

بیان پتید وابسته به آرژنین - فنیل آلانین - آمید در هسته پستی - داخلی هیپوتالاموس در چرخه فعلی موش صحرائی

محمد رضا جعفرزاده شیرازی^۱، فرید پژوهی^۱، محمد جواد ضمیری^۱، محمد سعید صالحی^۱، محمد رضا نام‌آور^۲، امین تمدن^{۳*}، نادر تنیده^۴، افسون زارعی^۵، کازویوشی سوتسویی^۶

۱. بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲. مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۴. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس ژنیک و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۵. مرکز تحقیقات ناباروری و مرکز IVF، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۶. بخش زیست‌شناسی، دانشگاه واسدا، توکیو، ژاپن

پذیرش: ۲۸ دی ۹۱

دریافت: ۲۶ شهریور ۹۱

چکیده

مقدمه: پتید وابسته به آرژنین - فنیل آلانین - آمید^۱ (RFRP) به عنوان فاکتور مهارکننده تراوش هورمون آزادکننده گونادوتروپین^۲ (GnRH) شناخته شده است. هدف پژوهش کنونی بررسی الگوی بیان RFRP در نورون‌های هسته پستی - داخلی^۳ (DMH) هیپوتالاموس موش‌های صحرائی در گام‌های مختلف چرخه فعلی بود. **روش‌ها:** در این پژوهش گام‌های مختلف چرخه فعلی در ۱۶ موش صحرائی ماده بزرگسال اسپراک داوولی با روش گسترش مهبلی تعیین شد. موش‌های صحرائی بر این اساس به ۵ گروه تقسیم شدند: گامه پرواستروس (n=۴)، اوایل گامه استروس (n=۳)، گامه استروس (n=۳)، گامه مت‌استروس (n=۳) و گامه دای‌استروس (n=۳). پس از فیکس کردن مغز و تهیه برش از بافت داین‌سفالون، برش‌های دارای هسته DMH با روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. در بررسی میکروسکوپی برش‌ها، نورون‌های بیان‌کننده پتید RFRP در هسته DMH شمارش شدند.

یافته‌ها: تقریباً همه نورون‌های بیان‌کننده پتید RFRP در DMH دو قطبی بودند. میانگین و خطای استاندارد شمار نورون‌های بیان‌کننده RFRP در گام‌های دای‌استروس (۴۵/۸±۱۲/۶) و استروس (۴۴/۷±۳/۶) بیشتر از اوایل گامه استروس (۱۸/۸±۰/۸) و گامه پرواستروس (۱۶/۲±۲/۰) بود (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری:** یافته‌های پژوهش کنونی، نقش تنظیمی نورون‌های RFRP هسته DMH در کنترل چرخه فعلی موش صحرائی بود. **واژه‌های کلیدی:** هورمون مهارکننده گونادوتروپین، چرخه فعلی، هسته پستی - داخلی، موش صحرائی

مقدمه

آدنوهیپوفیز را تنظیم کنند، نخستین بار در سال ۱۹۴۷ مطرح شد [۹] و هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) نخستین بار در سال ۱۹۷۱ از هیپوتالاموس مغز خوک [۲۲] و گوسفند

احتمال وجود فاکتورهای هیپوتالاموسی که بتوانند فعالیت

1. RFamide-related peptide

2. Gonadotropin releasing hormone

3. Dorsomedial nucleus

tamadon@shirazu.ac.ir

nadertanideh@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسندگان مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

GnRH در ناحیه POA ارتباط تنگاتنگی با تارهای نورون-های RFRP داشتند [۱۵]. بنابراین، پیشنهاد شد که RFRP اثر مهاری مستقیمی بر نورون‌های GnRH می‌گذارد. در موش صحرایی، غلظت GnRH در گامه‌های استروس، مت-استروس و دای‌استروس و اوایل پرواستروس به سبب فعالیت مرکز تونیک GnRH در حالت پایه قرار دارد. در میانه پرواستروس، مرکز سرژ GnRH فعال شده و موجب افزایش غلظت GnRH و رسیدن به پیک می‌شود [۱۴] که سرژ LH و تخم‌ریزی را در پی دارد. از این رو با توجه به اثر مهاری پپتیدهای RFRP بر نورون‌های GnRH و افزایش ناگهانی تراوش GnRH در دوره پیش از تخم‌ریزی، این فرضیه که بیان RFRP ممکن است در این دوره از چرخه فحلی کاهش یابد آزموده شد؛ بنابراین هدف این پژوهش بررسی شمار نورون‌های بیان‌کننده پپتید RFRP در هسته پستی-داخلی هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۱۶ موش صحرایی ماده بزرگسال اسپراگ داوولی (*Rattus norvegicus*) با دامنه وزنی ۱۷۰ تا ۲۲۰ گرم (۳ تا ۴ ماهه) استفاده شد. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی از مرکز پرورش جانوران آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز برگزیده شدند که در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (آغاز روشنایی از ساعت ۷:۳۰ صبح) نگهداری شده بودند. همه مراحل آماده‌سازی بافت مغز بین ساعت ۱۵ تا ۱۸ بعد از ظهر انجام گرفت. گامه‌های چرخه فحلی با بررسی تغییرات سلول‌های مهبل با روش ارزیابی گسترش مهبل^۶ تعیین شدند [۱۶]. سلول‌های پوششی، گرد و هسته‌دار؛ سلول‌های شاخی، نامنظم و بدون هسته و گلبول‌های سفید، کروی و کوچک بودند. در گامه پرواستروس، بیشتر سلول‌ها از نوع سلول‌های پوششی هسته‌دار ($n=4$)، در گامه استروس بیشتر سلول‌ها از نوع سلول‌های شاخی بدون هسته ($n=3$) و در گامه دای‌استروس بیشتر سلول‌ها از نوع گلبول‌های سفید بودند

[۳] جداسازی شد؛ با این وجود، شواهدی قانع‌کننده مبنی بر وجود فاکتورهای مهار کننده گونادوتروپین در پستانداران تا چند سال گذشته در دسترس نبود. در سال ۲۰۰۰، پیتیدی با ۱۲ آمینواسید در مغز بلدرچین شناسایی شد که به علت توانایی آن در مهار تراوش گونادوتروپین، هورمون مهارکننده گونادوتروپین^۱ (GnIH) نام گرفت [۲۳]. اثر مهاری GnIH بر آزادسازی گونادوتروپین در ماکیان [۴] و گنجشک [۲، ۱۹] نیز مشاهده شده است. نورون‌های بیان‌کننده GnIH در هسته پیرابطنی^۲ (PVN) هیپوتالاموس پرندگان تمرکز یافته‌اند. در سال ۲۰۰۶ برای نخستین بار گزارش شد گروهی از ترکیبات پیتیدی با عنوان پپتیدهای وابسته به آرژنین - فیل آلانین - امید (RFRP) همتای مولکول GnIH در پستانداران وجود دارند، از این رو در مهره‌داران تکامل یافته‌تر اثر مهاری بر تراوش گونادوتروپین دارند. بر اساس این گزارش سلول‌های بیان‌کننده RFRP در هسته پستی-داخلی هیپوتالاموس^۳ (DMH) موش، موش صحرایی و هامستر قرار داشتند [۱۵]. تاکنون شکل‌های گوناگونی از مولکول RFRP از نظر توالی آمینواسیدی شناسایی شده‌اند که همگی به وسیله ژن RFRP کد می‌شوند. در پی بیان این ژن و شکستن پیش‌پپتید، پپتیدهای RFRP-1 و RFRP-3 در بسیاری گونه‌ها ایجاد می‌شوند [۵].

اثر مهاری RFRP بر گونادوتروپ‌های هیپوفیزی، موجب کاهش فعالیت تولیدمثلی در موش‌های صحرایی نر و ماده [۱۳، ۱۸] و گوسفند [۶، ۱۲] شد. همچنین، تارها و پایانه‌های آکسون‌های نورون‌های RFRP در بسیاری از نقاط مغز از مانند ناحیه سپتال داخلی^۴، ناحیه پیش‌بینایی^۵ (POA) و هیپوتالاموس پیشین دیده شدند که همه این نواحی، محل تجمع نورون‌ها و تارهای GnRH نیز هستند. در هامستر، بیش از ۴۰ درصد سلول‌های GnRH ارتباط نزدیکی با پایانه‌های آکسون‌های نورون‌های RFRP داشتند [۱۵]. در موش صحرایی نر نیز حدود ۷۵ درصد جسم سلولی نورون‌های

1. Gonadotropin inhibitory hormone
2. Paraventricular nucleus
3. Dorsomedial nucleus of the hypothalamus
4. Medial septal area
5. Preoptic area

6. Vaginal smear

میانگین‌ها استفاده شد. در متن، میانگین (\pm خطای استاندارد) گزارش و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

جسم سلولی نورون‌های بیان‌کننده پپتید RFRP در DMH مشاهده شدند (شکل ۱) که تقریباً همه آن‌ها دو قطبی بودند (شکل ۲). چندین نورون مثبت نیز در هسته PVN شناسایی شد؛ اما در آنالیز داده‌ها وارد نشدند. تارهای عصبی رنگ شده، فزون بر محدوده هسته DMH، در مدیان ایمنینس^۱ نیز قابل تشخیص بودند (شکل ۳). شمار نورون‌های بیان‌کننده پپتید RFRP در هسته DMH در گامه‌های دای-استروس ($45/8 \pm 12/6$) و استروس ($44/7 \pm 3/6$) بیشترین و در اوایل گامه استروس ($18/8 \pm 0/8$) و گامه پرواستروس ($16/2 \pm 2/0$) کمترین بود. در گامه متاستروس، شمار حد واسط از نورون‌های مثبت مشاهده شد ($31/8 \pm 5/5$; شکل ۴).

بحث

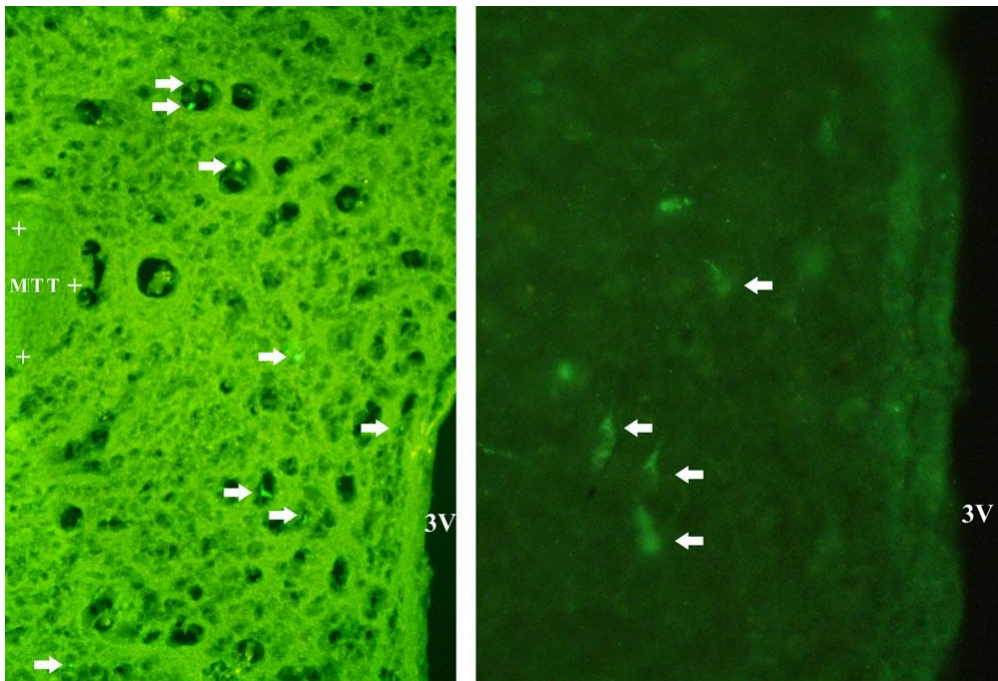
بیشتر نورون‌های بیان‌کننده پپتید RFRP در DMH موش صحرائی دیده شدند؛ اگر چه شمار اندکی نورون‌های مثبت در هسته پیرا بطنی (PVN) هیپوتالاموس نیز مشاهده شد. کلارک و همکاران [۶] نیز وجود سلول‌های RFRP را در هسته PVN هیپوتالاموس گوسفند گزارش کردند. در بسیاری از پستانداران، تراوش تونیک و سرژی GnRH با مکانیزم‌های فیدبکی استروئیدهای تخمدان و به ویژه استروژن، کنترل می‌شود. در موش صحرائی، میزان تراوش استرادیول تخمدانی در گامه استروس پایین است؛ در اواخر متاستروس شروع به افزایش می‌کند، در سراسر دای‌استروس افزایش می‌یابد و در بعدازظهر پرواستروس به حداکثر می‌رسد و سپس، به مقدار پایه باز می‌گردد [۷]. نورون‌های GnRH، گیرنده‌های آلفا استرادیول (ER_{α}) را در جوندگان بیان نمی‌کنند [۱۱] که برای ایجاد اثر فیدبک مثبت و منفی استرادیول ضروری است [۱۰].

1. Median eminence

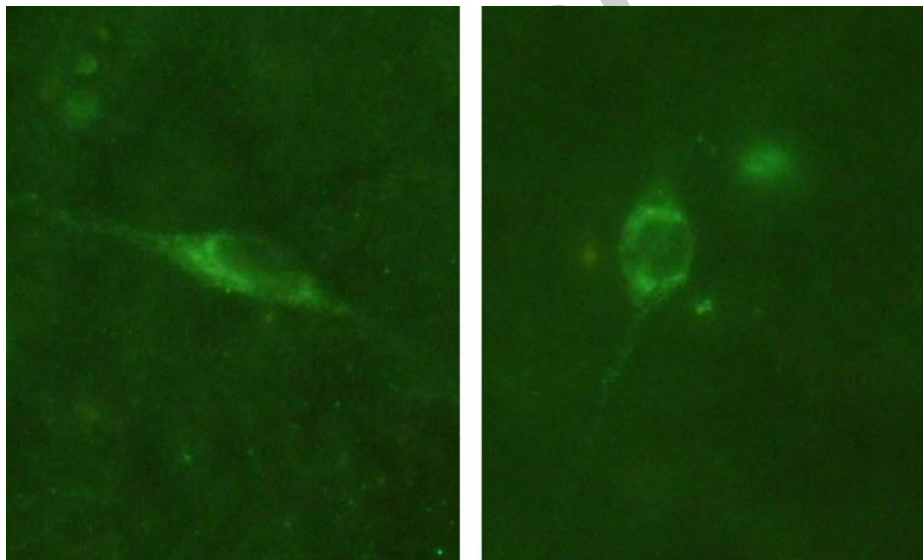
($n=3$). در گامه متاستروس نسبت مساوی از سلول‌های شاخی، پوششی و گلبول‌های سفید ($n=3$) وجود داشت. از آنجایی که سلول‌های شاخی بالغ، هسته ندارند، وجود سلول‌های شاخی و هسته‌دار به عنوان نماد آغاز گامه استروس ($n=3$) در نظر گرفته شدند [۲۵].

پس از تشخیص فحلی، موش‌ها با اتر بیهوش شدند. مغز هر جانور ابتدا با سالیان نرمال و سپس با محلول بافر فرمالین ۱۰٪ و با روش پرفیوژن از راه بطن چپ قلب فیکس شد. پس از خارج کردن مغز از مجامه، نمونه‌ها برای یک شب در محلول فیکساتیو (بافر فرمالین ۱۰٪) و برای ۴۸ ساعت در محلول بافر سوکروز ۳۰٪ قرار داده شدند و سپس در سطح کروئال و به صورت متوالی و به ضخامت ۳۰ میکرومتر با فریز میکروتوم (SLEE، آلمان) برش داده شدند.

به ازای هر موش صحرائی در هر گامه از چرخه فحلی، سه برش در بر گیرنده هسته DMH، بر اساس اطلس برش-های کروئال مغز موش صحرائی پاکسینوس [۲۰]، برای انجام ایمنوهیستوشیمی انتخاب شد. برش‌ها ابتدا برای ۱۰ دقیقه با بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس و سپس سه بار با فسفات بافر سالیان ۱۰ میلی مولار شسته شدند و آنگاه برش‌ها برای یک ساعت در محلول بلوک‌کننده دارای ۰/۰۳ درصد تریتون، ۱ درصد سرم بز و ۱ درصد آلبومین سرم گاو انکوبه شدند. از آنتی‌بادی اولیه علیه GnIH بلدرچین (SIKPSAYLPLRF-NH2) تولید شده در خرگوش (اهدایی دکتر Kazuyoshi Tsutsui) از بخش زیست‌شناسی دانشگاه Waseda، توکیو، ژاپن؛ رقت ۱:۱۰۰۰ برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و آنتی-بادی ثانویه FITC-IgG علیه خرگوش که در بز تولید شده بود (Invitrogen, Carlsbad, CA)؛ رقت ۱:۵۰ برای ۱ ساعت در دمای محیط) استفاده شد. پس از شستشوی نمونه‌ها با فسفات بافر سالیان، برش‌ها به روی لام انتقال داده شده و با محلول تثبیت‌کننده ضد کمرنگ‌شدگی ماده فلورسنت (Dako، آمریکا) پوشیده شدند. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Eclipse, E600، آمریکا) در طول موج ۴۶۵-۴۹۵ نانومتر مشاهده شدند. عکس برداری نورون‌ها با دوربین Canon (ژاپن، Eos, Kin, X4, BA-520) انجام شد. از رویه GLM (نرم افزار SAS، نسخه 9.1) برای آنالیز داده‌ها و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه



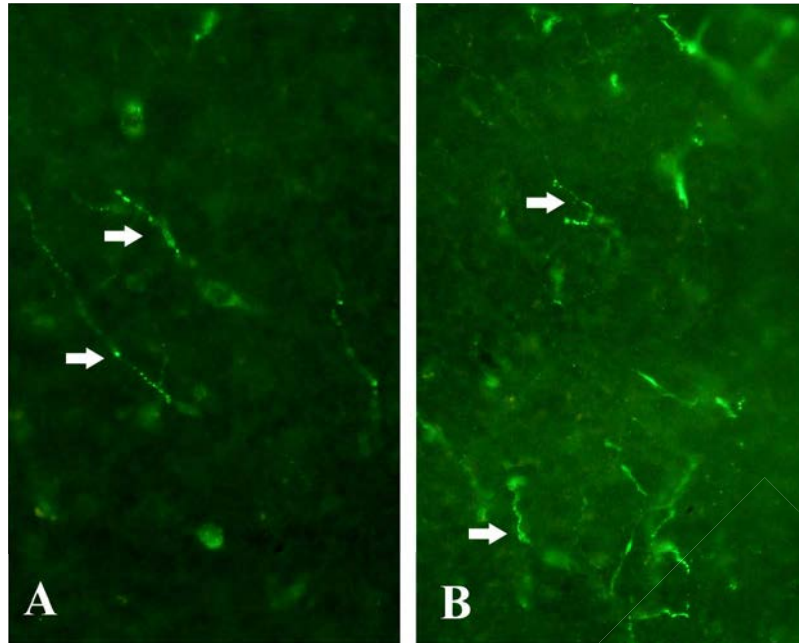
شکل ۱- نورون‌های بیان کننده پپتید وابسته به آرژنین- فنیل آلانین- آمید (RFRP) در هسته پستی- داخلی هیپوتالاموس (DMH) موش صحرائی. 3V: بطن سوم؛ MTT: مسیر پستانی - تالاموسی



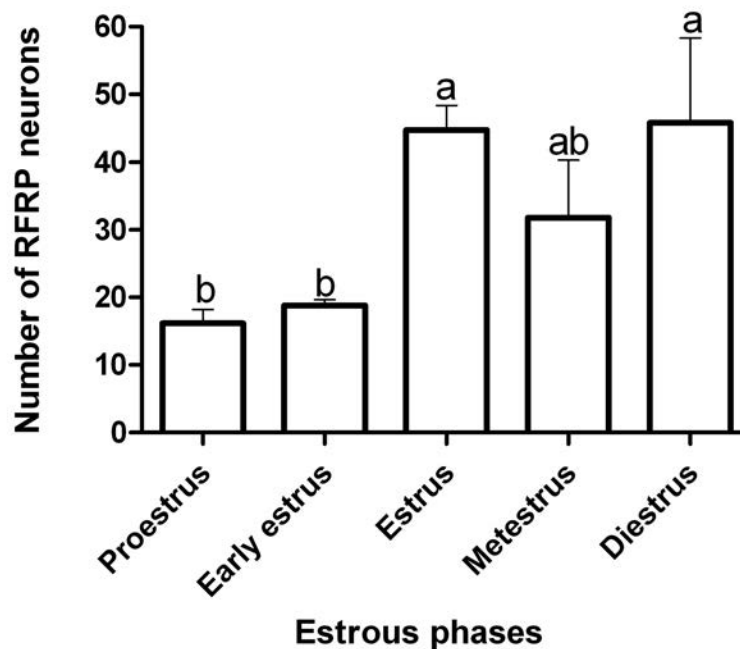
شکل ۲- نورون‌های دو قطبی بیان کننده پپتید وابسته به آرژنین- فنیل آلانین- آمید (RFRP) در هسته پستی- داخلی هیپوتالاموس (DMH) موش صحرائی

فزون بر این، سلول‌های RFRP هامستر [۱۵] و موش [۱۷] گیرنده ER α نیز بیان می‌کنند و تجویز ۱۷-بتا استرادیول سبب کاهش چشمگیر prepro-RFRP mRNA در موش‌های تخمدان برداری شده، شد [۱۷]. از این رو، ممکن است نورون‌های RFRP هسته DMH هیپوتالاموس میانجی اثر فیدبکی استروژن بر نورون‌های GnRH در موش صحرائی باشند.

از این رو، گفته می‌شود که احتمالاً دیگر نورون‌های حساس به استروئیدها در مغز پیشین که در بالا دست نورون‌های GnRH قرار دارند، میانجی اثر استروژن در تنظیم تراوش GnRH (و LH) هستند. پایانه‌های نورون‌های RFRP در جوندگان به سوی نورون‌های GnRH ادامه دارند [۱۵] و پپتید RFRP-3 اثر مهارتی بر نورون‌های GnRH موش [۱۷] و موش صحرائی [۱] داشته است.



شکل ۳- تارهای نورون‌های پپتید وابسته به آرژنین - فنیل آلانین - آمید (RFRP)، (A) در محدوده هسته پستی - داخلی هیپوتالاموس (DMH) (B) در مدیان ایمنس



شکل ۴- میانگین (± خطای استاندارد) شمار نورون‌های بیان‌کننده پپتید وابسته به آرژنین - فنیل آلانین - آمید (RFRP) در هسته پستی - داخلی هیپوتالاموس (DMH) در خلال چرخه فحلی موش صحرائی. میانگین‌های دارای بندواژه‌های نامشابه، تفاوت آماری معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

GnRH/LH نیز همراه بود، دیده شد؛ می‌توان چنین بیان کرد که ممکن است غلظت‌های بالای استرادیول که در بعد از ظهر گامه پرواستروس از تخمدان تراوش می‌شود فزون بر اثر فیدبکی مثبت برای انگیزش سرژ GnRH/LH با کاهش بیان RFRP در هسته DMH هیپوتالاموس، افزایش ناگهانی

در پژوهش کنونی، کمترین شمار نورون‌های بیان‌کننده پپتید RFRP در گامه پرواستروس و اوایل گامه استروس دیده شد. از آنجایی که این کاهش چشمگیر، در دوره پیش از تخم‌ریزی و در محدوده زمانی تراوش غلظت‌های بالای استرادیول از فولیکول‌های تخمدانی که احتمالاً با سرژ

کنونی پذیرفتنی است که نورون‌های RFRP میانجی اثرات فیدبکی استرادیول بر تراوش GnRH بوده و غلظت‌های بالای استرادیول که در گامه پرواستروس و اوایل استروس از فولیکول‌های تخمدان تراوش می‌شود فزون بر اثر فیدبکی مثبت برای انگیزش سرژ GnRH/LH احتمالاً با کاهش بیان RFRP، افزایش ناگهانی تراوش GnRH را نیز تسهیل می‌کند که این خود نشانگر نقش تنظیمی نورون‌های RFRP هسته DMH در کنترل چرخه فحلی موش صحرائی است.

سپاسگزاری

اعتبار این پژوهش از محل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد طرح ۴۰۵۶-۶۷-۰۱-۹۰ و نیز هسته کارآفرینی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تأمین شد. از همکاری سرکار خانم دکتر واحدی مدیر مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و پرسنل آن مرکز نیز سپاسگزاری می‌شود.

References

- [1] Anderson GM, Relf HL, Rizwan MZ, Evans JJ, Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* 150 (2009) 1834-1840.
- [2] Bentley GE, Perfito N, Ukena K, Tsutsui K, Wingfield JC, Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 15 (2003) 794-802.
- [3] Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R, Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci* 69 (1972) 278-282.
- [4] Ciccone NA, Dunn IC, Boswell T, Tsutsui K, Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Gonadotrophin inhibitory hormone depresses gonadotrophin α and follicle-stimulating hormone β subunit expression in the pituitary of the domestic chicken. *J Neuroendocrinol* 16 (2004) 999-

تراوش GnRH/LH را تسهیل می‌کند.

نتایج پژوهش کنونی با پژوهش پیشین ما که نشان داد بیان RFRP-3 mRNA در گامه پرواستروس در هیپوتالاموس موش صحرائی به صورت معنی‌داری کمتر از دای استروس است، هماهنگ است؛ اگر چه بیان ژن RFRP-3 در سطح رونویسی در گامه‌های استروس و مت-استروس، تفاوت معنی‌داری با گامه‌های پرواستروس یا دای استروس نداشت [۲۱]. همچنین گزارش شده بیان پپتید RFRP در بعد از ظهر پرو استروس در هامستر نیز کاهش می‌یابد [۸]. تارهای عصبی نورون‌های RFRP فزون بر هسته DMH در مدیای ایمنینس موش‌های صحرائی دیده شدند که اخیراً در همین ناحیه از مغز هامستر نیز شناسایی شده بودند [۲۴]. از این رو ممکن است که پپتید RFRP در جوندگان، علاوه بر اثر مستقیم بر نورون‌های GnRH، همانند پرندگان با تراوش به درون سیاهرگ باب هیپوفیزی، بر سلول‌های گونادوتروپ و تراوش LH نیز اثرگذار باشد. بنابراین، با توجه به یافته‌های منتشر شده و نتایج پژوهش

1006.

- [5] Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 30 (2009) 371-378.
- [6] Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149 (2008) 5811-5821.
- [7] Freeman ME: *Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat; in Neill JD* (ed Knobil and Neill's physiology of reproduction). USA, Elsevier Academic Press, 2006, vol 3, p. 2327-2388.
- [8] Gibson EM, Humber SA, Jain S, Williams WP, Zhao S, Bentley GE, Tsutsui K, Kriegsfeld LJ, Alterations in RFamide-Related Peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 149 (2008) 4958-4969.
- [9] Green JD, Harris GW, The neurovascular link between

- the neurohypophysis and adenohypophysis. *J Endocrinol* 5 (1946) 136-146.
- [10] Herbison AE: Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network; in Neill JD (ed Knobil and Neill's physiology of reproduction). USA, Elsevier Academic Press, 2006, vol 3, p. 1415-1482.
- [11] Herbison AE, Pape J-R, New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22 (2001) 292-308.
- [12] Jafarzadeh Shirazi MR, Namavar MR, Tamadon A, Expression of gonadotropin inhibitory hormone in the preoptic area and its relation with phases of estrous cycle of ewe. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 90-96.
- [13] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51 (2007) 171-180.
- [14] Kimura F, Funabashi T, Two subgroups of gonadotropin releasing hormone neurons control gonadotropin secretion in rats. *News Physiol Sci* 13 (1998) 225-231.
- [15] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci* 103 (2006) 2410-2415.
- [16] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP, Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62 (2002) 609-614.
- [17] Molnar CS, Kallo I, Liposits Z, Hrabovszky E, Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 152 (2011) 1684-1690.
- [18] Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K, Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 199 (2008) 105-112.
- [19] Osugi T, Ukena K, Bentley GE, O'Brien S, Moore IT, Wingfield JC, Tsutsui K, Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *J Endocrinol* 182 (2004) 33-42.
- [20] Paxinos G, Watson C, editors *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. ed 6th. New York: Academic Press, 2007.
- [21] Salehi MS, Jafarzadeh Shirazi MR, Zamiri MJ, Pazhoohi F, Namavar MR, Niazi A, Ramezani A, Tanideh N, Tamadon A, Zarei A, Hypothalamic expression of KiSS1 and RFamide-related peptide-3 mRNAs during the estrous cycle of rats. *Int J Fertil Steril* 6 (2013) 304-309.
- [22] Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L, White WF, Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43 (1971) 393-399.
- [23] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ, A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 661-667.
- [24] Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K, Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153 (2012) 373-385.
- [25] Willoughby C, Collier M, Preparation, reading and reporting of vaginal smears. In Creasy DM, editors. *Endocrine disruption: A guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests*, Organization of Economic Cooperation and Development, 2008, p. 116-125.