Rasia-Filho; Calcagnotto, 2019) por causa genética e pela ação local organizacional e ativacional dos esteroides sexuais (Gréco *et al.*, 1998; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Zancan *et al.*, 2018).

A ordem de descrição do estudo da expressão gênica no MePD está a seguir, conforme a interação destes genes.

1.3.1 Receptores α e β para estradiol e receptor de estrogênio acoplado à proteína G

Muitos dos efeitos mediados pelo estradiol se dão por ação de ER α e ER β além da membrana celular, e por sequências de sinalização intracelular (Marrocco; McEwen, 2016). Os comportamentos sociais femininos são modulados pela função dos receptores de estradiol (Le Moëne *et al.*, 2019), porém o ER α é o fundamental para o comportamento de receptividade sexual da fêmea (Le Moëne; Ågmo, 2018; Ogawa *et al.*, 1998) no núcleo hipotalâmico ventromedial (Spiteri *et al.*, 2010b). O bloqueio dos ER α nessa região do encéfalo gera redução ou supressão do

comportamento de lordose em ratas, parâmetro comportamental utilizado para medida da receptividade sexual. Já o ER β não parece estar envolvido em comportamentos reprodutivos, mas com a ansiedade, humor, aprendizado e memória (Mazzucco *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 1999; ter Horst, 2010). Ambos os receptores para estradiol e o receptor da progesterona (PRGR) estão presentes no MePD e o ER β é coexpresso em células que contém ER α ou PRGR (Gréco *et al.*, 1998)

Os fatores moleculares que controlam a expressão de RNAm dos receptores para estradiol, especialmente o do tipo α nos níveis de transcrição, não são conhecidos completamente (Saito; Cui, 2023; Wilson; Westberry; Prewitt, 2008). Há, no entanto, inter-relação entre hormônios e seus receptores com possibilidade de modificação de expressão sinérgica. Por exemplo, um dos efeitos mais relevantes do estradiol no SNC é induzir a expressão de receptores para progesterona (Maclusky; Mcewen, 1978). Por outro lado, o fator de transcrição STAT5, quando associado ao JAK2, mostrou ser ativado pela prolactina; e a sua inibição causa prejuízo na capacidade da prolactina aumentar a expressão de ER α (Champagne *et al.*, 2006).

O receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1) é um receptor formado por sete domínios transmembrana e que se liga aos estrogênios com alta afinidade (Revankar *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005). É um receptor não nuclear responsável pelas ações rápidas do estrogênio (Prossnitz; Barton, 2011) e regula sua própria expressão em várias regiões do SNC e periférico (Lu; Herndon, 2017). Este receptor se localiza na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Bessa *et al.*, 2015). Evidências indicam a participação do GPER1 mediada pelo estradiol para a cognição, depressão, dor e no comportamento de lordose (Lu; Herndon, 2017; Maggiolini *et al.*, 2004; Vajaria; Vasudevan, 2018) ao se demonstrar que o GPER1 atua independentemente de ER α e ER β , mas possivelmente estimula as mesmas vias de segundos-mensageiros e possui ações genômicas após sua ativação. Dessa forma, os efeitos dos estrogênios no encéfalo indicam uma provável dependência de expressão relativa e de localização celular de múltiplos receptores para estradiol (Waters *et al.*, 2015).

Um dos principais efeitos dos estrogênios no MeA é a modulação da preferência por parceiro sexual e no reconhecimento social para o que, nas fêmeas, há envolvimento do ER α e do GPER1 de maneira independente (Spiteri *et al.*, 2010b). Os estrogênios também medeiam o comportamento de agressividade. O envolvimento do ER α nessa região encefálica se dá pelo comportamento investigativo do “odor

social”, modulando a interação social e o comportamento agressivo (Ervin *et al.*, 2015) em machos e em fêmeas (Unger *et al.*, 2015).

1.3.2 Kisspeptina 1 e seu receptor

A kisspeptina 1 (KISS1), forma específica do neuropeptídeo kisspeptina, é codificada pelo gene KISS1 (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003; Stephens; Kauffman, 2017). Esse neuropeptídeo é crucial na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, controlando a reprodução sexual (Stephens; Kauffman, 2017). Além de ser um ligante para o receptor de kisspeptina 1 (KISS1R), também conhecido como receptor de GPR54 (de Roux *et al.*, 2003). Esse receptor apresenta uma expressão abundante na amígdala de ratos, evidenciado pela técnica de hibridização *in situ* (Lee *et al.*, 1999). Ao se ligar a esse receptor, a kisspeptina 1 estimula a liberação de GnRH e de LH e FSH (Dhillon *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005a, 2005b; Stephens; Kauffman, 2017). Esses hormônios, por sua vez, têm papel fundamental na regulação da função ovariana reprodutiva (Beltramino; Taleisnik, 1978; Stephens; Kauffman, 2017; Tyler; Gorski, 1980; Velasco; Taleisnik, 1971). Assim, a ausência da kisspeptina ou do seu receptor está relacionado a problemas de fertilidade e reprodução em humanos e em camundongos (Stephens; Kauffman, 2017). Ademais a ativação dos neurônios no MeA pela kisspeptina aumenta as interações sociais em camundongos, podendo influenciar o processamento olfativo social e/ou sexual; além dessa ativação diminuir o comportamento de ansiedade (Adekunbi *et al.*, 2018; Csabafi *et al.*, 2013; Kauffman *et al.*, 2007b; Stephens; Kauffman, 2017).

Esse neuropeptídeo e seus receptores estão localizados no hipotálamo, nos núcleos periventricular anteroventral, rostral e arqueado, e estão presentes em várias regiões extra-hipotalâmicas, como o MeA (Franceschini *et al.*, 2006; Gottsch *et al.*, 2004; Kauffman *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2005a, 2005b). O KISS1 é sexualmente dimórfico, havendo uma maior expressão gênica em ratas do que em ratos (Kauffman *et al.*, 2007a; Stephens; Kauffman, 2017), além de ser fortemente regulado pelos esteroides sexuais em camundongos e ratos (Homma *et al.*, 2009). Em camundongos *knockout* para ER α há aumento dos níveis de KISS1 no MeA quando tratados com

esteroides comparado com o grupo que não recebeu tratamento (Stephens *et al.*, 2016) e esse efeito não ocorre em camundongos *knockout* para ER β (Smith *et al.*, 2005b; Stephens *et al.*, 2016).

A expressão gênica de KISS1 no MeA também é sexualmente dimórfica e varia de acordo com o ciclo estral em camundongo e rato (Homma *et al.*, 2009). Fêmeas dessas espécies em proestro apresentam uma expressão maior, quando comparado as outras fases do ciclo (estro e diestro), e quando há altos níveis de estradiol circulante (Homma *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012). Machos apresentam uma expressão de KISS1 no MeA maior do que fêmeas em diestro (Homma *et al.*, 2009). Além do estradiol, a sinalização pelo GABA (ácido gama-aminobutírico) via receptor GABA_B (receptor de ácido gama-aminobutírico tipo B) também atua fortemente na regulação da expressão de KISS1 no MeA em camundongos (Di Giorgio *et al.*, 2014). Contudo, essa expressão no MeA só é detectada em roedores adultos, quando os esteroides estão mais elevados, não sendo detectados em roedores em período pós-natal e pré-púberes (Cao; Patisaul, 2013; Di Giorgio *et al.*, 2014).

1.3.3 Receptor de progesterona

Muitas diferenças sexuais foram relatadas em relação às ações da progesterona no SNC na modulação do comportamento sexual e nos efeitos ansiolíticos (Guerra-Araiza; Coyoy-Salgado; Camacho-Arroyo, 2002). A progesterona modula comportamentos típicos femininos, como o de lordose lombar durante a atividade sexual e o comportamento maternal (Wagner, 2006). Ratos adultos também exibem PRGR, os quais podem influenciar comportamentos mediados pela testosterona (Schneider *et al.*, 2003). Exemplo disso são os camundongos *knockout* para PRGR castrados não terem sido capazes de restaurar completamente o comportamento sexual mediante terapia substitutiva com testosterona (Phelps *et al.*, 1998). Por outro lado, níveis suprafisiológicos de progesterona inibem o comportamento sexual masculino (Nyante *et al.*, 2012; Wagner, 2006). Assim, os níveis de progesterona podem ser determinantes para a inibição da ação da

testosterona ou para cooperar com a regulação do comportamento sexual (Nyante *et al.*, 2012)

Os receptores deste hormônio possuem alta concentração no MePD (De Vries; Simerly, 2002) e são os reguladores da ação da prolactina encefálica (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), além de modular a forma e conectividade neuronal, mormente a densidade dos espinhos dendríticos, dependendo da fase do ciclo estral ou de manipulações com terapia substitutiva após a castração de ratas adultas (de Castilhos *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2004). Os espinhos dendríticos no MePD são elementos pós-sinápticos relacionados com a estabilidade e a plasticidade sináptica, apresentam-se em maior número em machos do que em fêmeas em proestro, quando há uma maior quantidade de estradiol e progesterona em circulação nas fêmeas, como acima descrito (Brusco *et al.*, 2014; Rasia-Filho *et al.*, 2004).

1.3.4 Prolactina e seus receptores, EGR1, JAK2, STAT5A e STAT5B

A prolactina (PRL) é um hormônio fundamental na lactação, mas também pode agir como neuromodulador no SNC, podendo influenciar a plasticidade sináptica, promovendo neurogênese ou sobrevivência neuronal no hipocampo após evento estressante (Mak *et al.*, 2007). O MePD apresenta alta densidade de receptores para PRL (Allen Institute for Brain Science, 2022) e fibras imunorreativas à PRL em seu neurópilo (Harlan *et al.*, 1989). A PRL pode ser também sintetizada e secretada por tecidos extra-hipofisários (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Marano; Ben-Jonathan, 2014). Ratos, após serem submetidos à hipofisectomia, passam a ter expressão de PRL em diferentes locais do encéfalo, inclusive na amígdala (DeVito *et al.*, 1992; Emanuele *et al.*, 1992). Há PRL na amígdala de fetos de ovinos (Roselli *et al.*, 2008), embora, em todas as espécies estudadas até o momento, não se saiba qual é a função exercida por esse hormônio ou neuromodulador no MePD (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017).

A PRL exerce sua ação ligando-se a um receptor (PRLR) de membrana que apresenta isoformas moleculares descritas em diferentes espécies (Clevenger; Kline, 2001; Freeman *et al.*, 2000). Em ratos há três isoformas principais, sendo elas: a longa (591 aminoácidos), intermediária (393 aminoácidos) e curta (291 aminoácidos),

diferindo somente no domínio citoplasmático (Chilton; Hewetson, 2005; Shiota *et al.*, 1990), mas podendo implicar em diferentes vias de transdução de sinal para cada forma (O'Neal; Yu-Lee, 1994).

No MeA e em outras estruturas encefálicas estão presentes essas isoformas do PRLR (Bakowska; Morrell, 2003). O estrogênio regula a expressão do PRLR e sua sinalização em áreas cerebrais específicas (Anderson *et al.*, 2008), com similaridade de expressão para PRLR e ER α em alguns núcleos cerebrais (Brown *et al.*, 2010; Simerly *et al.*, 1990). Na área pré-óptica medial hipotalâmica, área sexualmente dimórfica, a regulação da expressão de PRL se dá por hormônios gonadais, ou seja, por testosterona e seu metabólito estrógeno no receptor α para, então, induzir a expressão de PRL (Quadros *et al.*, 2002). Grande porcentagem de neurônios imunorreativos à PRL no núcleo paraventricular hipotalâmico expressam também o ER β , o que indica efeito direto do estrogênio na produção de PRL (Suzuki; Handa, 2005).

A PRL pode modular a plasticidade de neurônios ocitocinérgicos no hipotálamo de fêmeas pela indução do gene de respostas ao crescimento inicial – 1 (EGR1) dependente de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases) (Blume *et al.*, 2009). Este tem papel na regulação de genes de transcrição envolvidos na reprodução feminina (Lee *et al.*, 1996), crescimento de neuritos (Harada *et al.*, 2001), regulação do proteossoma neuronal (James; Conway; Morris, 2006) e a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Wong *et al.*, 2004). O EGR1 é particularmente interessante por sua relação com proteínas que são essenciais para a plasticidade sináptica (Knapska; Kaczmarek, 2004; O'Donovan *et al.*, 1999).

A expressão de EGR1 parece ser sexualmente dimórfica e modulada por esteroides sexuais (Duclot; Kabbaj, 2015, 2017) dependendo da região do SNC estudada. Exemplo disso é o bloqueio da expressão de EGR1 no córtex pré-frontal, o que causa aumento da ansiedade com efeito maior observado em machos do que em fêmeas (Stack *et al.*, 2010). Inibição da aromatase, enzima que transforma testosterona em estradiol, induz diminuição da expressão de EGR1, o que pode variar entre machos e fêmeas como forma de modular a via de sinalização para ativação neuronal de tal gene (Krentzel; Remage-Healey, 2015), ainda assim dependendo da região do SNC estudada.

A PRL também é responsável por aumentar especificamente a fosforilação da tirosina de Janus quinase 2 (JAK2), e a subsequente fosforilação de STAT5A e

STAT5B (DeVito; Stone, 1999). Isso ocorre, pois, a ligação da PRL ao seu receptor estimula a tirosina quinase Jak2 ligada ao receptor e a subsequente fosforilação da tirosina (Mayr *et al.*, 1998). A ativação do PRLR estimula uma série de vias de sinalização, incluindo as mediadas por proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT) (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Hennighausen; Robinson, 2008), predominantemente pela STAT5 (Copeland *et al.*, 1995; Wakao; Gouilleux; Groner, 1994). Este é então recrutado para sítios fosforilados e é ele próprio fosforilado (Kirken *et al.*, 1997). Após ocorre a dissociação do receptor, o STAT5 fosforilado (pSTAT5) com a dimerização e translocação para o núcleo pode regular a atividade transcricional de genes sensíveis à PRL (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Brown; Herbison; Grattan, 2011; Chilton; Hewetson, 2005; Soldaini *et al.*, 2000; Wakao; Gouilleux; Groner, 1994).

O STAT5 possui duas isoformas homólogas, as quais partilham 96% de identidade de aminoácidos, STAT5A e STAT5B (Copeland *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Mui *et al.*, 1995). Essas isoformas são frequentemente co-expressas em tecidos, podendo aumentar a possibilidade de redundância funcional entre as isoformas (Hennighausen; Robinson, 2008). Porém, as células podem apresentar uma ativação preferencial de STAT5A ou STAT5B quando são expostas à PRL. Deste modo, como o STAT5B é o mediador primário da ação da PRL no hipotálamo, e não o STAT5A, sugere-se que cada isoforma possui uma atividade biológica única (Yip *et al.*, 2012). Por exemplo, o STAT5A medeia predominantemente a sinalização da PRL na glândula mamária, enquanto a do fígado envolve o STAT5B (Grimley, 1999; Liu *et al.*, 1997; Udy *et al.*, 1997), além de ser responsável pelo *feedback* negativo mediado pela PRL via neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares (TIDA) (Grattan *et al.*, 2001).

A sinalização do STAT5 cerebral é necessária para modular o aprendizado e a formação da memória espacial, de medo condicionada ao contexto e aversiva, sendo assim um importante mecanismo celular para regular as funções cognitivas (Furigo *et al.*, 2018) e nos neurônios que possuem o neuropeptídeo KISS1 a expressão do STAT5 regula o momento da puberdade (Silveira *et al.*, 2017). Deste modo, o papel da sinalização cerebral STAT5 está relacionado na formação da memória, neuroplasticidade, comportamento e outros aspectos cognitivos (Gisabella *et al.*, 2016; Larsen; Grattan, 2010, 2012; Li *et al.*, 2002; Nyberg; Hallberg, 2013; Oomura *et al.*, 2006; Paz-Filho *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). Camundongos deficientes em STAT5B não conseguem manter o dimorfismo sexual da de crescimento corporal,

além das fêmeas abortarem entre o 8º e o 17º dia de gestação, sem defeitos maternos, placentários ou fetais evidentes (Udy *et al.*, 1997). Tais animais também apresentam atraso no crescimento de pelos e defeitos na regulação da gordura corporal, com significativamente menos presença de tecido adiposo tanto em machos como em fêmeas (Udy *et al.*, 1997). Visto que, a perda da sinalização STAT5 no cérebro também altera o equilíbrio energético e leva à obesidade de início tardio, principalmente em fêmeas de camundongos (Lee *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2012).

Um dos objetivos da presente dissertação é estudar o que ocorre com a expressão gênica de todos os elementos acima descritos especificamente no MePD, o que ainda é inédito na literatura.

1.4 COMPORTAMENTO DE LORDOSE EM RATAS

A receptividade das fêmeas ao macho é quantificada pela exacerbação da lordose lombar durante a cópula, expondo a vagina para penetração peniana. O número de vezes e a intensidade do comportamento de lordose é indicativo de receptividade sexual em ratas. Esse reflexo, que se associa com a desinibição do comportamento sexual, ocorre ciclicamente devido à concomitante presença de altos níveis circulantes de estrogênio e de progesterona em resposta à informação tátil sensorial causada pelo macho quando se coloca acima do dorso da fêmea para a cópula (Nelson, 1995).

Várias estruturas cerebrais são necessárias para o comportamento de lordose, como o hipotálamo, cuja lesão do núcleo ventromedial ou destruição de suas fibras aferentes e eferentes reduzem a frequência de lordose. Lesões na região cinzenta central também reduzem o comportamento de lordose. E a destruição do feixe noradrenérgico mesencefálico ventral elimina completamente esse comportamento (Nelson, 1995).

A PRL possui função na regulação das vias neuroendócrina envolvidas no comportamento de cópula. A administração aguda intracerebral de PRL estimula o comportamento de lordose (Harlan; Shivers; Pfaff, 1983). Níveis anormalmente altos de PRL podem inibir a lordose em ratas devido ao efeito antigonadotrófico (Dudley; Jamison; Moss, 1982). Por outro lado, a administração de bromocriptina, agonista

dopaminérgico, inibe a secreção de PRL durante o proestro e inibe a receptividade da fêmea (Plant; Zeleznik, 2015; Witcher; Freeman, 1985). É mais recente a síntese de fármaco bloqueador seletivo do PRLR (Del1-9-G129R-hPRL) (Bernichtein *et al.*, 2003) e não há ainda na literatura dados sobre qual a função exercida por este fármaco ou pela PRL no MePD de ratas.

A PRL apresenta uma elevação dos seus níveis circulantes em proestro, podendo estar relacionada ao comportamento sexual da fêmea (Witcher; Freeman, 1985), mas o quanto o MePD é responsável por desinibir a ocorrência de lordose lombar por ação da PRL local ainda precisa ser estudado. Uma das abordagens para tanto é bloquear o efeito endógeno da PRL no MePD e quantificar o comportamento sexual feminino quando em proestro, outro objetivo da presente dissertação para integrar os raciocínios e conhecimentos existentes com os experimentos aqui desenvolvidos.

1.5. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho é inédito ao estudar a expressão gênica de *ER α* , *ER β* , *GPER1*, *KISS1*, *KISS1R*, *PRGR*, *PRL*, *PRLR curto e longo*, *EGR1*, *JAK2*, *STAT5A* e *STAT5B* no MePD comparando-se machos e fêmeas ao longo do ciclo estral. Isso é relevante pelo fato de o MePD ser uma região sexualmente dimórfica que participa da modulação do comportamento reprodutivo e sensível a ação cíclica dos esteroides sexuais e da PRL. Ademais, os dados aqui apresentados poderão elucidar questões funcionais importantes relacionadas com as modificações dinâmicas na estrutura e função neuroglial e sináptica previamente descritos para o MePD de machos e fêmeas (Gréco *et al.*, 1998; Newman, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Zancan *et al.*, 2015), gerando novas evidências da modulação hormonal na atividade celular neste subnúcleo em ambos os sexos e ao longo das fases do ciclo ovulatório. Como ainda se desconhece qual é a função exercida pela PRL no MePD, podem-se obter dados básicos fundamentais para relacionar tal hormônio com circuitaria neural relevante para a emissão do comportamento sexual da fêmea em proestro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a variação da expressão gênica de receptores para estradiol (*ER α* , *ER β* e *GPER1*), de Kisspeptina 1, de progesterona, prolactina e seus receptores, *EGR1*, *JAK2*, *STAT5A* e *STAT5B* no MePD de ambos os hemisférios cerebrais de ratos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral. Adicionalmente, estudar a modulação da PRL no MePD sobre o comportamento sexual de ratas em proestro (conforme projeto aprovado sob pareceres 616/19 e 641/19 incluídos nos Anexos I e II).

2.1.1 Objetivos específicos

- i. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *ER α* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR).
- ii. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *ER β* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- iii. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *GPER1* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- iv. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *KISS1* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- v. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *KISS1R* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.

- vi. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *PRGR* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- vii. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *PRL* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- viii. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *PRLR curto e longo* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- ix. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *EGR1* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- x. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *JAK2* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- xi. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *STAT5 A* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- xii. Estudar a expressão gênica no MePD dos hemisférios direito e esquerdo de *STAT5B* e comparar tais resultados em machos e em fêmeas em diestro, proestro e estro empregando-se técnica de q-PCR.
- xiii. Estudar o efeito da microinjeção estereotáxica de antagonista dos receptores para prolactina (Del1-9-G129R-hPRL) e da combinação com prolactina no MePD direito sobre o comportamento sexual de lordose em ratas em proestro.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos durante este trabalho estão descritos no seguinte artigo científico, que foi redigido de acordo com as normas da revista *Behavioural Brain Research* e será submetido à mesma.

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram várias diferenças importantes na expressão gênica relacionada com sexo e fase do ciclo ovulatório no MePD. Como resposta ao estrógeno circulante, o gene *ER α* no MePD de fêmeas em diestro (no hemisfério direito) e proestro (no hemisfério esquerdo) apresentam maior expressão relativa deste receptor quando comparado com os machos, sugerindo que esse receptor especificamente apresenta dimorfismo sexual e pode ser um dos principais elementos a gerar respostas morfológicas e eletrofisiológicas mediada por esteroides sexuais previamente descritas nessa região (Rasia-Filho et al., 2004; Brusco et al., 2014; Dalpian et al., 2019). Para a expressão dos genes do *ER β* , *PRGR*, *PRLR longo*, *EGR1*, *JAK2* e *STAT5A* não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Adicionalmente, o gene do *GPER1* mostrou uma diferença da expressão entre hemisférios direito e esquerdo, apresentando uma maior expressão relativa no hemisfério direito de machos e fêmeas em diestro e estro quando comparado com o hemisfério esquerdo, além da expressão em fêmeas em diestro no hemisfério direito quando comparado com os valores menores de fêmeas em proestro. Esses dados identificam efeito da variação cíclica dos esteroides ovarianos e da lateralidade hemisférica na expressão gênica de *GPER1*.

O gene *KISS1* no MePD de machos também apresentou maior expressão relativa quando comparado com fêmeas em diestro e em estro, para ambos os hemisférios encefálicos, assim, sugerindo que esse gene apresenta dimorfismo sexual de acordo com a fase do ciclo estral. Para o gene do receptor *KISS1R* houve maior expressão somente no hemisfério esquerdo de fêmeas em diestro quando comparado com machos, sugerindo novamente a presença de diferença sexual de acordo com a fase do ciclo estral.

O mesmo ocorre para a expressão do gene da *PRL* no hemisfério esquerdo em que fêmeas em diestro, proestro e estro tiveram uma maior expressão quando comparado com machos. Já a expressão do *PRLR curto* no MePD do hemisfério esquerdo apresentou uma maior expressão em fêmeas em estro quando comparadas com machos, salientado a presença de diferença sexual conforme a fase do ciclo estral. Ainda, a expressão do gene *STAT5B* mostrou uma diferença em sua expressão entre os hemisférios direito e esquerdo, apresentando uma maior expressão relativa

no hemisfério direito de fêmeas em diestro, proestro e estro quando comparado com dados do hemisfério esquerdo de machos e fêmeas em diestro, além da expressão em fêmeas em proestro no hemisfério esquerdo foi maior quando comparado com machos do mesmo hemisfério, indicando a presença de dimorfismo sexual, lateralidade hemisférica e efeito da variação cíclica hormonal.

Estudos de expressão gênica utilizam a suposição básica de que a síntese de proteínas está relacionada com a presença de RNAm, sem variação na eficiência da tradução durante o ciclo celular (Cooper; Shedden, 2007). Em geral, tanto nas bactérias quanto nos eucariotos, as concentrações celulares de proteínas se correlacionam com a quantidade de RNAm correspondentes (Šponer *et al.*, 2018). A técnica de RT-qPCR já está bem estabelecida como forma de estudo e quantificação de RNAm no sistema nervoso e, neste caso, no MePD de ratos (Cao; Patisaul, 2011; Nutsch *et al.*, 2017) além de diversas outras regiões encefálicas (Hernandez *et al.*, 2019; Lake; Corrêa; Müller, 2019; Zoubková *et al.*, 2019). É preciso, porém, considerar que a síntese de proteínas pode mudar sob diferentes condições celulares e nos mecanismos que governam sua regulação (Vogel; Marcotte, 2012) e buscar relacionar os presentes resultados com os efeitos dos esteroides sexuais com dados morfológicos e funcionais previamente relatados previamente para a mesma área. Isso será feito nos próximos parágrafos, integrando os dados inéditos obtidos com a notável plasticidade do MePD de ratos.

É relevante que a ação dos esteroides sexuais em seus receptores tem efeitos regulatórios na morfologia neuroglial e na possibilidade de modulação sináptica específicas em cada área do sistema nervoso e dependendo do tipo celular envolvido e suas conexões (De Vries; Simerly, 2002; Rasia-Filho *et al.*, 2012). Os níveis dos esteroides circulantes entre roedores se diferem pelo sexo na expressão dos receptores hormonais, assim, podendo estar relacionado com a regulação da expressão gênica ou das proteínas componentes de seus receptores (De Vries; Simerly, 2002; Rasia-Filho *et al.*, 2012). As diferenças sexuais no número de neurônios que expressam receptores de hormônios gonadais e as diferenças nos níveis de receptores em células individuais em vias sexualmente diferenciadas fornecem um nível adicional de regulação celular que pode contribuir para a expressão do comportamento reprodutivo (De Vries; Simerly, 2002). Ademais, núcleos encefálicos sexualmente dimórficos de roedores exibem altos níveis de atividade da enzima aromatase, a qual converte testosterona em estradiol (De Vries; Simerly,

2002). Os altos níveis dessa enzima no MeA indicam que o receptor de estrogênio pode estar relacionado com a ativação da função celular nesta região e ser maior em machos do que fêmeas, enquanto nessas a variação é cíclica da atividade induzida por esteroides (De Vries; Simerly, 2002).

Machos ou fêmeas em diestro possuem mais espinhos dendríticos proximais e recebem mais estímulos sinápticos excitatórios do que fêmeas em proestro e em estro (Dalpian; Rasia-Filho; Calcagnotto, 2019; Rasia-Filho *et al.*, 2004), ao mesmo tempo que machos e fêmeas em diestro apresentam maior volume do corpo celular (Hermel *et al.*, 2006). Em fêmeas em proestro foi identificada maior densidade de espinhos somáticos (Zancan *et al.*, 2015). Ou seja, os níveis elevados de estrogênio e progesterona durante o proestro atuam em seus receptores nos neurônios do MePD causando alterações em sua forma e função (Brusco *et al.*, 2014; Gréco *et al.*, 1998; Newman, 1999; Rasia-Filho *et al.*, 2004).

A expressão gênica descrita aqui sugere que, no MePD, o efeito esteroide principal ocorra em receptores do tipo α para estradiol, mas não se descartam as interações funcionais importantes com os receptores de tipo β para estradiol e para progesterona. É interessante que receptores de tipo α e β para estradiol existem no MePD em camundongos machos e fêmeas, mas fêmeas tem mais expressão do tipo α enquanto para os do tipo β não há diferença entre os sexos (Stanić *et al.*, 2014). Nossos dados podem se relacionar com esse achado, guardadas as diferenças entre espécies estudadas. Isso também está de acordo com o achado de que a expressão do receptor do tipo β para estradiol é sexualmente dimórfica no MePD nas primeiras horas pós-natal, mas no quarto dia de vida pós-natal essa condição deixa de ocorrer devido à diminuição observada nas fêmeas (Cao; Patisaul, 2013). A diferença na expressão do receptor do tipo α manteve-se constante ao longo do tempo (Cao; Patisaul, 2013), reforçando a possibilidade de que as principais ações mediadas pelo estradiol envolvem a ação do receptor α para estradiol no MePD de animais adultos.

Estrogênio também controla positivamente a expressão do RNAm para PRGR em várias regiões encefálicas (Romano; Krust; Pfaff, 1989) e este receptor também é reconhecido como importante regulador da ação central da PRL (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). O PRGR está presente no MePD (De Vries; Simerly, 2002) e modula ações sobre os espinhos dendríticos de forma diferente em ratas intactas ou em ratas castradas. Ou seja, em proestro, com o pico de estrógeno e progesterona em circulação, ocorre redução na densidade de espinhos dendríticos no MePD (Rasia-

Filho *et al.*, 2004), mas ratas castradas que receberam progesterona após injeção de estradiol apresentam aumento na densidade de espinhos dendríticos nessa área (de Castilhos *et al.*, 2008). Isso significa que ação da progesterona em seu receptor no MePD pode ser complexa e diferente em condição fisiológica ou após a reestruturação que o encéfalo experimenta após a ovariectomia (de Castilhos *et al.*, 2008).

De fato, o dimorfismo sexual e a variação cíclica dos hormônios ovarianos influenciam de forma significativa a cinética do potencial pós-sináptico excitatório espontâneo dos neurônios no MePD (Dalpian; Rasia-Filho; Calcagnotto, 2019). Essa modulação da transmissão sináptica tem sido descrita como mediada por esteroides sexuais (Hansberg-Pastor *et al.*, 2015; Sellers; Raval; Srivastava, 2015) e bem se relaciona com a alta densidade de ambos os receptores para estradiol, progesterona e testosterona que o MePD apresenta em ratos adultos (De Vries; Simerly, 2002; Gréco *et al.*, 1998; Simerly *et al.*, 1990). Além da ação local, os esteroides sexuais também podem modificar dinamicamente a atividade das aferências para os neurônios do MePD, gerando os resultados eletrofisiológicos de maior excitabilidade dessas células em machos e fêmeas em diestro e menor em fêmeas em proestro (Cooke; Stokas; Woolley, 2007; Dalpian; Rasia-Filho; Calcagnotto, 2019; Rasia-Filho *et al.*, 2004). É notável que isso representa diferença entre os sexos e uma plasticidade em fêmeas adultas que ocorre ao longo de 4-5 dias em cada ciclo ovulatório.

Nossos achados foram obtidos em animais adultos, o que se soma às ações ontogenéticas regulatórias dos esteroides sexuais na expressão de seus receptores e podem ser importantes durante os períodos de desenvolvimento intrauterino para a neurogênese e a diferenciação sexual ou durante a puberdade (De Vries; Simerly, 2002; Johnson; Breedlove; Jordan, 2008; Schulz; Sisk, 2016). Há diferenças entre os sexos na magnitude e organização temporal de tais respostas regulatórias (De Vries; Simerly, 2002; Kudwa *et al.*, 2009). Isso pode fazer que se mudem os espinhos dendríticos e seu impacto no processamento pós-sináptico das aferências que chegam ao MePD e, com isso, modulando a atividade dos circuitos amígdalo-hipotalâmicos, reduzir a inibição há na emissão do comportamento sexual feminino e estimular a liberação de GnRH para a ovulação (Dalpian; Rasia-Filho; Calcagnotto, 2019; Rasia-Filho *et al.*, 2012).

A expressão gênica e seu processamento pós-tradução também podem contribuir para a heterogeneidade na expressão de receptores para estrogênio (De

Vries; Simerly, 2002). A expressão de fatores de transcrição secundários pode exibir uma organização temporal complexa, controlando, dessa forma, as influências reguladoras dos hormônios circulantes na expressão de seus respectivos receptores durante períodos específicos (De Vries; Simerly, 2002). Os esteroides sexuais controlam o desenvolvimento de circuitos neurais no prosencéfalo de mamíferos e regulam não apenas a atividade neuronal, mediada por transmissão sináptica, mas também influenciam a expressão gênica desses receptores ajustando, assim, a responsividade das vias sensíveis a tais hormônios (Black; Adler; LaGamma, 1986; De Vries; Simerly, 2002). Além disso, existe coexpressão em neurônios no MePD do receptor α para estradiol, receptor de progesterona e receptor de andrógenos (Gréco *et al.*, 2001; Gréco; Lubbers; Blaustein, 2003; Shughrue; Merchenthaler, 2001; Shughrue; Lane; Merchenthaler, 1997).

Muito interessante também foi o achado de que o *GPER1* apresentou diferença em sua expressão gênica no MePD relacionada com hemisfério encefálico, o sexo e a fase do ciclo estral uma vez que hemisfério direito de machos e fêmeas em diestro e estro tiveram uma expressão maior que hemisfério esquerdo, além de fêmeas em diestro no hemisfério direito tiveram uma expressão maior que fêmeas em proestro. *GPER1* está relacionado com ações rápidas e não-genômicas do estradiol, podendo atuar como modulador das ações geradas pela ativação do receptor α para estradiol e regular a espinogênese em áreas nervosas que modulam o comportamento sexual feminino de lordose lombar e o aprendizado social (Vajaria; Vasudevan, 2018). Entretanto, a ação complexa do *GPER1* também pode ocorrer independentemente de ambos os receptores para estradiol (Hadjimarkou; Vasudevan, 2018; Levin, 2009). A isso se soma o fato de que a expressão de *KISS1* é sexualmente dimórfica no MeA de ratas e camundongos fêmeas (Homma *et al.*, 2009). Resultado similar ocorreu com a expressão gênica de *KISS1* no MePD, em que machos tiveram uma maior expressão que fêmeas em diestro e em estro tanto no hemisfério direito quanto esquerdo. O mesmo ocorreu para o seu receptor, *KISS1R*, em que machos tiveram uma expressão maior do fêmeas em diestro, porém somente no hemisfério esquerdo, achado para o MePD que se difere do foi encontrado em outras áreas onde houve maior expressão gênica em ratas do que em ratos (Kauffman *et al.*, 2007a; Stephens; Kauffman, 2017). Ademais, a expressão de *KISS1* diminui com tratamento com estradiol e testosterona no núcleo arqueado, evidenciando a possibilidade de que o *KISS1* participe do feedback negativo dos esteroides gonadais e da liberação pulsátil

da secreção de GnRH (Kauffman *et al.*, 2007a; Smith *et al.*, 2005a, 2005b; Stephens; Kauffman, 2017). Dessa forma, a baixa expressão do gene *KISS1* nas fêmeas pode ser esclarecida pela sua relação com a alta expressão de estradiol no núcleo arqueado, sobretudo o estradiol alfa.

Por sua vez, a *PRL* e seu *PRLR curto* no MePD do hemisfério esquerdo apresentou variações de expressão gênica entre os grupos estudados. Isso indica que a síntese local da prolactina depende de sexo, efeitos cíclicos dos esteroides sexuais e do hemisfério cerebral, apesar de não ocorrer variações na expressão do *PRLR longo*. Como todas as áreas nervosas, o MePD pode também receber *PRL* da circulação, porém há axônios aferentes provenientes do hipotálamo que se utilizam de *PRL* como transmissor químico (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Harlan *et al.*, 1989). No núcleo paraventricular hipotalâmico, a síntese de *PRL* é modulada por ação dos receptores do tipo β para estradiol, mas não pelos do tipo α (Suzuki; Handa, 2005). A ação preferencial de um tipo de receptor para o estradiol, que não foi diferente entre os grupos estudados, poderia explicar por que, enquanto há maior quantidade de *PRL* em circulação durante o proestro, não ocorre aumento da expressão gênica dos receptores para prolactina no MePD entre as fêmeas ao longo do ciclo estral. Outra possibilidade a ser testada é a modulação da expressão gênica para *PRL* e seus receptores no MePD ser diferente quando da gravidez e para a organizar o comportamento maternal (Bridges *et al.*, 1990; Furigo *et al.*, 2014).

Muito provavelmente, os efeitos da *PRL* são diferentes em cada região encefálica a ser estudada (Bakowska; Morrell, 2003). Isso porque a reposição de esteroides em ratas ovariectomizadas aumentou a quantidade de *PRLRs* especificamente na área pré-óptica hipotalâmica e no plexo coroide (Anderson *et al.*, 2008). Os mecanismos pós-transcricionais também podem estar envolvidos na interação entre os hormônios sexuais e a *PRL* e seu receptor no encéfalo de ratos (Furigo *et al.*, 2014), assim como interferir em sequências de sinalização intracelular (Anderson *et al.*, 2008). É o caso da ação do receptor do tipo α para estradiol na atividade transcricional de *STAT5* induzida pela *PRL* (Faulds *et al.*, 2001). Não há nenhum dado desse tipo disponível para o MePD até o presente momento na literatura, o que está aberto para novas contribuições.

A expressão gênica de *EGR1* não apresentou diferença significativa relacionada com sexo e fase do ciclo estral, embora pudesse estar envolvida com mecanismos de transcrição envolvidos na reprodução feminina, como os de secreção

no eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Lee *et al.*, 1996). Por exemplo, a expressão de *EGR1* na hipófise anterior de ratas foi maior em proestro do que em diestro (Gajewska *et al.*, 2014), em associação temporal com o aumento da síntese da PRL hipofisária (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017) e o pico de PRL circulante que ocorre nessa fase específica (Smith; Freeman; Neill, 1975). Adicionalmente, a estimulação dos receptores α e β para estradiol regulam o RNAm de *EGR1* em ratas ovariectomizadas (Gajewska *et al.*, 2014). Embora valha aqui a discussão sobre as ações diferentes dos esteroides ovarianos em situação normal ou após a castração, tais achados indicam diferenças dependentes das áreas nervosas estudadas igualmente para o *EGR1*.

Para a transdução do sinal da PRL após a ligação com o seu receptor empregam-se *JAK2* e *STAT5* (Chilton; Hewetson, 2005). No MePD, a expressão gênica de *JAK2* e de *STAT5A* não apresentou diferenças entre grupos experimentais, diferente do que foi encontrado para a expressão do gene *STAT5B*, que apresentou maior expressão no hemisfério direito e influência da variação cíclica hormonal em ratas. Há PRL no MePD (Allen Institute for Brain Science, 2022) e a variação da expressão da *STAT5B* observada pode estar relacionada com a ação da PRL nessa região para a modulação da atividade neural local, como ocorre no hipotálamo (Yip *et al.*, 2012) ou, como outra possibilidade, participar do mecanismo central de feedback negativo mediado pela ação da própria PRL (Grattan *et al.*, 2001). Não há nenhum dado desse tipo disponível para o MePD até o presente momento na literatura.

Neste sentido, testamos também o papel da PRL no MePD na modulação do comportamento sexual feminino. Para tanto, avaliou-se a receptividade sexual feminina ao macho com a expressão do comportamento de lordose, apresentado pelos altos níveis circulantes de estrogênio, progesterona (Nelson, 1995) e de PRL (Harlan; Shivers; Pfaff, 1983). Pela primeira vez se descreve que a microinjeção de 1 μ M/0,3 μ L ou 10 μ /0,3 μ L do antagonista da prolactina (Del1-9-G129R-hPRL) apresentou uma diminuição na expressão do comportamento de lordose completa de ratas em proestro quando comparada com as ratas que receberam o veículo (solução salina 0,9%). Ou seja, o bloqueio da ação da PRL em seus receptores no MePD direito gera efeito inibidor quando microinjetada três horas antes de iniciar o ciclo escuro, período do teste comportamental, e feita ao longo do pico fisiológico cíclico da PRL circulatória em ratas em proestro. O bloqueio mais intenso da expressão plena do comportamento de lordose foi revertido parcialmente, a ponto de não ser mais diferente estatisticamente dos valores do grupo controle, pela microinjeção combinada

do antagonista dos PRLR junto com PRL. Tais dados são uma nova peça na interpretação das ações da PRL no tecido nervoso e se somam aos resultados prévios de que a administração de PRL por via intracerebral estimula a ocorrência de comportamento sexual feminino (Harlan; Shivers; Pfaff, 1983). Um dos locais onde a ação da PRL pode ocorrer é o MePD e, dele, para sua circuitaria em relação ao hipotálamo, cuja organização dinâmica é tal que isso somente deva ocorrer de forma marcada em uma fase específica do ciclo estral. A plasticidade envolvendo forma e função dos neurônios do MePD direito de ratas se associa com a maior presença de sinapses inibitórias moduláveis em troncos dendríticos, dos espinhos dendríticos e somáticos, e as diferenças de processamento sináptico cíclicas com modificação na dinâmica entre excitação e inibição registradas eletrofisiologicamente em proestro (Rasia-Filho et al., 2004, 2012; Brusco et al., 2014; Dalpian et al., 2019). A PRL no MePD passa a ser componente deste arranjo da plasticidade neural para ajustar precisamente o tempo da desinibição de comportamento sexual, ovulação e chance de reprodução da espécie.

Em um estudo, foi avaliado os níveis de PRL urinária de fêmeas e machos de saguis cabeça de algodão, o qual esses níveis variavam de acordo com a quantidade de comportamento sexual e do contato parenteral, confirmando a hipótese que tanto a PRL quanto a ocitocina estão envolvidas nestes comportamentos (Snowdon; Ziegler, 2015). Dessa maneira, evidencia ainda mais o papel da PRL de possuir uma grande influência na expressão do comportamento materno pós-parto, conforme já foi estudado na área pré-óptica medial de camundongos (Brown *et al.*, 2017). Todavia ainda é desconhecido o efeito da PRL no comportamento materno no MePD de ratas, sendo um tópico extremamente relevante para ser estudado.

5 CONCLUSÃO

Os presentes resultados indicam que o MePD tem expressão gênica distinta entre machos e fêmeas, incluindo a variação do ciclo estral, e com diferença entre os hemisférios cerebrais. Há expressão gênica de *ER α* , *ER β* , *GPER1*, *KISS1*, *KISS1R*, *PRGR*, *prolactina*, *PRLR curto e longo*, *EGR1*, *JAK2*, *STAT5A* e *STAT5B* no hemisfério direito e esquerdo do MePD de machos e de fêmeas ao longo do ciclo estral. Contudo, a expressão de *ER α* , *PRL* e *STAT5B* é maior em fêmeas que em machos. A expressão de *KISS1* é maior em machos do que em fêmeas. A expressão de *GPER1* é maior em fêmeas em diestro do que em proestro. Há também diferenças entre os hemisférios cerebrais, ora com maior expressão no lado direito, ou no lado esquerdo, sugerindo também uma modulação lateralizada dos efeitos dos hormônios gonadais sobre os genes testados.

A PRL no MePD direito está envolvida com a modulação do comportamento sexual de lordose lombar de ratas em proestro, cuja magnitude fica reduzida com a microinjeção de antagonista dos PRLR localmente. Esse dado inédito evidencia a importância da PRL no MePD direito na receptividade das ratas em proestro aos machos, porém ainda precisa ser esclarecido se essa função da PRL é bilateral ou se ocorre somente no hemisfério direito.

Os achados aqui descritos podem guiar novas pesquisas que possam esclarecer ainda mais a influência de hormônios sexuais, seus receptores e seus mecanismos de sinalização celular na fisiologia do comportamento sexual de roedores.

6 PERPECTIVAS

Além das linhas de pesquisa que podem ser desenvolvidas e que foram contextualizadas neste trabalho, ainda é plausível estudar a expressão proteica de mecanismos intracelulares das ações do estradiol, o que eles fazem efetivamente, buscar etapas organizacionais da sinalização intracelular, assim permitindo compreender o que pode estar ocorrendo nesses neurônios correlacionando com a sua eletrofisiologia.

E estudar a ação que a prolactina circulante apresenta no MePD esquerdo e em ambos os hemisférios em relação com o comportamento sexual feminino. Estudar qual a ação da prolactina no MePD de ambos os hemisférios cerebrais na modulação do comportamento maternal em fêmeas.

7 REFERÊNCIAS

ADEKUNBI, D A *et al.* Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. e12572, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29356147>.

ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE. **Allen mouse brain atlas**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=72340223>. Acesso em: 29 set. 2022.

ANDERSON, Greg M *et al.* Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. **Endocrinology**, [s. l.], v. 149, n. 4, p. 1562–70, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162529>.

BAKOWSKA, Joanna C.; MORRELL, Joan I. The distribution of mRNA for the short form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. **Molecular Brain Research**, [s. l.], v. 116, n. 1–2, p. 50–58, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169328X03002134>.

BELTRAMINO, C.; TALEISNIK, S. Facilitatory and inhibitory effects of electrochemical stimulation of the amygdala on the release of luteinizing hormone. **Brain Research**, [s. l.], v. 144, n. 1, p. 95–107, 1978. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899378904377>.

BEN-JONATHAN, NIRA *et al.* Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects*. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 639–669, 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-17-6-639>.

BERNICHTTEIN, Sophie *et al.* Development of pure prolactin receptor antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 38, p. 35988–99, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824168>.

BESSA, Agustina *et al.* GPER: A new tool to protect dopaminergic neurons?. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1852, n. 10, p. 2035–2041, 2015.

BLACK, I B; ADLER, J E; LAGAMMA, E F. Impulse activity differentially regulates co-localized transmitters by altering messenger RNA levels. **Progress in Brain Research**, [s. l.], v. 68, p. 121–7, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2882548>.

BLUME, Annegret *et al.* Prolactin induces Egr-1 gene expression in cultured hypothalamic cells and in the rat hypothalamus. **Brain Research**, [s. l.], v. 1302, p. 34–41, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19769948>.

BOLE-FEYSOT, Christine *et al.* Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 225–268, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article/19/3/225/2530791>.

BRIDGES, R S *et al.* Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.],

v. 87, n. 20, p. 8003–8007, 1990. Disponível em:
<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.87.20.8003>.

BROWN, Rosemary S.E. *et al.* Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 518, n. 1, p. 92–102, 2010.

BROWN, Rosemary S. E. *et al.* Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 40, p. 10779–10784, 2017. Disponível em:
<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1708025114>.

BROWN, R. S.E.; HERBISON, A. E.; GRATTAN, D. R. Differential changes in responses of hypothalamic and brainstem neuronal populations to prolactin during lactation in the mouse. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 826–836, 2011.

BRUSCO, Janaina *et al.* Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 522, n. 9, p. 2075–88, 2014. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24318545>.

CABRERA-REYES, Erika Alejandra *et al.* Prolactin function and putative expression in the brain. **Endocrine**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 199–213, 2017. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28634745>.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 360, n. 2, p. 213–245, 1995. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.903600203>.

CAO, Jinyan; PATISAUL, Heather B. Sex-specific expression of estrogen receptors α and β and Kiss1 in the postnatal rat amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 521, n. 2, p. 465–78, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791648>.

CAO, Jinyan; PATISAUL, Heather B. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 519, n. 15, p. 2954–2977, 2011. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.22648>.

CHAMPAGNE, Frances A *et al.* Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring. **Endocrinology**, [s. l.], v. 147, n. 6, p. 2909–15, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513834>.

CHILTON, Beverly S; HEWETSON, Aveline. Prolactin and growth hormone signaling. **Current Topics in Developmental Biology**, [s. l.], v. 68, p. 1–23, 2005. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16124994>.

CLEVENGER, C V; KLINE, J B. Prolactin receptor signal transduction. **Lupus**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 706–718, 2001. Disponível em:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/096120301717164949>.

COOKE, Bradley M; STOKAS, Michael R; WOOLLEY, Catherine S. Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. **The Journal of Comparative**

Neurology, [s. l.], v. 501, n. 6, p. 904–15, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311322>.

COOKE, Bradley M.; WOOLLEY, Catherine S. Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. **Developmental Neurobiology**, [s. l.], v. 69, n. 2–3, p. 141–152, 2009.

COOLEN, Lique M. *et al.* Demonstration of Ejaculation-Induced Neural Activity in the Male Rat Brain Using 5-HT_{1A} Agonist 8-OH-DPAT. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 881–891, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938497002588>.

COOLEN, L.M; WOOD, R.I. Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 143–153, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432898000631>.

COOPER, Stephen; SHEDDEN, Kerby. Microarrays and the relationship of mRNA variation to protein variation during the cell cycle. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 249, n. 3, p. 574–81, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17915257>.

COPELAND, N G *et al.* Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. **Genomics**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 225–8, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530075>.

CSABAFI, Krisztina *et al.* Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 241, n. 1, p. 56–61, 2013.

DALL’OGLIO, Aline *et al.* Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the “ventral” medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 439, n. 3, p. 287–292, 2008a. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394008006484>.

DALL’OGLIO, Aline *et al.* Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: Further data based on the Golgi method. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 430, n. 2, p. 151–156, 2008b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394007011500>.

DALPIAN, Francine; RASIA-FILHO, Alberto A.; CALCAGNOTTO, Maria Elisa. Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine intrinsic and synaptic properties of medial amygdala neurons. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 132, n. 9, 2019. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.227793/265879/Sexual-dimorphism-estrous-cycle-and-laterality>.

DE CASTILHOS, Juliana *et al.* Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: A Golgi study. **Brain Research**, [s. l.], v. 1240, p. 73–81, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899308021975>.

DE CASTILHOS, Juliana *et al.* Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 131–139, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923005004879>.

DE OLMOS, Jose S.; BELTRAMINO, Carlos A.; ALHEID, George. Amygdala and Extended Amygdala of the Rat: A Cytoarchitectonical, Fibroarchitectonical, and Chemoarchitectonical Survey. *In: THE RAT NERVOUS SYSTEM*. [S. l.]: Elsevier, 2004. p. 509–603. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125476386500201>.

DE ROUX, Nicolas *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1834399100>.

DE VRIES, Geert J.; SIMERLY, Richard B. Anatomy, Development, and Function of Sexually Dimorphic Neural Circuits in the Mammalian Brain. *In: HORMONES, BRAIN AND BEHAVIOR*. [S. l.]: Elsevier, 2002. v. 4, p. 137–XXIX. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125321044500664>.

DEVITO, W J *et al.* Estradiol increases prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid in selected brain regions in the hypophysectomized female rat. **Endocrinology**, [s. l.], v. 131, n. 5, p. 2154–2160, 1992. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.131.5.1425416>.

DEVITO, W J; STONE, S. Ethanol inhibits prolactin-induced activation of the JAK/STAT pathway in cultured astrocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 278–91, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404396>.

DHILLO, Waljit S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 90, n. 12, p. 6609–6615, 2005.

DI GIORGIO, Noelia P. *et al.* Impaired GABAB receptor signaling dramatically up-regulates Kiss1 expression selectively in nonhypothalamic brain regions of adult but not prepubertal mice. **Endocrinology**, [s. l.], v. 155, n. 3, p. 1033–1044, 2014.

DIELENBERG, R A; HUNT, G E; MCGREGOR, I S. “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 1085–97, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457592>.

DOMINGUEZ, Juan M; HULL, Elaine M. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. **Brain Research**, [s. l.], v. 917, n. 2, p. 225–229, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899301030311>.

DONCARLOS, L. L. *et al.* Novel cellular phenotypes and subcellular sites for androgen action in the forebrain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 138, n. 3, p. 801–807, 2006.

DUCLLOT, Florian; KABBAJ, Mohamed. The estrous cycle surpasses sex differences in regulating the transcriptome in the rat medial prefrontal cortex and reveals an underlying role of early growth response 1. **Genome Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 256, 2015. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-015-0815-x>.

DUCLLOT, Florian; KABBAJ, Mohamed. The role of early growth response 1 (EGR1) in brain plasticity and neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2017.00035/full>.

DUDLEY, CAROL A.; JAMISON, T. SCOTT; MOSS, ROBERT L. Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. **Endocrinology**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 677–679, 1982. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-110-2-677>.

EMANUELE, N V *et al.* The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 35–42, 1992. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.6.1.1738369>.

ERVIN, Kelsy S.J. *et al.* Estrogen involvement in social behavior in rodents: Rapid and long-term actions. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 74, p. 53–76, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X15001191>.

FAULDS, Malin Hedengran *et al.* Cross-talk between ERs and signal transducer and activator of transcription 5 is E2 dependent and involves two functionally separate mechanisms. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1929–1940, 2001. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.15.11.0726>.

FRANCESCHINI, I. *et al.* Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 401, n. 3, p. 225–230, 2006.

FREEMAN, Marc E. *et al.* Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 1523–1631, 2000. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>.

FURIGO, Isadora C. *et al.* Brain STAT5 signaling modulates learning and memory formation. **Brain Structure and Function**, [s. l.], v. 223, n. 5, p. 2229–2241, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-018-1627-z>.

FURIGO, Isadora C. *et al.* Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. **Brain Research**, [s. l.], v. 1566, p. 47–59, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899314005162>.

GAJEWSKA, Alina *et al.* In vivo oestrogenic modulation of Egr1 and Pitx1 gene expression in female rat pituitary gland. **Journal of Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 355–366, 2014. Disponível em: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/53/3/355.xml>.

GISABELLA, B. *et al.* Growth hormone biases amygdala network activation after fear learning. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 6, n. 11, 2016.

GOTTSCH, M. L. *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. **Endocrinology**, [s. l.], v. 145, n. 9, p. 4073–4077, 2004.

GRATTAN, D R *et al.* Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. **Endocrinology**, [s. l.], v. 142, n. 9, p. 3935–40, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517172>.

GRÉCO, B *et al.* Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 18–28, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9485165>.

GRÉCO, B *et al.* Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. **Endocrinology**, [s. l.], v. 142, n. 12, p. 5172–81, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713212>.

GRÉCO, Béatrice; LUBBERS, Laura S; BLAUSTEIN, Jeffrey D. Estrogen receptor beta messenger ribonucleic acid expression in the forebrain of proestrous, pregnant, and lactating female rats. **Endocrinology**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 1869–75, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697694>.

GRIMLEY, P. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 131–157, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610199000118>.

GUERRA-ARAIZA, Christian; COYOY-SALGADO, Angélica; CAMACHO-ARROYO, Ignacio. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 105–109, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923002008456>.

GUILLAMÓN, Antonio; SEGOVIA, Santiago. Sex differences in the vomeronasal system. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 377–382, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923097002177>.

HADJIMARKOU, Maria M.; VASUDEVAN, Nandini. GPER1/GPR30 in the brain: crosstalk with classical estrogen receptors and implications for behavior. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 176, p. 57–64, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076017301115>.

HANSBERG-PASTOR, Valeria *et al.* Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins Involved in Brain Plasticity. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 6, n. 165, p. 1–12, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpsy.2015.00165/abstract>.

HARADA, Takeshi *et al.* ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 453–459, 2001. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ncb0501_453.

HARLAN, Richard E. *et al.* Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 7–22, 1989. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/125085>.

HARLAN, Richard E.; SHIVERS, Brenda D.; PFAFF, Donald W. Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen-dependent behavior, lordosis. **Science**, [s. l.], v. 219, n. 4591, p. 1451–1453, 1983. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.6828874>.

HENNIGHAUSEN, Lothar; ROBINSON, Gertraud W. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. **Genes & Development**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 711–721, 2008. Disponível em: <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.1643908>.

HERMEL, Erica E.S. *et al.* Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 405, n. 1–2, p. 153–158, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394006006434>.

HERNANDEZ, Abbi R. *et al.* Age and Ketogenic Diet Have Dissociable Effects on Synapse-Related Gene Expression Between Hippocampal Subregions. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2019.00239/full>.

HOMMA, Tamami *et al.* Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 1216–1225, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.109.078311>.

JAMES, Allan B.; CONWAY, Ann Marie; MORRIS, Brian J. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1). **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1624–1634, 2006.

JOHNSON, Ryan T.; BREEDLOVE, S. Marc; JORDAN, Cynthia L. Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 511, n. 5, p. 599–609, 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.21859>.

KAUFFMAN, Alexander S. *et al.* Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. **Endocrinology**, [s. l.], v. 148, n. 4, p. 1774–1783, 2007a. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/148/4/1774/2501927>.

KAUFFMAN, Alexander S. *et al.* The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 33, p. 8826–8835, 2007b.

KIRKEN, Robert A. *et al.* Prolactin Stimulates Serine/Tyrosine Phosphorylation and Formation of Heterocomplexes of Multiple Stat5 Isoforms in Nb2 Lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. 22, p. 14098–14103, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819625196>.

KNAPSKA, Ewelina; KACZMAREK, Leszek. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 183–211, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008204001625>.

KRENTZEL, Amanda A.; REMAGE-HEALEY, Luke. Sex differences and rapid estrogen signaling: A look at songbird audition. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 38, p. 37–49, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302215000023>.

KUDWA, A.E. *et al.* Regulation of progestin receptors in medial amygdala: Estradiol, phytoestrogens and sex. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 146–150, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938409000857>.

LAKE, David; CORRÊA, Sonia A.L.; MÜLLER, Jürgen. NMDA receptor-dependent signalling pathways regulate arginine vasopressin expression in the paraventricular nucleus of the rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 1722, p. 146357, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899319304111>.

LARSEN, C.M.; GRATTAN, D.R. Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 201–209, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159111004727>.

LARSEN, Caroline M.; GRATAN, David R. Prolactin-Induced Mitogenesis in the Subventricular Zone of the Maternal Brain during Early Pregnancy Is Essential for Normal Postpartum Behavioral Responses in the Mother. **Endocrinology**, [s. l.], v. 151, n. 8, p. 3805–3814, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/151/8/3805/2456915>.

LE MOËNE, Olivia *et al.* Estrogen receptors α and β in the central amygdala and the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Sociosexual behaviors, fear and arousal in female rats during emotionally challenging events. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 367, p. 128–142, 2019.

LE MOËNE, Olivia; ÅGMO, Anders. Behavioral responses to emotional challenges in female rats living in a seminatural environment: The role of estrogen receptors. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 106, p. 162–177, 2018.

LEE, Dennis K *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 446, n. 1, p. 103–107, 1999. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793%2899%2900009-5>.

LEE, Ji Yeon *et al.* Loss of Cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 2, 2008.

LEE, S L *et al.* Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 273, n. 5279, p. 1219–21, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703054>.

LEVIN, Ellis R. G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator?. **Endocrinology**, [s. l.], v. 150, n. 4, p. 1563–1565, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/150/4/1563/2455619>.

LI, X.-L *et al.* Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. **Neuroscience**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 607–615, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452202001628>.

LIU, X *et al.* Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 92, n. 19, p. 8831–8835, 1995. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.92.19.8831>.

LIU, Xiuwen *et al.* Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. **Genes and Development**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 179–186, 1997.

LU, C.-L.; HERNDON, C. New roles for neuronal estrogen receptors. **Neurogastroenterology & Motility**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. e13121, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nmo.13121>.

MACLUSKY, NEIL J.; MCEWEN, BRUCE S. Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. **Nature**, [s. l.], v. 274, n. 5668, p. 276–278, 1978. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/274276a0>.

MAGGIOLINI, Marcello *et al.* The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17 β -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 26, p. 27008–27016, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820853575>.

MAK, Gloria K *et al.* Male pheromone–stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1003–1011, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn1928>.

MARANO, Robert J.; BEN-JONATHAN, Nira. Minireview: extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 622–633, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article/28/5/622/2623201>.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842002000400008&lng=en&tlng=en.

MARROCCO, Jordan; MCEWEN, Bruce S. Sex in the brain: Hormones and sex differences. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 373–383, 2016.

MAYR, Stefan *et al.* Selective coupling of STAT factors to the mouse prolactin receptor. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 258, n. 2, p. 784–793, 1998. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.1998.2580784.x>.

MAZZUCCO, Christine A. *et al.* ER α , but not ER β , mediates the expression of sexual behavior in the female rat. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 191, n. 1, p. 111–117, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808001496>.

MCDONALD, Alexander J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 257–332, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008298000033>.

MUI, A.L. *et al.* Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1166–1175, 1995. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07100.x>.

NAVARRO, V M *et al.* Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 1, p. 156–63, 2005a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375028>.

NAVARRO, V M *et al.* Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 4, p. 1689–97, 2005b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637288>.

NELSON, R.J. **An Introduction to Behavioral Endocrinology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1995. v. 4

NEWMAN, S W. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 877, p. 242–57, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415653>.

NUTSCH, Victoria L. *et al.* Aging and estradiol effects on gene expression in the medial preoptic area, bed nucleus of the stria terminalis, and posterodorsal medial amygdala of male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 442, p. 153–164, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720716305469>.

NYANTE, S. J. *et al.* Trends in sex hormone concentrations in US males: 1988–1991 to 1999–2004. **International Journal of Andrology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 456–466, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.2011.01230.x>.

NYBERG, Fred; HALLBERG, Mathias. Growth hormone and cognitive function. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 357–365, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2013.78>.

O'DONOVAN, Kevin J. *et al.* The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 167–173, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223698013435>.

OGAWA, S *et al.* Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. **Endocrinology**, [s. l.], v. 139, n. 12, p. 5070–81, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832446>.

OGAWA, S *et al.* Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 22, p. 12887–92, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536018>.

O'NEAL, K D; YU-LEE, L Y. Differential signal transduction of the short, Nb2, and long prolactin receptors. Activation of interferon regulatory factor-1 and cell proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 269, n. 42, p. 26076–82, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929319>.

OOMURA, Y *et al.* Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. **Peptides**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 2738–49, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914228>.

PATTERSON, Christa M. *et al.* Leptin action via LepR-b Tyr1077 contributes to the control of energy balance and female reproduction. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 1, n. 1–2, p. 61–69, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877812000026>.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006. v. 6

PAZ-FILHO, Gilberto J *et al.* Leptin replacement improves cognitive development. **PloS one**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. e3098, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769731>.

PETROVICH, Gorica D. Forebrain networks and the control of feeding by environmental learned cues. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 121, p. 10–8, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562305>.

PETRULIS, Aras. Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 723–741, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X13000731>.

PFAFF, D *et al.* Hormonal, Neural, and Genomic Mechanisms for Female Reproductive Behaviors, Motivation, and Arousal. *In*: KNOBIL AND NEILL'S PHYSIOLOGY OF

REPRODUCTION. [S. l.]: Elsevier, 2006. p. 1825–1920. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125154000500397>.

PHELPS, Steven M. *et al.* Regulation of Male Sexual Behavior by Progesterone Receptor, Sexual Experience, and Androgen. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 294–302, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X98914854>.

PLANT, Tony M.; ZELEZNIK, Anthony J. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Fourthed. [S. l.]: Elsevier, 2015. v. 1 Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20111072880>.

PROSSNITZ, Eric R.; BARTON, Matthias. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 715–726, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2011.122>.

QUADROS, Princy S *et al.* Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. **Endocrinology**, [s. l.], v. 143, n. 10, p. 3727–39, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239082>.

RASIA-FILHO, A A *et al.* Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. **Neuroscience**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 839–47, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207319>.

RASIA-FILHO, A.A. *et al.* Morphological and Functional Features of the Sex Steroid-Responsive Posterodorsal Medial Amygdala of Adult Rats. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1090–1106, 2012. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=12&issue=11&spage=1090>.

RASIA-FILHO, A A; LONDERO, R G; ACHAVAL, M. Functional activities of the amygdala: an overview. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 14–23, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721680>.

REVANKAR, Chetana M. *et al.* A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. **Science**, [s. l.], v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 2005. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1106943>.

ROMANO, Gary J.; KRUST, Andree; PFAFF, Donald W. Expression and Estrogen Regulation of Progesterone Receptor mRNA in Neurons of the Mediobasal Hypothalamus: An *in Situ* Hybridization Study. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 1295–1300, 1989. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend-3-8-1295>.

ROSELLI, Charles E. *et al.* Prolactin expression in the sheep brain. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 206–215, 2008.

SAITO, Kenji; CUI, Huxing. Estrogen Receptor Alpha Splice Variants, Post-Translational Modifications, and Their Physiological Functions. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 895, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/6/895>.

SATO, Junko; NASU, Masahiro; TSUCHITANI, Minoru. Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 155–162, 2016. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/29/3/29_2016-0021/_article.

SCHNEIDER, Johanna S *et al.* Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 5, p. 2951–6, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601162>.

SCHULZ, Kalynn M.; SISK, Cheryl L. The organizing actions of adolescent gonadal steroid hormones on brain and behavioral development. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 70, p. 148–158, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763416301610>.

SELLERS, Katherine; RAVAL, Pooja; SRIVASTAVA, Deepak P. Molecular signature of rapid estrogen regulation of synaptic connectivity and cognition. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 36, p. 72–89, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302214000739>.

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

SHIROTA, Mariko *et al.* Expression of Two Forms of Prolactin Receptor in Rat Ovary and Liver. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1136–1143, 1990. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend-4-8-1136>.

SHUGHRUE, Paul J.; LANE, Malcolm V.; MERCHENTHALER, Istvan. Comparative distribution of estrogen receptor alpha and beta mRNA in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 388, n. 4, p. 507–525, 1997. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971201\)388:4<507::AID-CNE1>3.0.CO;2-6](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9861(19971201)388:4<507::AID-CNE1>3.0.CO;2-6).

SHUGHRUE, P J; MERCHENTHALER, I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 436, n. 1, p. 64–81, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413547>.

SILVEIRA, Marina Augusto *et al.* STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 448, p. 55–65, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720717301958>.

SIMERLY, R. B. *et al.* Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 294, n. 1, p. 76–95, 1990. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902940107>.

SMITH, Jeremy T. *et al.* Differential regulation of Kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 7, p. 2976–2984, 2005a. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2005-0323>.

SMITH, Jeremy T. *et al.* Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 9, p. 3686–3692, 2005b. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/146/9/3686/2499879>.

SMITH, M S; FREEMAN, M E; NEILL, J D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 1–10, 1990.

.I.], v. 96, n. 1, p. 219–26, 1975. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1167352>.

SNOWDON, Charles T; ZIEGLER, Toni E. Variation in Prolactin Is Related to Variation in Sexual Behavior and Contact Affiliation. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0120650, 2015. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0120650>.

SOLDAINI, Elisabetta *et al.* DNA Binding Site Selection of Dimeric and Tetrameric Stat5 Proteins Reveals a Large Repertoire of Divergent Tetrameric Stat5a Binding Sites. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 389–401, 2000. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1128/MCB.20.1.389-401.2000>.

SPITERI, Thierry *et al.* Estrogen-induced sexual Incentive motivation, proceptivity and receptivity depend on a functional estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of the hypothalamus but not in the amygdala. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 142–154, 2010a. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/255766>.

SPITERI, Thierry *et al.* The role of the estrogen receptor α in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 210, n. 2, p. 211–220, 2010b.

ŠPONER, Jiří *et al.* RNA Structural Dynamics As Captured by Molecular Simulations: A Comprehensive Overview. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 118, n. 8, p. 4177–4338, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.7b00427>.

STACK, Ashley *et al.* Sex differences in social interaction in rats: Role of the immediate-early gene zif268. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 570–580, 2010.

STANIĆ, Davor *et al.* Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. coexistence with oestrogen receptors α and β , and androgen receptors. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. e90451, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090451>.

STEPHENS, Shannon B. Z. *et al.* Estrogen stimulation of Kiss1 expression in the medial amygdala involves estrogen receptor- α but not estrogen receptor- β . **Endocrinology**, [s. l.], v. 157, n. 10, p. 4021–4031, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/157/10/4021/2758393>.

STEPHENS, Shannon B. Z.; KAUFFMAN, Alexander S. Regulation and possible functions of kisspeptin in the medial amygdala. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 8, n. AUG, 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00191/full>.

SUZUKI, Shotaro; HANDA, Robert J. Estrogen receptor- β , but not estrogen receptor- α , is expressed in prolactin neurons of the female rat paraventricular and supraoptic nuclei: Comparison with other neuropeptides. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 484, n. 1, p. 28–42, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.20457>.

SWANN, Jennifer M.; NEWMAN, Sarah W. Testosterone regulates substance P within neurons of the medial nucleus of the amygdala, the bed nucleus of the stria terminalis and the medial preoptic area of the male golden hamster. **Brain Research**, [s. l.], v. 590, n. 1–2, p. 18–28, 1992. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689939291077R>.

SWANSON, L W; PETROVICH, G D. What is the amygdala?. **Trends in neurosciences**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 323–31, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9720596>.

TER HORST, Gert J. Estrogen in the Limbic System. *In*: VITAMINS AND HORMONES. [S. l.]: Academic Press Inc., 2010. v. 82, p. 319–338. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672910820175>.

THOMAS, Peter *et al.* Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 2, p. 624–632, 2005.

TYLER, Julia L.; GORSKI, Roger A. Effects of Corticomedial Amygdala Lesions or Olfactory Bulbectomy on LH Responses to Ovarian Steroids in the Female Rat1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 927–934, 1980. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod22.4.927>.

UDY, G B *et al.* Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 94, n. 14, p. 7239–44, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207075>.

UNGER, Elizabeth K. *et al.* Medial amygdalar aromatase neurons regulate aggression in both sexes. **Cell Reports**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 453–462, 2015.

VAJARIA, Ruby; VASUDEVAN, Nandini. Is the membrane estrogen receptor, GPER1, a promiscuous receptor that modulates nuclear estrogen receptor-mediated functions in the brain?. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 104, p. 165–172, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X18300928>.

VELASCO, M. E.; TALEISNIK, S. EFFECTS OF THE INTERRUPTION OF AMYGDALOID AND HIPPOCAMPAL AFFERENTS TO THE MEDIAL HYPOTHALAMUS ON GONADOTROPHIN RELEASE. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 41–55, 1971. Disponível em: https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/51/1/joe_51_1_005.xml.

VOGEL, Christine; MARCOTTE, Edward M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg3185>.

VOIGT, Cornelia *et al.* Breeding status and social environment differentially affect the expression of sex steroid receptor and aromatase mRNA in the brain of female Damaraland mole-rats. **Frontiers in Zoology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 38, 2014. Disponível em: <http://frontiersinzoology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-9994-11-38>.

WAGNER, Christine K. The many faces of progesterone: A role in adult and developing male brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 340–359, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302206003736>.

WAKAO, Hiroshi; GOUILLEUX, Fabrice; GRONER, Bernd. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2182–2191, 1994.

WANG, Wenbin *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) mediates prolactin-stimulated adult neurogenesis in the subventricular zone and olfactory bulb. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 4, p. 2623–2631, 2013.

WATERS, Elizabeth M. *et al.* G-protein-coupled estrogen receptor 1 is anatomically positioned to modulate synaptic plasticity in the mouse hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 2384–2397, 2015.

WILSON, Melinda E.; WESTBERRY, Jenne M.; PREWITT, Amanda K. Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: A role for promoter methylation?. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 375–385, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302208000083>.

WITCHER, J A; FREEMAN, M E. The proestrous surge of prolactin enhances sexual receptivity in the rat. **Biology of reproduction**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 834–9, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4039953>.

WONG, Dona L. *et al.* Genetic mechanisms for adrenergic control during stress. *In:* , 2004. **Annals of the New York Academy of Sciences**. [S. l.]: New York Academy of Sciences, 2004. p. 387–397.

XU, Zhifang *et al.* Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. **Endocrine Journal**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 161–171, 2012.

YIP, S. H. *et al.* Prolactin Signalling in the Mouse Hypothalamus is Primarily Mediated by Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 5b but not 5a. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 1484–1491, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2826.2012.02357.x>.

ZANCAN, Mariana *et al.* Glial and axonal perikaryal coverage and somatic spines in the posterodorsal medial amygdala of male and cycling female rats. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 523, n. 14, p. 2127–2137, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.23782>.

ZANCAN, Mariana *et al.* Remodeling of the number and structure of dendritic spines in the medial amygdala: From prepubertal sexual dimorphism to puberty and effect of sexual experience in male rats. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 1851–1865, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.14052>.

ZOUBKOVÁ, Hana *et al.* Prenatal Exposure to Methamphetamine: Up-Regulation of Brain Receptor Genes. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. JUL, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00771/full>.

8 ANEXO I**CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO****1) PROTOCOLO Nº: 248/18****2) DATA DO PARECER: 13/03/2019****Parecer 616/19****3) TÍTULO DO PROJETO:**

Estudo sobre a amígdala medial pósterio-dorsal: variação na expressão gênica de receptores α e β para estradiol, progesterona, prolactina e gene de resposta ao crescimento inicial-1 na de ratos e ratas ao longo do ciclo estral e a influência da prolactina no comportamento de lordose nas ratas em proestro

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alberto A. Rasia F^o

5) RESUMO DO PROJETO:**6) OBJETIVOS DO PROJETO:**

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:**Título**

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos

Adequados

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

Adequado

Comentários

Orçamento e fonte financiadora

Adequados

Comentários

Referências Bibliográficas

Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Animais serão submetidos a estereotaxia (analgesia e anestesia descritas no projeto).

Espécie: Ratus norvegicus (linhagem Wistar)

Número Amostral: 196

Redução Amostral:

Sim Não

Justifique:

Falta determinação dos grupos amostrais no projeto.

Substituição de Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual? Laboratório de Fisiologia

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

| Data | Espécie | Sexo | Quantidade |
|-----------------|------------------|-------|------------|
| Exp 1 – 03/2019 | Ratus norvegicus | M e F | 27 e 79 |
| Exp 2 – 05/2019 | Ratus norvegicus | M e F | 10 e 80 |

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início ____/____/____ Data de Término ____/____/____

Comentários gerais sobre o projeto:

Parecer final em 13 de março de 2019: todas as solicitações foram atendidas, de forma que o projeto está APROVADO.

9 ANEXO II**CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO****1) PROTOCOLO Nº: 248/18****2) DATA DO PARECER: 10/07/2019
641/19****Parecer****3) TÍTULO DO PROJETO:**

Estudo sobre a amígdala medial pósterio-dorsal: variação na expressão gênica de receptores α e β para estradiol, progesterona, prolactina e gene de resposta ao crescimento inicial-1 na de ratos e ratas ao longo do ciclo estral e a influência da prolactina no comportamento de lordose nas ratas em proestro

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alberto A. Rasia F^o

5) RESUMO DO PROJETO:**6) OBJETIVOS DO PROJETO:**

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:**Título**

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos

Adequados

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

Adequado

Comentários

Orçamento e fonte financiadora

Adequados

Comentários

Referências Bibliográficas

Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: | **B** **C** **D** **E**

Justifique:

Animais serão submetidos a estereotaxia (analgesia e anestesia descritas no projeto).

Espécie: Ratus norvegicus (linhagem Wistar)

Número Amostral: 196

Redução Amostral:

Sim Não

Justifique:

Falta determinação dos grupos amostrais no projeto.

Substituição de Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

Adequada

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual? Laboratório de Fisiologia

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

| Data | Espécie | Sexo | Quantidade |
|-----------------|------------------|-------|---------------------------------------|
| Exp 1 – 03/2019 | Ratus norvegicus | M e F | 27 e 79 |
| Exp 2 – 05/2019 | Ratus norvegicus | M e F | 10 e 80 – 30 e 120 (em 10/07/2019) |

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início ____/____/____ Data de Término ____/____/____

Comentários gerais sobre o projeto:

Prezados autores, favor responder aos seguintes questionamentos/observações levantadas pelo colegiado do CEUA:

1. Sugere-se objetivar e reduzir o título (que apresenta erros de sintaxe).
2. Definir e apresentar no formulário e no projeto quais serão os grupos amostrais; com base nisto, revisar o tamanho amostral para cada grupo e experimento, pois o tamanho amostral final de ambos os experimentos não fecha com os critérios definidos de cálculo de tamanho amostral pelos autores.
3. Revisar lista de referências; as referências relativas ao cálculo de tamanho amostral não estão na listagem, o que dificulta a análise se esta é pertinente ao cálculo do experimento em si, pois a descrição no projeto em relação ao objeto de cálculo (“expressão gênica”) é vaga.
4. Solicita-se a inclusão no projeto dos oligonucleotídeos que serão utilizados no estudo.
5. Sobre descartes de carcaças, a RDC 306 foi revogada e substituída pela RDC 222. Favor corrigir projeto e formulário.

Parecer final em 15 de março de 2019: todas as solicitações foram atendidas, de forma que o projeto está APROVADO.

Parecer após envio de emenda com solicitação de inclusão de novos grupos amostrais (para curva dose-resposta), resultando na solicitação de mais 40 fêmeas e 20 machos, em 10 de julho de 2019: as considerações foram analisadas e a solicitação foi atendida, de maneira que a emenda foi APROVADA em reunião da CEUA.