Débora Nunes Martins Bueno

**Estudo das conexões da área incerto-hipotalâmica
relacionadas ao controle neuroendócrino**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

Débora Nunes Martins Bueno

**Estudo das conexões da área incerto-hipotalâmica
relacionadas ao controle neuroendócrino**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bueno, Débora Nunes Martins.

Estudo das conexões da área incerto-hipotalâmica relacionadas ao controle neuroendócrino / Débora Nunes Martins Bueno. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Luciane Valéria Sita.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Neuroanatomia.

Versão do título para o inglês: Study of connections of incerto-hypothalamic area related neuroendocrine control.

1. Área incerto-hipotalâmica 2. MCH 3. Hipotálamo 4. BDA 5. FG
I. Sita, Profa. Dra. Luciane Valéria II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB02/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Débora Nunes Martins Bueno.

Título da Dissertação: Estudo das conexões da área incerto-hipotalâmica relacionadas ao controle neuroendócrino.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciane Valéria Sita.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA-ICB/USP - 006/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 111/09/CEUA, datado de 26.08.09 e por solicitação da Profa. Dra. Luciane Valéria Sita, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna ***Débora Nunes Martins Bueno*** ao Projeto de Pesquisa " A participação da área incerto-hipotalâmica na regulação da liberação do hormônio luteinizante", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu amado esposo.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a minha orientadora Luciane, pelo conhecimento que me passou durante minha trajetória no laboratório.

Aos colegas do departamento de anatomia e do LNQ, que compartilharam o conhecimento de técnicas para a realização de muitas etapas deste trabalho, muito obrigada a todos vocês pelo profissionalismo e em alguns momentos o companheirismo, foi muito importante para mim.

A Ana Maria (Aninha) e amigos do Laboratório de Neuroanatomia por se preocuparem comigo e pelo apoio e incentivo antes e durante o meu mestrado.

Ao meu amado esposo, que a todo o momento me incentivou, motivou e me amparou nos momentos mais difíceis. Deus me abençoou muito ao colocar você em minha vida.

À minha querida e amada mãe, meu exemplo de superação, crescimento e sucesso. Sou eternamente grata a você pelo amor incondicional de pai e mãe, incentivo e por sempre ter acreditado que eu alcançaria os meus sonhos.

Aos meus irmãos Raquel e Gustavo, sem vocês na minha vida nada teria graça, obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo longe estamos perto. Viva a internet...

As minhas tias, primos e amigos que mesmo longe conseguimos ficar em dia com as mensagens via celular e internet. Vocês são muito importantes para mim!

Aos meus sobrinhos que amo muito e sempre morro de saudade Bruna, Eloísa, Elena, Maria Eduarda, Antônio Henrique e Augusto.

A minha segunda e amada família, meu presente de casamento, Néia e Toninho, sogros abençoados por Deus, sou muito grata a vocês que estiveram presente a todos os momentos felizes e difíceis que passei nestes últimos anos. Amo vocês como pai e mãe. Agradeço em especial aos meus irmãos de coração, Éverton e Michele.

À Deus agradeço todos os dias por ter me escolhido para a vida. Pois mesmo a vida com tantas tribulações, esforços, cansaço ainda assim sigo na vida encontrando alegria, pois quem é meu escudo e onde deposito minha alegria em viver é Nele. “Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e Nele confiarei.” Sl 91:2.

A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro, às bibliotecárias pela atenção e revisão do trabalho, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

*“Contudo o Senhor mandará a sua misericórdia de dia, e de noite a sua canção estará
comigo, uma oração ao Deus da minha vida.” Salmos 42:8*

RESUMO

BUENO, D. N. M. **Estudo das conexões da área incerto-hipotalâmica relacionadas ao controle neuroendócrino**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A área incerto-hipotalâmica (IHy) é uma região diencefálica pouco estudada caracterizada pela presença de dois grupamentos neuroquímicos distintos, porém entremeados, sendo um deles dopaminérgico (grupamento A13) e o outro predominantemente GABAérgico colocalizado ou não com o hormônio concentrador de melanina (MCH) e/ou o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Os estudos funcionais sobre a IHy sugerem seu envolvimento no controle neuroendócrino de fêmeas, provavelmente atuando na regulação de funções reprodutivas em estados fisiológicos específicos mediados pelo Sistema MCH. Assim, nosso objetivo é estudar as conexões da IHy de ratos fêmeas com áreas relacionadas ao controle neuroendócrino reprodutivo de fêmeas usando traçador anterógrado Dextrana amina biotinilada (BDA) e retrógrado Flurogold (FG). Como resultado, observamos que, em fêmeas, os principais locais de projeção da IHy são a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo intersticial da estria terminal, o núcleo paraventricular do tálamo, núcleo *reuniens*, a área pré-óptica medial, o núcleo pré-óptico medial e lateral, o núcleo pré-óptico mediano, o núcleo periventricular do hipotálamo, o núcleo periventricular anteroventral, a área hipotalâmica anterior, posterior e lateral e o núcleo pré-comissural. No estudo retrógrado da IHy, observamos que os principais locais de aferência, em fêmeas, são a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo pré-óptico mediano e o núcleo paraventricular do tálamo. Esses resultados sugerem um dimorfismo sexual das projeções da IHy, já que regiões neuroendócrinas são mais densamente inervadas pelas IHy em fêmeas do que em machos.

Palavras-chave: Hipotálamo. Área incerto-hipotalâmica. Hormônio Concentrador de Melanina.

ABSTRACT

BUENO, D. N. M. **Study of connections of incerto-hypothalamic área related neuroendocrine control**. 2014. 63 p. Masters thesis (Morphofunctional Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The incerto-hypothalamic area (IH_y) is a diencephalic region poorly studied which is characterized by two non-colocalized neurochemical groups composed by the A13 dopaminergic group intermingled with predominantly GABAergic cells co-expressing melanin-concentrating hormone (MCH) and/or cocaine and amphetamine regulated transcript (CART). Functional studies suggest that IH_y is involved in the neuroendocrine control of female reproduction in specific metabolic states mediated by MCH. In this way, our aim is to study the IH_y connections in female rats related to neuroendocrine control of female reproduction using neuronal anterograde Biotin Dextran Amine (BDA) and retrograde Fluorogold (FG) tracers. As a result, we found that IH_y projections are the lateral septal nucleus, bed nucleus of *stria terminalis*, paraventricular thalamic nucleus, *reuniens* thalamic nucleus, medial preoptic area, medial and lateral preoptic nucleus, median preoptic nucleus, periventricular hypothalamic nucleus, anteroventral periventricular nucleus, anterior, posterior and lateral hypothalamic area and precommissural nucleus. The main afferents to the IH_y, in females, are the lateral septal nucleus, median preoptic nucleus and paraventricular thalamic nucleus. These results suggest sexually dimorphic projections from the IH_y, since IH_y more densely innervates neuroendocrine regions in female than in male rats.

Keywords: Hypothalamus. Incerto-hypothalamic area. Melanin-concentrating hormone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Sítios de injeção de traçador anterógrado BDA na área incerto-hipotalâmica (IHy)	30
FIGURA 2 - Sítio de injeção de traçador anterógrado BDA na área incerto-hipotalâmica	31
FIGURA 3 - Principais projeções da área incerto-hipotalâmica (IHy).....	36
FIGURA 4 - Representação esquemática das projeções da IHy (caso SD1619).....	37
FIGURA 5 - Sítios de injeção de traçador retrógrado FG na área incerto-hipotalâmica (IHy)	40
FIGURA 6 - Sítio de injeção de traçador retrógrado FG na área incerto-hipotalâmica ...	41
FIGURA 7 - Principais aferências da área incerto-hipotalâmica (IHy).....	44
FIGURA 8 - Representação esquemática das aferências da IHy (caso SD1546).....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição das eferências da IHy 34

TABELA 2 – Distribuição das aferências da IHy 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V – terceiro ventrículo
ac – comissura anterior
AgRP – peptídeo relacionado ao agouti
Aq – aqueduto mesencefálico
Arc – núcleo arqueado
AVPV – núcleo periventricular anteroventral
BDA – dextrana amina biotinilada
CART – transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
f – fórnice
FG – Fluorogold
FITC – isoticianato de fluoresceína
GABA – ácido gama-amino butírico
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
IHy – área incerto-hipotalâmica
Kiss - Kisspeptina
LH – hormônio luteinizante
LSI – parte intermédia do núcleo septal lateral
LSV – parte ventral do núcleo septal lateral
LV – ventrículo lateral
MCH – hormônio concentrador de melanina
MCH-ir – imunorreativo ao hormônio concentrador de melanina
MnPO – núcleo pré-óptico mediano
MPO – núcleo pré-óptico medial
MPOA – área pré-óptica medial
mt – trato mamilotalâmico
NEI – neuropeptídeo EI
ox – quiasma óptico
PAG – substância cinzenta periaquedutal
Pe – núcleo periventricular do hipotálamo
PMv – núcleo pré-mamilar ventral
TH – tirosina hidroxilase
ZI – zona incerta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Área incerto-hipotalâmica	16
1.2 Limites cito e quimioarquitetônicos	16
1.3 Hodologia da IHy	17
1.4 Funções da IHy	18
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais	24
4.2 Determinação do ciclo estral	24
4.3 Perfusão e preparação do tecido	24
4.4 Padronização do local de injeção	25
4.5 Estudo anterógrado	25
4.6 Estudo retrógrado	27
4.7 Análise e apresentação de fotomicrografias	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Padronização do local de injeção	29
5.2 Projeções IHy	29
5.2.1 Locais de injeção	29
5.2.2 Distribuição das projeções da IHy (caso SD1619)	32
5.2.3 Particularidades das vias de projeção do caso 1531	39
5.2.4 Particularidades das vias de projeção do caso 1504	39
5.2.5 Particularidades das vias de projeção do caso 1529	39
5.3 Aferências da IHy	39
5.3.1 Locais de injeção	39
5.3.2 Distribuição das aferências da IHy (caso SD1546)	42
5.3.3 Particularidades do caso 1547	47
5.3.4 Particularidades do caso 1594	47
6 DISCUSSÃO	48
6.1 Considerações metodológicas	48
6.2 Considerações funcionais	49

7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Área incerto-hipotalâmica

A área incerto-hipotalâmica (IHy) é uma região diencefálica pouco estudada localizada na junção entre o hipotálamo medial e a zona incerta (ZI). Com limites citoarquitetônicos pouco precisos e a carência de estudos hodológicos, a IHy foi até recentemente considerada uma parte da ZI, recebendo denominações diversas e atribuições funcionais confusas. Recentemente nosso grupo dedicou-se a esclarecer alguns aspectos citoarquitetônicos, neuroquímicos, hodológicos e funcionais da IHy (ELIAS et al., 2008; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2003, 2007; SITA et al., em preparação), que serão descritos a seguir. Esses trabalhos culminaram na padronização da nomenclatura dessa região para área incerto-hipotalâmica (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007), denominação esta que já foi incorporada pelos pesquisadores que estudam essa região (BITTENCOURT; CELIS, 2008; ELIAS et al., 2008; LAGOS et al., 2009; NAKAMURA et al., 2009; TORTEROLO; SAMPOGNA; CHASE, 2009) e será utilizada nesse projeto.

1.2 Limites cito e quimioarquitetônicos

A delimitação da IHy faz-se principalmente por marcadores neuroquímicos. Esses marcadores determinam dois grupamentos neuroquímicos distintos. Um deles é caracterizado pela presença de dopamina, visualizada pela presença de tirosina hidroxilase (TH) e constituindo o grupamento dopaminérgico A13 (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964; HÖKFELT et al., 1984). Entremeados ao grupamento A13, com aparente contato sináptico com células dopaminérgicas, mas sem colocalização com neurônios dopaminérgicos (OERTEL et al., 1982; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2003), encontram-se células com maior diversidade neuroquímica, em geral GABAérgicas (OERTEL et al., 1982), mas também apresentando o hormônio concentrador de melanina (MCH) (BITTENCOURT et al., 1992; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2003) e/ou o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART, ELIAS et al., 2001; VRANG et al., 1999).

Baseado na sobreposição parcial das células dopaminérgicas com a parte rostral da ZI, essa região foi por muito tempo considerada parte da ZI (KAWANA; WATANABE, 1981; MITROFANIS, 2005; PAXINOS; WATSON, 1998; SWANSON, 2004), inclusive por

nosso grupo (BITTENCOURT; ELIAS, 1998; BITTENCOURT et al., 1992; CASATTI et al., 2002; ELIAS; BITTENCOURT, 1997; ELIAS et al., 2008; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2003) e recebeu diversas denominações ao longo de sua história, incluindo ZI rostral (MITROFANIS, 2005), ZI medial (WAGNER et al., 1995) e ZI rostromedial (BITTENCOURT et al., 1992; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2003). Entretanto, a IHy não pode ser definida como núcleo, já que não tem limites citoarquitetônicos nítidos (GAHR, 1997) e o uso de marcadores neuroquímicos (TH, MCH, CART) mostra que os neurônios da IHy coincidem com parte da ZI rostral e a parte mais rostral e medial da ZI dorsal, mas aproximadamente metade da área da IHy está fora dos limites citoarquitetônicos da ZI (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007).

Através de estudos de dupla hibridização *in situ* foi possível definir que GABA, MCH e CART estão amplamente co-expressos (ELIAS et al., 2001; ELIAS et al., 2008). O significado funcional dessa dicotomia neuroquímica não está bem definido, mas há indícios de que as células dopaminérgicas sofram uma inibição tônica GABAérgica, de modo a modular sua função na regulação da secreção hormonal (KALIA et al., 1999). Nesse sentido, o MCH pode agir como modulador da transmissão GABAérgica, já que estudos *in vitro* demonstram que o MCH promove uma redução na frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias em sinapses GABAérgicas (GAO; VAN DEN POL, 2001). Essa função modulatória GABAérgica poderia assumir importância nas funções neuroendócrinas do MCH, discutidas adiante.

1.3 Hodologia da IHy

Corroborando os dados citoarquitetônicos e hodológicos que distinguem a IHy da ZI, as eferências da IHy mostram que esta possui um padrão de projeções semelhante ao de núcleos do hipotálamo medial. Em machos, a IHy projeta-se principalmente para estruturas mediais do encéfalo desde os núcleos septais até a substância cinzenta da ponte, sendo suas principais projeções o núcleo septal lateral, núcleo *reuniens*, área hipotalâmica anterior, área hipotalâmica dorsal, núcleo pré-comissural, área hipotalâmica posterior e substância cinzenta periaquedutal (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007). Regiões relevantes para a regulação neuroendócrina como a área pré-óptica medial e o núcleo periventricular anteroventral (AVPV) recebem moderada inervação, porém a eminência mediana apresenta discreta e inconstante

inervação (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007), mas devemos lembrar que esse estudo foi conduzido exclusivamente em ratos machos.

Ainda não foram realizados estudos com injeções de traçadores retrógrados na IHy em ratos machos ou fêmeas.

1.4 Funções da IHy

Trabalhos realizados com lesão nas décadas de 80 e 90 sugeriam que a IHy estivesse envolvida na regulação da liberação do hormônio luteinizante. Lesões eletrolíticas, com ácido ibotênico ou com 6-hidroxidopamina bilaterais da IHy abolem o pico ovulatório plasmático do hormônio luteinizante (LH) e induzem diestro (MACKENZIE et al., 1984; MACKENZIE; JAMES; WILSON, 1988; SANGHERA; ANSELMO-FRANCI; MCCANN, 1991). Essa função parece ser dependente das células dopaminérgicas do grupamento A13, já que a injeção de dopamina na IHy induz a um aumento na concentração plasmática de LH (MACKENZIE et al., 1984), porém o papel neuroendócrino das células MCH da IHy não está bem elucidado.

O MCH é um peptídeo orexígeno expresso principalmente na área hipotalâmica lateral e IHy (BITTENCOURT et al., 1992; QU et al., 1996; ROSSI et al., 1997). Entretanto, uma análise das projeções da IHy mostra que essa região não deve atuar diretamente no controle do comportamento alimentar como faz a área hipotalâmica lateral (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007). De fato, além do comportamento alimentar, o MCH está envolvido em diversas outras funções, como neuromodulador, incluindo alerta, comportamento exploratório, memória espacial, homeostase energética, regulação neuroendócrina, depressão, ansiedade e homeostase do sono (BITTENCOURT; ELIAS, 1998; BITTENCOURT et al., 1992; BOROWSKY et al., 2002; CASATTI et al., 2002; ELIAS; BITTENCOURT, 1997; ELIAS; FRIGO; BITTENCOURT, 1997; MCBRIDE et al., 1994; MONZON; DE BARIOGLIO, 1999; MONZON et al., 1999; MURRAY et al., 2000a; PEREIRA-DASILVA et al., 2003; TSUKAMURA et al., 2000; VERRET et al., 2003).

O MCH inerva de maneira significativa a eminência mediana (BITTENCOURT et al., 1992; KNOLLEMA et al., 1992) e injeções vasculares de traçador retrógrado resultam em neurônios retrogradamente marcados na IHy, que são imunorreativos a MCH, sugerindo projeções dos neurônios MCH da IHy para a eminência mediana (CVETKOVIC et al., 2003; KNOLLEMA et al., 1992). Além disso, células apresentando o hormônio liberador do

hormônio luteinizante (hormônio liberador de gonadotrofinas, GnRH) no núcleo pré-óptico medial, núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e órgão vascular da lâmina terminal (ATTADAMO et al., 2006; MURRAY et al., 2006; WILLIAMSON-HUGHES; GROVE; SMITH, 2005) são inervadas por fibras MCH e NEI-ir, cuja origem é desconhecida. O NEI é outro peptídeo codificado pelo mesmo precursor do MCH e coexpresso com o MCH (BITTENCOURT et al., 1992).

Essa distribuição de fibras MCH-ir na eminência mediana varia entre machos e fêmeas nos diferentes estágios do ciclo estral, sendo maior no diestro e ainda mais expressivo na fêmea lactante no final da lactação (GALLARDO; CHIOCCHIO; TRAMEZZANI, 2004; RONDINI et al., 2010). No proestro, o conteúdo do MCH na eminência mediana aumenta ao redor do meio dia (coincidindo com o aumento de GnRH na eminência mediana) e diminui à tarde precedendo a liberação de GnRH e o pico pré-ovulatório de LH no sangue (GALLARDO; CHIOCCHIO; TRAMEZZANI, 2004). O MCH também estimula a liberação do GnRH ao ser injetado, *in vitro*, na eminência mediana de ratas no proestro (CHIOCCHIO et al., 2001). Já a injeção de MCH na área pré-óptica medial ou na eminência mediana estimula a liberação de LH em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol, as quais apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de LH (GONZALEZ; BAKER; WILSON, 1997; MURRAY et al., 2000a), mas não impede a liberação de LH originada pelo tratamento com benzoato de estradiol seguido de progesterona (GONZALEZ; BAKER; WILSON, 1997; MURRAY et al., 2006). Ratas ovariectomizadas sem tratamento hormonal apresentam altos níveis plasmáticos de LH devido a um aumento compensatório dos pulsos de GnRH hipotalâmicos diante da ausência de estrógeno (HAISENLEDER; DALKIN; MARSHALL, 1994) e a injeção de MCH nesses animais provoca uma diminuição dos níveis de LH (MURRAY et al., 2006). Também é interessante o fato de que a injeção de MCH na IHy de ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol seguido de progesterona provoca uma diminuição da liberação de LH, fato este que pode ser explicado pela presença de autoreceptores nessa região de tal forma que o MCH exógeno inibiria a atividade do MCH endógeno (MURRAY et al., 2006), atividade esta provavelmente exercida a distância. Também foi observada uma diminuição nos níveis plasmáticos do LH após injeção de MCH no ventrículo lateral de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (TSUKAMURA et al., 2000).

Algumas evidências apontam para um dimorfismo sexual das vias relacionadas ao MCH. Dessa forma, observamos células expressando MCH no núcleo laterodorsal do

tegmento apenas em fêmeas, independente do ciclo estral (RONDINI et al., 2007). Além disso, células da área pré-óptica medial de fêmeas expressam MCH apenas no final do período de lactação (KNOLLEMA et al., 1992; RONDINI et al., 2010). Fêmeas ovariectomizadas com ou sem reposição de estrógeno apresentam uma diminuição no número e na intensidade do sinal de células expressando o RNAm do precursor do MCH somente na IHy, mas essa expressão ainda é maior do que a observada em machos (MURRAY et al., 2000b; ELIAS, comunicação pessoal). Por outro lado, fêmeas ovariectomizadas sem reposição de estrógeno apresentam um aumento no número de células imunorreativas ao neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina (NEI) apenas na IHy (ATTADEMO et al., 2006).

Corroborando os resultados acima descritos para os estudos envolvendo o MCH, a injeção intracerebroventricular de NEI também resulta em aumento dos níveis plasmáticos de LH, tanto em machos quanto em fêmeas (ATTADEMO et al., 2004). Todos esses dados sugerem uma relação entre o sistema MCH e o LH, provavelmente dependente do estado fisiológico do animal e do seu local de ação, mas os sítios responsáveis por essa função precisam ser ainda investigados.

Contudo, todo o conhecimento sobre a regulação do LH sofreu uma revolução após a descoberta das kisspeptinas e a literatura atual tem atribuído papel preponderante a elas no controle neuroendócrino da ovulação. Kisspeptinas são uma família de peptídeos codificados pelo gene *Kiss1* (nomenclatura de acordo com GOTTSCH; CLIFTON; STEINER, 2009), com capacidade de se ligar e ativar o receptor GRP54, atualmente renomeado Kiss1r, e que desempenham um papel chave no controle neuroendócrino da ovulação (para uma revisão, veja OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009; TENA-SEMPERE, 2010). Neurônios *Kiss1* estão localizados no núcleo arqueado (Arc) e AVPV. A kisspeptina produzida pelos neurônios do AVPV ativam os neurônios GnRH diretamente (DUMALSKA et al., 2008; HAN et al., 2005; PIELECKA-FORTUNA; CHU; MOENTER, 2008), os quais amplamente expressam o receptor das kisspeptinas (Kiss1r; CLARKSON; HERBISON, 2006; IRWIG et al., 2004), aumentando a liberação de hormônios gonadotróficos pela hipófise e disparando uma cascata que é essencial para dar início à puberdade (SEMINARA et al., 2003) e manter a ovulação e fertilidade (CLARKSON et al., 2008). Além disso, as kisspeptinas também podem agir indiretamente, através de interneurônios GABAérgicos que influenciam a secreção do GnRH (PIELECKA-FORTUNA; CHU; MOENTER, 2008). *In vitro*, o MCH mostrou-se capaz de inibir diretamente neurônios GnRH septais que são seletivamente ativados pela kisspeptina,

bloqueando seu efeito excitatório, o que poderia ser um provável elo entre balanço energético e reprodução (WU, 2009).

Por outro lado, dados mais recentes provenientes de estudos com modelos genéticos múltiplos sugerem que as kisspeptinas não exercem um efeito exclusivo no controle da ovulação. Camundongos transgênicos com deleção do gene para a leptina (*ob/ob*) ou seu receptor LepR (*db/db*) desenvolvem obesidade por hiperfagia e são inférteis por apresentarem baixos níveis de LH (TARTAGLIA et al., 1995; ZHANG et al., 1994), pois a leptina é um hormônio produzindo pelo tecido adiposo branco que sinaliza os estoques de energia para o eixo reprodutor. Surpreendentemente, a deleção seletiva do LepR dos neurônios *Kiss1* não afetam a fertilidade, sugerindo que a kisspeptina não está relacionada ao controle reprodutivo exercido pela leptina (DONATO et al., 2011). Além disso, esses autores mostraram que o núcleo pré-mamilar ventral (PMv) é o núcleo chave para a ação da leptina na reprodução, a qual atua de maneira dissociada no controle do metabolismo e da reprodução (DONATO et al., 2011). É interessante informar que lesões no PMv além de interromperem o ciclo estral, provocam diminuição da concentração plasmática de estrógeno e LH, além de diminuição da presença de proteína Fos (secundário ao proestro) no núcleo periventricular anteroventral (DONATO et al., 2009) e também na IHy de fêmeas (ELIAS, comunicação pessoal).

Dessa forma, ainda que as kisspeptinas exerçam papel direto na regulação da liberação do hormônio luteinizante, sistemas alternativos podem atuar em situações metabólicas específicas de maneira dependente ou independente das kisspeptinas.

2 JUSTIFICATIVA

Recentemente, nosso grupo tem se dedicado ao esclarecimento de alguns aspectos citoarquitetônicos, neuroquímicos, hodológicos e funcionais da IHy (ELIAS et al., 2008; SITA et al, em preparação; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2003, 2007). O corpo de conhecimentos sobre as funções da IHy apontam para seu envolvimento no controle neuroendócrino de fêmeas, provavelmente atuando na regulação de funções reprodutivas em estados fisiológicos específicos mediados pelo Sistema MCH. O conhecimento das conexões da IHy em fêmeas com áreas relacionadas com o controle reprodutivo acrescentaria dados importantes para o entendimento de suas funções. Entretanto, em nosso estudo prévio das projeções da IHy em machos observamos uma moderada inervação de áreas relacionadas ao controle neuroendócrino (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007), sendo necessária a realização de um estudo das suas eferências em fêmeas, para análise de um possível dimorfismo sexual dessas projeções, além da realização de estudos de suas aferências. Note que a expressão dos peptídeos do sistema MCH, incluindo as células da IHy, apresenta modificações entre machos e fêmeas e entre diferentes estados fisiológicos das fêmeas (ATTADEMO et al., 2006; GALLARDO; CHIOCCHIO; TRAMEZZANI, 2004; KNOLLEMA et al., 1992; MURRAY et al., 2000b; RONDINI et al., 2007; RONDINI et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Diante dos dados expostos acima, nosso objetivo é estudar as conexões da IHy de fêmeas com áreas relacionadas ao controle reprodutivo usando traçadores neuronais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos fêmeas adultos jovens da linhagem Sprague-Dawley com peso aproximado de 230-280 g. Os animais foram criados no Biotério do Departamento de Anatomia e mantidos em ciclo de claro:escuro de 12/12 h (luzes acesas às 6:00). As ratas tiveram livre acesso à água e ração. As fêmeas foram submetidas à análise do ciclo estral através da técnica de esfregaço vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Todos os protocolos estão de acordo com as normas da “National Academy of Science” (2003, WASHINGTON - EUA) e da “Comissão de Ética em Experimentação Animal” do ICB (Protocolo 111/09/CEUA).

4.2 Determinação do ciclo estral

As ratas tiveram o ciclo estral acompanhado por pelo menos dois proestros antes do procedimento cirúrgico para certificarmos que o estudo se deu com fêmeas em idade reprodutiva e regularidade do ciclo estral. O ciclo estral das ratas foi determinado por meio da técnica de esfregaço vaginal, que consiste na introdução no canal vaginal de um pequeno volume de salina usando uma pipeta de plástico para a imediata coleta do lavado vaginal. O líquido coletado é colocado em lâminas de vidro e observado no microscópio óptico (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Observa-se na fase diestro uma predominância de leucócitos, na fase proestro é observada uma predominância de células epiteliais nucleadas, na fase estro observa-se células cornificadas, enquanto que na fase metaestro encontramos um emaranhado dos 3 tipos celulares: leucócitos, células epiteliais nucleadas e células cornificadas.

4.3 Perfusão e preparação do tecido

Os animais foram submetidos à perfusão e microtomia. Sob anestesia profunda com hidrato de cloral a 35 % aplicado via intraperitonal (Quimibrás, Rio de Janeiro – BR), foi coletado sangue da veia cava abdominal seguidos de perfusão com solução salina 0,9 % (100 ml em 1 minuto) e a seguir com fixador de formaldeído a 4 % (preparado a partir do

aquecimento de paraformaldeído a 65 °C, LabSynth, Diadema – BR) e 3,8 % de bórax (LabSynth) pH 9,5 a 4 °C (700-900 ml em 25 minutos).

O encéfalo dos animais foi retirado do crânio e pós-fixado na mesma solução fixadora acrescida de 20 % de sacarose (LabSynth) por um período de 12 a 18 horas a 4 °C e em seguida colocados em solução de KPBS (tampão fosfato de sódio 10 mM e NaCl 140 mM) com 20 % de sacarose para crioproteção, até o momento da microtomia. Os encéfalos foram cortados no plano frontal, em micrótomo de congelação, na espessura de 30 µm em 5 séries de 1-em-5 e armazenados em solução anticongelante (30 % de etilenoglicol e 20 % de glicerol em 1XPBS) a temperatura de -30 °C.

4.4 Padronização do local de injeção

Para padronização do local de injeção, foi utilizado o implante de traçador retrógrado Fluorogold, que é autofluorescente, possibilitando rápida verificação do local de injeção. Foram utilizados 18 animais, que foram anestesiados por via subcutânea com uma solução anestésica formada por acepromazina (0,2 mg/100 g de peso), xilazina (1 mg/100 g de peso) e cetamina (5 mg/100 g de peso) em veículo aquoso, fixados em estereotático e submetidos ao implante de traçador retrógrado Fluorogold a 2 % (FG, Fluorochrome, Englewood – EUA) através de iontoforese (5 microamperes durante 10 minutos). Foram utilizadas as coordenadas fornecidas pelo Atlas de Paxinos & Watson (1998), as quais foram paulatinamente ajustadas até a determinação das coordenadas ideais para injeção nos nossos animais. No dia seguinte, os animais foram perfundidos e seus encéfalos cortados como descrito acima. Uma série de cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com lamínulas usando tampão glicerol como meio de montagem. Uma série adjacente de cortes foi submetida à técnica de Nissl como referência citoarquitetônica.

4.5 Estudo anterógrado

Foram utilizados 64 animais. Os animais foram anestesiados por via subcutânea com uma solução anestésica descrita acima, fixados em estereotático e submetidos ao implante de traçador anterógrado dextrana amina biotinilada (BDA) a 10 % (10.000 MW, Molecular Probes, Eugene – EUA) através de iontoforese por meio de uma micropipeta de vidro de 20 µm de diâmetro interno (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007). A solução contendo o

traçador foi introduzida no encéfalo através de craniotomia seguindo as coordenadas obtidas durante a padronização da injeção. A intensidade da corrente utilizada foi de 7 microamperes durante 20 minutos.

Após a cirurgia, os animais permaneceram entre 16 e 21 dias no biotério do Departamento de Anatomia para permitir o tempo necessário de transporte do traçador e monitoramento do ciclo estral pra sacrifício durante a fase diestro.

Para verificação do local de injeção do BDA usamos a histoquímica associada à imuno-histoquímica com o anticorpo anti-MCH segundo protocolo descrito por Hoffman, Le e Sita (2008), para nos fornecer uma referência quimioarquitetônica da região da IHy (veja SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007).

Inicialmente os cortes foram lavados em tampão potássio-fosfato de sódio 0,02 M (KPBS – 6x5 minutos) e incubados em anticorpo primário anti-MCH (PBL#234, gentilmente cedido pela Dra. Joan Vaughan e pelo Dr. Wyllie Vale do Laboratório de Biologia de Peptídeos do Instituto Salk para Pesquisa Biológica, San Diego – EUA) na concentração 1:1000 em KPBS, 3 % de soro normal de burro e 0,3 % de Triton X-100, pelo período de 24 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação e protegidos da luz. Após este período, os cortes foram lavados em KPBS (6x5 minutos) e incubados em anticorpo secundário IgG conjugado ao Cy3® gerado em burro contra coelho, na concentração 1:200 em KPBS 3% de soro normal de burro e 0,3% de Triton X-100, em temperatura ambiente, sob constante agitação e protegidos da luz, durante 1 hora. Os cortes foram lavados em KPBS (6x5 minutos) e incubados em estreptavidina conjugado ao DTAF (diclorotriazinilamino fluoresceína) na concentração 1:200 em KPBS 3% de soro normal de burro e 0,3 % de Triton X-100 em temperatura ambiente, sob constante agitação e protegidos da luz, durante uma hora. Os cortes foram lavados em KPBS (6x5 minutos) e em seguida montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com lamínulas usando tampão glicerol como meio de montagem.

Os casos com injeção de BDA localizadas na IHy foram submetidos à histoquímica para a visualização do BDA. Os cortes foram lavados em KPBS (6x5 minutos), tratados com 0,3 % de peróxido de hidrogênio e 0,3 % de Triton X-100 em KPBS durante 15 minutos para neutralização da peroxidase endógena e novamente lavados em KPBS para serem incubados no complexo avidina-biotina por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS e submetidos à reação de peroxidase, fornecida por solução de KPBS, o cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) a 0,05 % e 0,01 % de peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com uma lavagem em KPBS (6x5 minutos). Os cortes foram montados em lâminas

previamente gelatinizadas e secas em estufa por 18 horas. A seguir, foram submetidos à intensificação pelo método da prata e ouro, que resulta numa melhor visualização das fibras marcadas. Para a realização desse método, as lâminas foram desidratadas e deslipidificadas por sete dias, para evitar deposição de prata na mielina. A seguir, as lâminas foram reidratadas e mergulhadas numa solução de nitrato de prata (LabSynth) a 2,5 % a 56 °C por 1 hora, lavadas em água corrente e mergulhadas em uma solução de cloreto de ouro (Sigma) a 0,1 %, por 10 minutos, em temperatura ambiente, agitação constante e protegida da luz. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente e mergulhadas numa solução de tiosulfato a 5 % em temperatura ambiente e agitação constante. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram desidratadas, deslipidificadas e cobertas com lamínulas usando como meio de montagem o DPX (SITA; BITTENCOURT, 2007; SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007).

4.6 Estudo retrógrado

Para o estudo das aferências da IHy foram utilizadas 14 ratos fêmeas, com controle do ciclo estral semelhante ao descrito acima.

Os animais foram anestesiados com a solução anestésica descrita acima, fixados em estereotático e submetidos ao implante de traçador retrógrado Fluorogold a 2 % (FG, Fluorochrome, Englewood – EUA) através de iontoforese, por meio de uma micropipeta de vidro de 20 µm de diâmetro interno. A intensidade da corrente utilizada foi de 5 microamperes durante 10 minutos.

Para verificação do local de injeção utilizamos a autofluorescência do FG associada a imuno-histoquímica com o anticorpo anti-MCH para nos fornecer uma referência quimioarquitetônica da região da IHy (veja SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007).

Os casos com injeção de FG localizadas na IHy foram submetidos à imuno-histoquímica, onde os cortes foram lavados em KPBS (2x10 minutos), tratados com 0,3 % de peróxido de hidrogênio e 0,3 % de Triton X-100 em KPBS durante 30 minutos para neutralização da peroxidase endógena e novamente lavados em KPBS e colocados em uma solução de bloqueio por 40 minutos e então incubados overnight no anticorpo anti-FG (1:10.000). No segundo dia os cortes foram lavados em KPBS (2x10 minutos) e incubados por 1 hora em anticorpo biotinilado, então mais uma vez os cortes são lavados para serem incubados no complexo avidina-biotina por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS e submetidos à reação de peroxidase, fornecida por solução de KPBS, o cromógeno

tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) a 0,05 %, NaS a 0,05 % e 0,01 % de peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com uma lavagem em KPBS (2x10 minutos). Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e secas em estufa por 18 horas.

A seguir, os cortes foram submetidos à realização do método de osmicação, para intensificação do produto da reação com DAB, sendo utilizada para a visualização dos neurônios retrogradamente marcados.

Para a realização desse método, as lâminas foram primeiramente desidratadas e deslipidificadas. A seguir, as lâminas foram reidratadas e mergulhadas numa solução de ósmio a 0,005 % por 30 minutos. Após, foram lavadas em água corrente e a seguir mergulhadas em uma solução de tiocarboidrazida (TCH) por 15 minutos.

Assim, mais uma vez as lâminas foram lavadas em água corrente e novamente mergulhadas na solução de ósmio, por 30 minutos. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram desidratadas, deslipidificadas e cobertas com lamínulas usando como meio de montagem o DPX.

4.7 Análise e apresentação de fotomicrografias

As lâminas foram observadas em microscópio LEICA DMR equipado com campo claro, campo escuro e epifluorescência (filtro de luz ultravioleta A com 340-380 nm de comprimento de onda; filtro de luz azul I3 com 450-490 nm de comprimento e filtro de luz verde N21 com 515-560 nm).

Os sítios de injeção dos casos analisados foram desenhados com o auxílio de uma câmera clara associada a um microscópio LEICA DMLS, escaneados para o computador e desenhados com auxílio do programa Canvas 10.0 (Deneba Systems Inc., EUA).

Os esquemas das vias de projeção e aferências da IHy foram desenhados com o auxílio de uma câmera clara associada a um microscópio LEICA DMLS e a seguir adaptados aos esquemas da versão digital do Atlas de Paxinos & Watson (2009) utilizando o programa Adobe Illustrator 11.0 em um computador Apple Macintosh.

As fotomicrografias apresentadas foram adquiridas do microscópio para o computador através de uma câmera digital NIKON DS-Ri1 e do programa NIS Elements BR 3.0 (Nikon). As imagens foram trabalhadas com auxílio do programa Adobe Photoshop versão 8.0.1 ajustando-se brilho, contraste e foco (SAPER, 1999; SCHENK; MANNING; PAALMAN,

1999) e organizadas em páginas através do mesmo programa. As páginas foram impressas em impressora de tinta.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do local de injeção

Para a padronização do local de injeção, foi utilizada a injeção do traçador Fluorogold apenas para visualização do local de injeção. Para fêmeas pesando entre 230 g e 250 g obtivemos como melhor coordenada os seguintes valores a partir do Bregma: anteroposterior - 2.7 mm; mediolateral -0.5 mm; dorsoventral -7.2 mm.

5.2 Projeções da IHy

5.2.1 Locais de injeção

Obtivemos quatro casos com injeção centrada na IHy injetados com traçador anterógrado BDA.

Os quatro casos obtidos (SD1504, SD1529, SD1531 e SD1619) apresentam a injeção na IHy, imediatamente ventral ao trato mamilotalâmico (figura 1).

O caso SD1504 apresenta injeção na região mais caudal do território de células MCH-ir da IHy (-2.80 de distância do Bregma). O caso SD1529 também apresenta injeção na região mais caudal do território de células MCH-ir da IHy (-2.80 de distância do Bregma), parcialmente ventral ao território de células MCH-ir. O caso SD1531 (figuras 2 e 3) apresenta injeção na porção média do território de células MCH-ir da IHy (-2.30 de distância do Bregma), também parcialmente ventral ao território de células MCH-ir. O caso SD1619 (figuras 1 e 2) apresenta injeção na porção média do território de células MCH-ir da IHy (-2.30 de distância do Bregma).

Figura 1 - Sítios de injeção de traçador anterógrado BDA na área incerto-hipotalâmica (IH_y). Representação esquemática dos sítios de injeção de BDA na IH_y organizados no sentido rostro-caudal. Para abreviações, veja a lista.

Figura 2 - Sítio de injeção de traçador anterógrado dextrana amina biotinilada (BDA) na área incerto-hipotalâmica. A, fotomicrografia de fluorescência com filtro de luz azul mostrando o sítio de injeção de BDA do caso SD1619; B, fotomicrografia de fluorescência com filtro de luz verde (mesmo campo de A) mostrando a distribuição de neurônios MCH-ir. Barra: 200 μ m. Para abreviações, veja lista.

5.2.2 Distribuição das projeções da IHy (caso SD1619)

As eferências da IHy, observadas no caso SD1619, indicam que essa região apresenta suas projeções principalmente ipsilaterais, embora também sejam encontradas fibras contralaterais, em pequena quantidade, em algumas regiões. Existem projeções ascendentes e descendentes. As principais projeções observadas nesse caso, destacadas pela sua densidade de marcação absoluta ou relativa à marcação descrita em ratos machos (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007), estão ilustradas na figura 3 e 4 e incluem a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo periventricular anteroventral, o núcleo periventricular do hipotálamo, o núcleo pré-óptico medial, a área hipotalâmica anterior e o núcleo arqueado.

Essas projeções se organizam em um feixe rostródorsal e um feixe de fibras ascendente e descendente caminhando pela zona periventricular.

Um feixe de fibras dirige-se rostródorsalmente passando pelos núcleos talâmicos da linha média, onde há grande marcação no núcleo paraventricular do tálamo e no núcleo *reuniens*. As fibras continuam emitindo poucos terminais em outros núcleos da linha média (central medial e interanteromedial) até alcançar a margem dorsal do terceiro ventrículo e estria terminal. As fibras ascendem passando pela parte medial anterior do núcleo intersticial da estria terminal e núcleo medial da amígdala em direção aos núcleos da banda diagonal e núcleo septal lateral. Foi observada uma densa marcação neste núcleo ipsilateralmente e poucas fibras contralateralmente.

O feixe de fibras periventricular ascende pelo núcleo periventricular anterior, e alcança o núcleo periventricular anteroventral, o núcleo pré-óptico mediano e a área e núcleo pré-óptico medial. Observamos uma densa marcação de fibras no núcleo periventricular, no núcleo e área pré-óptico mediano e no núcleo periventricular anteroventral. As fibras periventriculares descendentes ocupam o núcleo periventricular posterior, o núcleo arqueado e a lâmina interna da eminência mediana, onde observamos moderada marcação. Parte das fibras contornam o fórnice medialmente e lateralmente em direção ao hipotálamo medial e lateral.

A zona medial do hipotálamo apresenta uma marcação intensa na área hipotalâmica anterior e observamos uma quantidade de fibras moderada no núcleo ventromedial e dorsomedial, encontramos marcação moderada no núcleo tuberomamilar dorsal e poucas fibras no núcleo premamilar dorsal. Na zona lateral do hipotálamo, observamos a presença de

uma grande quantidade de fibras na área pré-óptica lateral, na área hipotalâmica lateral e posterior e uma pequena quantidade de fibras na região perifornical.

Uma grande quantidade de fibras penetra no núcleo pré-comissural e quantidade moderada de fibras continua caudalmente e distribuindo-se na substância cinzenta periaquedutal, especialmente suas partes dorsolateral e dorsomedial. Somente neste caso e no SD1531 encontram-se raras fibras terminando no núcleo dorsal da rafe e núcleo gigantocelular e apenas nesse animal foram observadas fibras terminado no núcleo Edinger-Westphal e núcleo Darkschewitsch.

A tabela 1 lista os locais apresentando fibras e terminais marcados pelo traçador anterógrado no caso SD1619 e sua respectiva intensidade de marcação.

Tabela 1- Distribuição das eferências da IHy. Densidade relativa de fibras e terminais anterogradamente marcados no encéfalo do rato (caso SD1619) ipsilateralmente e contralateralmente à injeção de BDA na IHy. A densidade é descrita como -, ausente; -/+, rara ou inconsistente; +, pequena; ++, moderada; +++, grande; +++++, muito grande.

	Ipsilateral	Contralateral
<i>PROSENCÉFALO</i>		
<i>Amígdala</i>		
N.medial anterodorsal	++	-
N.medial anteroventral	++	-
<i>Região septal</i>		
N.lateral		
Parte intermédia	++++	+
Parte ventral	++	-/+
N. intersticial da estria terminal		
Parte medial anterior	+++	-
Parte medial ventral	++	-
Parte lateral ventral	++	-
Parte lateral intermédio	++	-
Parte lateral posterior	++	-
Parte lateral	++	-
N. septofimbrial	++	-
N. da banda diagonal		
Vertical	++	-
Horizontal	++	-
<i>Núcleos da base</i>		
N. Accumbens		
Shell	++	-/+
<i>Tálamo</i>		
N. habenular lateral, parte medial	+	-
Grupo da linha média		
N. paraventricular	+++	-
N. reuniens	+++	-
N. central medial	+	-
N. interanteromedial	+	-
<i>Subtálamo</i>		
Zona incerta	+	-
<i>Hipotálamo</i>		
<i>Zona periventricular</i>		
N. pré-óptico mediano	+++	+
N. periventricular anteroventral	++++	+
N. periventricular	++++	+
N. arqueado	++	-/+
N. supraquiasmático	+	-/+
N. supraóptico	+	-
N. paraventricular, parte parvocelular	++	-/+
Eminência mediana, lâmina interna	++	-/+
<i>Zona medial</i>		
Área pré-óptica medial	+++	-

N. pré-óptico medial	+++	-
Área hipotalâmica anterior	++++	+
N. ventromedial	++	+
N. dorsomedial	++	+
N. premamilar, parte dorsal	+	-
N. premamilar, parte ventral	-/+	-
N. tuberomamilar dorsal	++	-
<i>Zona lateral</i>		
Área pré-óptica lateral	+++	-/+
Área hipotalâmica lateral	+++	+
Área hipotalâmica posterior	+++	+
Região perifornical	+	-
TRONCO ENCEFÁLICO		
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>		
N. pré-comissural	+++	-
Substância cinzenta periaquedutal		
Coluna dorsomedial	++	+
Coluna dorsolateral	++	+
Coluna lateral	+	+
N. Edinger-Westphal	-/+	-
N. Darkschewitsch	-/+	-
<i>Formação reticular</i>		
N. dorsal da rafe	-/+	-
N. gigantocelular	-/+	-

Figura 3 - Principais projeções da área incerto-hipotalâmica (IH_{Hy}). Fotomicrografia de campo escuro mostrando fibras e terminais anterogradamente marcados pelo traçador dextrana amina biotinilada (BDA) após injeção na IH_{Hy} (caso SD1619). A, sítio de injeção; B, parte intermédia do núcleo septal lateral (LSI); C, núcleo periventricular anteroventral (AVPV); D, núcleo pré-óptico medial (MPO); E, área hipotalâmica anterior (AHA); F, núcleo arqueado (Arc). Para outras abreviações, veja lista. Barra: 200 μ m.

Figura 4 (A-F) - Representação esquemática das projeções da área incerto-hipotalâmica (caso SD1619). A distribuição das fibras e terminais com BDA (linhas pretas) foi desenhada em uma série de cortes de encéfalo de rato modificados a partir do Atlas de Paxinos & Watson (2009) e organizados no sentido rostro-caudal. O círculo preto na figura F mostra o sítio de injeção localizado na IHy. Para abreviações veja lista de abreviações.

Figura 4 (G-O)

5.2.3 *Particularidades das vias de projeção do caso SD1531*

Em comparação com o caso padrão (SD1619), o caso SD1531 apresenta marcação no paracentral e núcleo interanterodorsal do tálamo, além de menor intensidade de marcação no núcleo intersticial da estria terminal e nenhuma marcação no núcleo *reuniens*, eminência mediana e no núcleo paraventricular do hipotálamo.

5.2.4 *Particularidades das vias de projeção do caso SD1504*

Em comparação com o caso padrão (SD1619), o caso SD1504 apresenta maior intensidade de marcação no núcleo e área pré-óptica medial e na coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal, além de menor intensidade de marcação no núcleo periventricular anteroventral e nenhuma marcação no núcleo *reuniens*, eminência mediana e no núcleo paraventricular do hipotálamo.

5.2.5 *Particularidades das vias de projeção do caso SD1529*

Em comparação com o caso padrão (SD1531), o caso SD1529 apresenta uma distribuição esparsa de fibras marcadas no núcleo e área pré-óptica medial e lateral, além de menor marcação no núcleo arqueado. Além disso, apenas neste caso, observa-se a presença de fibras anterogradamente marcadas no núcleo *reuniens*.

5.3 **Aferências da IHy**

5.3.1 *Locais de injeção*

Obtivemos três casos com injeção centrada na IHy injetados com traçador retrógrado FG. Os três casos obtidos (SD1546, SD1547 e SD1595) apresentam a injeção na IHy, os casos SD1546 e 1547 apresentam a injeção localizada na região média do território de células MCH-ir da IHy (-2.12 de distância do Bregma), imediatamente ventral ao trato mamilotalâmico (figuras 5 e 6). Porém, o caso SD1595 apresenta sua injeção na IHy, na região mais caudal do território de células MCH-ir da IHy (-2.56 de distância do Bregma), também imediatamente ventral ao trato mamilotalâmico.

Figura 5 - Sítios de injeção de traçador retrógrado Fluorogold (FG) na área incerto-hipotalâmica (IHy). Representação esquemática dos sítios de injeção de FG na IHy organizados no sentido rostro-caudal. Para abreviações, veja a lista.

Figura 6 - Sítio de injeção de traçador retrógrado Fluorogold (FG) na área incerto-hipotalâmica. A, fotomicrografia de fluorescência com filtro de luz ultravioleta mostrando o sítio de injeção de FG do caso SD1546; B, fotomicrografia de fluorescência com filtro de luz verde (mesmo campo de A) mostrando a distribuição de neurônios MCH-ir. Barra: 200 μ m. Para abreviações, veja a lista.

5.3.2 Distribuição das aferências da IHy (caso SD1546)

As aferências da IHy, observadas no caso SD1546, indicam que essa região apresenta aferências principalmente ipsilaterais, embora também sejam encontradas algumas marcações contralaterais, em pequena quantidade, em algumas regiões. As principais marcações observadas nesse caso estão ilustradas na figura 7 e 8 e incluem a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo paraventricular do tálamo, o núcleo pré-óptico mediano, o núcleo periventricular anteroventral, o núcleo periventricular do hipotálamo, o núcleo e a área pré-óptica medial.

Telencéfalo: A parte intermédia do núcleo septal lateral apresenta uma grande marcação, sendo observada também uma marcação moderada contralateral. Neste caso ainda encontra-se uma pequena marcação no núcleo medial da amígdala.

Diencéfalo: No hipotálamo, encontra-se uma grande marcação no núcleo pré-óptico mediano, e uma marcação moderada na área e núcleo pré-óptico medial, núcleo periventricular, núcleo periventricular-anteroventral, núcleo hipotalâmico ventromedial, área hipotalâmica anterior e núcleo tuberomamilar dorsal. Foi também encontrada uma pequena marcação contralateral no núcleo pré-óptico medial e área hipotalâmica anterior. Há pouca marcação no núcleo pré-mamilar ventral e na área hipotalâmica posterior, além de uma rara marcação no núcleo arqueado. No tálamo, encontra-se uma moderada marcação no núcleo paraventricular do tálamo anterior e uma marcação moderada em sua porção posterior.

Tronco encefálico: Na substância cinzenta periaquedutal, encontra-se discreta marcação em sua coluna dorsolateral e lateral. Na região da formação reticular encontra-se uma rara marcação no núcleo dorsal da rafe.

A tabela 2 lista os locais apresentando marcação pelo traçador retrógrado no caso SD1546 e sua respectiva intensidade de marcação.

Tabela 2 - Distribuição das aferências da IHy. Densidade relativa de neurônios retrogradamente marcados no encéfalo do rato (caso SD1546) ipsilateralmente e contralateralmente à injeção de FG na IHy. A densidade é descrita como -, ausente; -/+, rara ou inconsistente; +, pequena; ++, moderada; +++, grande.

	Ipsilateral	Contralateral
<i>PROSENCÉFALO</i>		
<i>Amígdala</i>		
N.medial Parte anterodorsal	+	-
<i>Região septal</i>		
N.lateral Parte dorsal	-/+	-
Parte intermédia	+++	++
Parte ventral	-/+	-
<i>Tálamo</i>		
Grupo da linha média N. paraventricular	+++	-
<i>Hipotálamo</i>		
<i>Zona periventricular</i>		
N. pré-óptico mediano	+++	-
N. periventricular anteroventral	++	-
N. periventricular anterior	++	-
N. arqueado	-/+	-
N. periventricular posterior	+	-
<i>Zona medial</i>		
Área pré-óptica medial	++	-
N. pré-óptico medial	++	+
Área hipotalâmico anterior	++	+
N. ventromedial	++	-/+
N. premamilar Parte ventral	+	-
N. tuberomamilar dorsal	++	-
<i>Zona lateral</i>		
Área pré-óptica lateral	++	-
Área hipotalâmica posterior	+	-
<i>TRONCO ENCEFÁLICO</i>		
<i>Substância cinzenta periaquedutal</i>		
Substância cinzenta periaquedutal Coluna dorsolateral	-/+	-
Coluna lateral	-/+	-
<i>Formação reticular</i>		
Núcleo dorsal da rafe	-/+	-

Figura 7 - Principais aferências da área incerto-hipotalâmica (IH_{Hy}). Fotomicrografias de campo claro mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (FG) após injeção na IH_{Hy} (caso SD 1546). A, parte intermédia do núcleo septal lateral (LSI); B, núcleo pré-óptico mediano (MnPO); C, núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e núcleo pré-óptico medial (MPO); D, parte anterior do núcleo paraventricular do tálamo (PVA). Para outras abreviações, veja a lista. Barra: B, 200 μ m; A, C e D 100 μ m.

5.3.3 Particularidades do caso SD1547

Em comparação com o caso padrão (SD1546), o caso SD1547 apresenta uma discreta marcação no CA3 (hipocampo).

5.3.4 Particularidades do caso SD1594

Em comparação com o caso padrão (SD1546), o caso SD1594 apresenta uma marcação no córtex pré-límbico e córtex orbital ventral e uma menor marcação nas outras regiões descritas no caso padrão.

6 DISCUSSÃO

A área incerto-hipotalâmica (IHy) é uma região pouco estudada e poucos autores demonstram conhecer com detalhes os limites desta área. Em 1992, Bittencourt e colaboradores descreveram que a IHy apresenta células MCH-ir e em 2007, Sita e colaboradores demonstraram em seu trabalho que esta área apresenta-se fora dos limites citoarquitetônicos da ZI e então definiram sua nomenclatura para área incerto-hipotalâmica. Assim, a fim de ampliar os conhecimentos desta área, nosso objetivo com este trabalho foi demonstrar que as conexões da IHy de fêmeas podem estar envolvidas com áreas relacionadas ao controle neuroendócrino reprodutivo de fêmeas, provavelmente atuando na regulação de funções reprodutivas em estados fisiológicos específicos mediados pelo Sistema MCH, através de um estudo hodológico utilizando traçadores anterógrado e retrógrado.

6.1 Considerações metodológicas

Para o estudo das conexões da IHy utilizamos o traçador anterógrado BDA e o traçador retrógrado FG. O BDA (peso molecular 10.000) foi descrito em 1992 (BRANDT; APKARIAN, 1992; VEENMAN; REINER; HONIG, 1992) e é um dos mais utilizados traçadores anterógrados (para uma revisão veja LANCIEGO, 2011) devido a sua alta especificidade, boa captação neuronal, distribuição homogênea no trajeto das fibras, compatibilidade com diversos fixadores, e principalmente pela replicabilidade de seus resultados obtidos em diferentes animais.

Além do detalhamento das projeções obtido com o BDA, a utilização da intensificação pela prata possibilitou-nos um maior contraste na marcação e melhor visualização da marcação. Esse método é uma modificação do método de Fontana-Masson de impregnação pela prata (MASSON, 1928), o qual foi posteriormente modificado para intensificar marcações imuno-histoquímicas (WALKER et al., 1988).

O FG é um traçador retrógrado fluorescente considerado “padrão ouro” na atualidade (LANCIEGO, 2011). Além da qualidade e rapidez do transporte, destaca-se como vantagem a disponibilidade de um anticorpo comercial anti-FG, o que possibilita a amplificação da marcação e a torna definitiva, superando o problema do evanescimento dos traçadores fluorescentes.

Para localização precisa das injeções dos traçadores, optamos pela utilização de uma referência quimioarquitetônica ao invés da clássica referência citoarquitetônica. Essa técnica já foi utilizada previamente (SITA; ELIAS; BITTENCOURT, 2007) visto que a IHy carece de limites citoarquitetônicos nítidos e, de fato, é uma região definida quimicamente pela presença do MCH, o qual está amplamente colocalizado com CART (ELIAS et al., 2001; VRANG et al., 1999) e GABA (OERTEL et al., 1982). Dessa forma, utilizamos uma dupla marcação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-MCH, associada à visualização fluorescente do BDA ou do FG. A delimitação da IHy foi feita através da localização dos neurônios imunorreativos ao MCH ao invés de critérios citoarquitetônicos que estão ausentes nessa região.

Para complementação dos resultados envolvendo estudo com traçadores, é correto realizar injeções controle. Dessa forma, para fins de publicação, estão sendo preparadas injeções de FG nos principais locais de projeção da IHy. Esses resultados não fazem parte do corpo dessa dissertação.

Por fim, estudos adicionais de dupla marcação para caracterização química (Kiss, GnRH, AgRP) das conexões da IHy são necessários para auxiliar a esclarecer a função da IHy. Não obtivemos resultados satisfatórios com duplas marcações imuno-histoquímicas usando anticorpos primários disponíveis comercialmente devido à baixa titularidade desses anticorpos, aliado ao fato de que essas substâncias são rapidamente produzidas e transportadas para fora do corpo celular, dificultando a marcação imuno-histoquímica em animais normais (não-colchicinados). Portanto, a caracterização dessas conexões poderia ser feita por uma dupla marcação usando hibridização *in situ* com sondas dirigidas para o RNAm dessas substâncias. Infelizmente, o tecido produzido nesse estudo não foi preparado com cuidados para impedir a contaminação por RNases, o que impossibilita a realização de hibridização *in situ*.

6.2 Considerações funcionais

O presente estudo mostra uma análise das projeções e aferências da IHy realizado em fêmeas e apesar da IHy apresentar projeções semelhantes com as citadas por Sita, Elias e Bittencourt (2007) em machos, observamos que as projeções em fêmeas apresentam uma marcação mais densa em determinadas estruturas. Assim, para o estudo anterógrado utilizamos o BDA e observamos que as principais estruturas que a IHy se projeta em fêmeas

são a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo intersticial da estria terminal, o núcleo paraventricular do tálamo, o núcleo *reuniens*, a área pré-óptica medial, o núcleo pré-óptico medial e lateral, o núcleo pré-óptico mediano, o núcleo periventricular do hipotálamo, o núcleo periventricular anteroventral, a área hipotalâmica anterior, posterior e lateral, o núcleo ventromedial e dorsomedial do hipotálamo e o núcleo pré-comissural. Contudo, o núcleo arqueado apresenta uma moderada marcação, tornando-se relevante ressaltar esta marcação que se destaca em fêmeas e não apresenta marcação em machos. Já no estudo retrógrado da IHy, utilizamos o FG e observamos que as principais estruturas de aferências da IHy em fêmeas são a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo pré-óptico mediano e o núcleo paraventricular do tálamo. No entanto, a área e núcleo pré-óptico medial, o núcleo periventricular anteroventral, o núcleo periventricular, a área hipotalâmica anterior e posterior, o núcleo ventromedial do hipotálamo, estes apresentam neurônios retrogradamente marcados moderadamente, mas é necessário o destaque, demonstrando que há conexão recíproca.

Então, esse trabalho contribuiu para o corpo de dados relacionado à IHy no sentido de demonstrarmos que sua conectividade em fêmeas é parcialmente diferente da de machos. Além disso, mostramos que várias conexões da IHy são recíprocas. Até então não havia estudos retrógrados da IHy disponíveis na literatura.

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos de outros autores que já haviam identificado conexões das regiões descritas acima com a IHy. Na maior parte desses trabalhos a referência é feita à zona incerta rostral ou zona incerta medial mas as fotomicrografias e esquemas garantem a conexão com a IHy. Dessa forma, há relatos de projeções da IHy para o núcleo *reuniens* (HERKENHAM, 1978; MCKENNA; VERTES, 2004) e conexões recíprocas com a área hipotalâmica posterior (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; VERTES et al., 1995) e núcleo pré-comissural (CANTERAS; GOTO, 1999). A projeção dos neurônios imunorreativos ao MCH da IHy para a PAG já foi caracterizada por Elias e Bittencourt (1997).

As conexões da MPO foram previamente estudadas em machos (SIMERLY; SWANSON, 1986; SIMERLY; SWANSON, 1988), e portanto não houve destaque para as conexões com a IHy já que essa é discreta em machos. Posteriormente, Rondini et al, 2010, realizaram injeções de traçadores retrógrados e anterógrados na MPO de fêmeas e observaram que essa área conecta-se reciprocamente com a IHy. Esses resultados e nossas observações

reforçam a constatação de que a MPO é uma área sexualmente dimórfica (GORSKI et al., 1980; SIMERLY et al., 1984, 1985a, 1985b; GORSKI, 1985; SIMERLY; SWANSON, 1988).

As projeções do AVPV foram elegantemente estudadas anteriormente (GU; SIMERLY, 1997; SIMERLY, 1998), mas não há descrições de injeções de traçadores retrógrados no AVPV, em fêmeas, para confirmar as projeções aqui descritas.

Logo, observamos que a predominância de projeções da IHy em fêmeas é de fato para núcleos hipotalâmicos. Porém, também se projeta para outras estruturas que estão associados principalmente com o comportamento de defesa, como já havia sido observado em ratos machos (SITA et al., 2007), a saber: o núcleo septal lateral (que se projeta para a área hipotalâmica anterior), o núcleo intersticial da estria terminal (recebe projeção do núcleo septal lateral), o núcleo paraventricular do tálamo (que se projeta para o núcleo intersticial da estria terminal), o núcleo *reuniens* e hipotálamo posterior (que recebem projeções da área hipotalâmica anterior, pré-mamilar dorsal e ventromedial do hipotálamo), na região da zona periventricular do hipotálamo o núcleo ventromedial (recebe projeção do núcleo amigdalár basomedial) e dorsomedial do hipotálamo (que se projeta para o núcleo intersticial da estria terminal), na região do hipotálamo lateral a área pré-óptica lateral (recebe projeções do núcleo hipotalâmico anterior), área hipotalâmica lateral (se projeta para o núcleo hipotalâmico anterior, parte dorsomedial do núcleo ventromedial e região ventral do núcleo pré-mamilar dorsal) e no tronco encefálico o núcleo pré-comissural (se projeta para o núcleo hipotalâmico anterior) (ONAT et al., 2002; CANTERAS, 2002; GOTO et al., 2005).

Entretanto, focando nossas observações nas projeções observadas exclusivamente nas fêmeas, ou mais expressivas em fêmeas do que em machos, percebe-se que a IHy projeta-se predominantemente para núcleos relevantes para a regulação neuroendócrina, como a área pré-óptica medial que recebe moderada inervação e o núcleo periventricular anteroventral que apresenta uma marcação densa, sendo este núcleo considerado sexualmente dimórfico (FORGER et al., 2004; SIMERLY, 1998), podendo atuar de forma diferenciada em machos e fêmeas.

Estudos antigos já mostravam relação da IHy com o LH e o LH com o MCH. Assim, o MCH expresso na IHy, pode estar associado a mecanismos neuroendócrinos, dos quais podemos destacar a regulação da secreção de LH. Estudos demonstram que administração de MCH na IHy bloqueia a liberação de LH (MURRAY et al. 2006). Há ainda estudos em que o conteúdo de MCH na eminência mediana varia juntamente com o pico pré-ovulatório de LH no sangue (GALLARDO; CHIOCCHIO; TRAMEZZANI, 2004) e o MCH pode afetar a

secreção de LH em diversos modelos experimentais (TSUKAMURA et al, 2000; CHIOCCHIO et al, 2001; GONZALEZ et al, 1997; MURRAY et al, 2000a, 2000b, 2006).

Em um estudo de Murray e colaboradores (2006) observaram que a liberação do LH é estimulada pela administração de MCH na área pré-óptica rostral e medial, mas não na IHy em modelo de ratos com baixa concentração do LH circulante. O mesmo tratamento bloqueou a onda de liberação do LH quando administrados na IHy de um modelo de rato e não teve nenhum efeito quando administrado na área pré-óptica rostral ou medial. Além disso, o MCH injetado na área pré-óptica medial aumenta a ansiedade e a receptividade sexual da fêmea e ao ser injetado no núcleo ventromedial do hipotálamo também aumenta a receptividade sexual da fêmea (GONZALEZ et al., 1996; GONZALEZ et al., 1998)

A IHy conecta-se reciprocamente, apenas em fêmeas, tanto para o AVPV quanto para a área e núcleo pré-óptico medial. O AVPV é descrito como um núcleo-chave para o surgimento do pico pré-ovulatório do LH (WIEGAND, 1982; TERASAWA, 1982; LE et al., 1999), e parece estar em uma posição que integra diversos estímulos e regula o impacto de um variedade de funções dos sistemas neurais distintos na secreção de gonadotropina (SIMERLY, 1998). Alguns autores mostraram que mais de 80% dos neurônios que expressam Fos no AVPV co-expressam *Kiss1* (SMITH et al., 2006) e a kisspeptina produzida pelos neurônios do AVPV ativam os neurônios GnRH da área pré-óptica medial diretamente (DUMALSKA et al., 2008; HAN et al., 2005; PIELECKA-FORTUNA et al., 2008) de modo a promover a ovulação. As kisspeptinas têm sido consideradas essenciais no controle neuroendócrino da ovulação (para uma revisão, veja OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009; TENA-SEMPERE, 2010). Entretanto, estudos recentes utilizando modelos genéticos múltiplos já haviam sugerido que as kisspeptinas não exercem um efeito exclusivo no controle da ovulação (DONATO et al., 2011). Nossos resultados fornecem um substrato anatômico para que as células MCH-ir da IHy também atuam como sistema alternativo à kisspeptina na regulação do controle da ovulação. Contudo, estudos funcionais adicionais são necessários para comprovar essa hipótese.

Dados não publicados do laboratório mostram um aumento da expressão do RNAm do ppMCH durante o proestro e estro sugerindo uma regulação do MCH pelo estradiol, como já sugerido por Murray e colaboradores (2000b) em ratas ovariectomizadas tratadas com hormônios. Contudo, não há descrição de receptores de estradiol na IHy (SHUGHRUE et al. 1997) ou mesmo em células MCH-ir. Assim, a influência do estradiol sobre a IHy deve

ocorrer de maneira indireta, através de suas conexões com a área pré-óptica medial e o núcleo periventricular do hipotálamo, por exemplo.

Por quanto nossos resultados demonstram uma diferença na densidade das marcações entre machos e fêmeas, apresentando uma densidade mais evidente em fêmeas na área pré-óptica medial, no núcleo pré-óptico medial, no núcleo pré-óptico mediano, no núcleo periventricular do hipotálamo, no núcleo periventricular anteroventral, na área hipotalâmica anterior, no núcleo arqueado e na lâmina interna da eminência mediana do que as descritas em machos. Além disso, nossos resultados das aferências da IHy demonstram que suas conexões apresentadas em fêmeas são recíprocas, nos levando a sugerir que esta diferença esteja ligando a IHy à regulação neuroendócrina.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos com o estudo hodológico, concluímos que:

1. As principais projeções da IHy são: a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo intersticial da estria terminal, o núcleo paraventricular do tálamo, núcleo reuniens, a área pré-óptica medial, o núcleo pré-óptico medial e lateral, o núcleo pré-óptico mediano, o núcleo periventricular do hipotálamo, o núcleo periventricular anteroventral, a área hipotalâmica anterior, posterior e lateral, o núcleo ventromedial e dorsomedial e o núcleo pré-comissural.
2. As principais aferências da IHy são: a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo pré-óptico mediano e o núcleo paraventricular do tálamo.
3. Várias regiões conectam-se de maneira expressiva reciprocamente com a IHy, a saber, a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo paraventricular do tálamo, o núcleo pré-óptico mediano, a área e núcleo pré-óptico medial, o núcleo periventricular anteroventral, o núcleo periventricular, a área hipotalâmica anterior e posterior e o núcleo ventromedial do hipotálamo.
4. As conexões da IHy em fêmeas diferem das previamente descritas em machos, apresentando uma densidade mais evidente de conexões, em fêmeas, com áreas relacionadas com o controle neuroendócrino. Esse fato sugere que esta área esteja relacionada com o controle neuroendócrino.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAMSON, E. E.; MOORE, R. Y. The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. **Brain Res.**, v. 889, n. 1-2, p. 1-22, 2001.
- ATTADEMO, A. M.; RONDINI, T. A.; RODRIGUES, B. C.; BITTENCOURT, J. C.; CELIS, M. E.; ELIAS, C. F. Neuropeptide Glutamic Acid-Isoleucine May Induce Luteinizing Hormone Secretion via Multiple Pathways. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 5-6, p. 313-324, 2006.
- ATTADEMO, A. M.; SANCHEZ-BORZONE, M.; LASAGA, M.; CELIS, M. E. Intracerebroventricular injection of neuropeptide EI increases serum LH in male and female rats. **Peptides**, v. 25, n. 11, p. 1995-1999, 2004.
- BITTENCOURT, J.; CELIS, M. E. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1441-1450, 2008.
- BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracers. **Brain Res.**, v. 805, n. 1-2, p. 1-19, 1998.
- BITTENCOURT, J. C.; PRESSE, F.; ARIAS, C.; PETO, C.; VAUGHAN, J.; NAHON, J. L.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. **J. Comp. Neurol.**, v. 319, n. 2, p. 218-245, 1992.
- BOROWSKY, B.; DURKIN, M. M.; OGOZALEK, K.; MARZABADI, M. R.; DELEON, J.; LAGU, B.; HEURICH, R.; LICHTBLAU, H.; SHAPOSHNIK, Z.; DANIEWSKA, I.; BLACKBURN, T. P.; BRANCHEK, T. A.; GERALD, C.; VAYSSE, P. J.; FORRAY, C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nat. Med.**, v. 8, n. 8, p. 825-830, 2002.
- BRANDT, H. M.; APKARIAN, A. V. Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies In rat and monkey. **J. Neurosci. Methods**, v. 45, n. 1-2, p. 35-40, 1992.
- CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Connections of the precommissural nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 408, n. 1, p. 23-45, 1999.
- CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, n. 3, p. 481-491, 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CASATTI, C. A.; ELIAS, C. F.; SITA, L. V.; FRIGO, L.; FURLANI, V. C.; BAUER, J. A.; BITTENCOURT, J. C. Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. **Neuroscience**, v. 115, n. 3, p. 899-915, 2002.

CHIOCCHIO, S. R.; GALLARDO, M. G.; LOUZAN, P.; GUTNISKY, V.; TRAMEZZANI, J. H. Melanin-concentrating hormone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropins in the female rat acting at both median eminence and pituitary levels. **Biol. Reprod.**, v. 64, n. 5, p.1466-1472, 2001.

CLARKSON, J.; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; MORENO, A. S.; COLLEDGE, W. H.; HERBISON, A. E. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 35, p. 8691-8697, 2008.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5817-5825, 2006.

CVETKOVIC, V.; BRISCHOUX, F.; GRIFFOND, B.; BERNARD, G.; JACQUEMARD, C.; FELLMANN, D.; RISOLD, P. Y. Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons supplying both cortical and neuroendocrine projections. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 31-35, 2003.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.**, v. 62, p. 1-55, 1964. Suppl. 232.

DONATO, J. JR.; CRAVO, R. M.; FRAZAO, R.; GAUTRON, L.; SCOTT, M. M.; LACHEY, J.; CASTRO, I. A.; MARGATHO, L. O.; LEE, S.; LEE, C.; RICHARDSON, J. A.; FRIEDMAN, J.; CHUA, S. JR.; COPPARI, R.; ZIGMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 1, p. 355-368, 2011.

DONATO, J. JR.; SILVA, R. J.; SITA, L. V.; LEE, S.; LEE, C.; LACCHINI, S.; BITTENCOURT, J. C.; FRANCI, C. R.; CANTERAS, N. S.; ELIAS, C. F. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 16, p. 5240-5250, 2009.

DUMALSKA, I.; WU, M.; MOROZOVA, E.; LIU, R.; VAN DEN POL, A.; ALREJA, M. Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 32, p. 8003-8013, 2008.

ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter. **Brain. Res.**, v. 755, n. 2, p. 255-271, 1997.

ELIAS, C. F.; FRIGO, L.; BITTENCOURT, J. C. Origins of melanin-concentrating hormone immunoreactive projections to the motor cortex and pedunculo-pontine nucleus. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 23, n. 2, p. 1484, 1997.

ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter. **Brain. Res.**, v. 755, n. 2, p. 255-271, 1997.

ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S.; KUCHAR, M.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 432, n. 1, p. 1-19, 2001.

ELIAS, C. F.; SITA, L. V.; ZAMBON, B. K.; OLIVEIRA, E. R.; VASCONCELOS, L. A.; BITTENCOURT, J. C. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 35, n. 2, p. 188-201, 2008.

FORGER, N. G.; ROSEN, G. J.; WATERS, E. M.; JACOB, D.; SIMERLY, R. B.; VRIEG, G. J. Deletion of Bax eliminates sex differences in the mouse forebrain. **PNAS Neurosci.**, v. 101, n. 37, p. 13666-13671, 2004.

GAHR, M. How should brain nuclei be delineated? Consequences for developmental mechanisms and for correlations of area size, neuron numbers and functions of brain nuclei. **Trends. Neurosci.**, v. 20, n. 2, p. 58-62, 1997.

GALLARDO, M. G.; CHIOCCHIO, S. R.; TRAMEZZANI, J. H. Changes of melanin-concentrating hormone related to LHRH release in the median eminence of rats. **Brain. Res.**, v. 1030, n. 1, p. 152-158, 2004.

GAO, X. B.; VAN DEN POL, A. N. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. **J. Physiol.**, v. 533, pt. 1, p. 237-252, 2001.

GONZALEZ, M. I.; BAKER, B. I.; WILSON, C. A. Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. **Neuroendocrinology**, v. 66 n. 4, p. 254-262, 1997.

GORSKI, R.A. Sexual dimorphisms of the brain. **J. Anim. Sci.**, v. 61, p. 38-61, 1985. Supplement 3.

GORSKI, R. A.; HARLAN, R. E.; JACOBSON, C. D.; SHRYNE, J. E.; SOUTHAM, A. M. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 193, p. 529-539, 1980.

GOTO, M.; CANTERAS, N. S.; BURNS, G.; SWANSON, L. W. Projections from the subfornical region of the lateral hypothalamic area. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 3, p. 412-438, 2005.

GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 4-9, 2009.

GU, G.B.; SIMERLY, R.B. Projections of the Sexually Dimorphic Anteroventral Periventricular Nucleus in the Female Rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 384, p. 142-164, 1997.

HAISENLEDER, D. J.; DALKIN, A. C.; MARSHALL, J. C. Regulation of gonadotropin gene expression. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D.; editors. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press; p. 1793–1813, 1994.

HAN, S. K.; GOTTSCH, M. L.; LEE, K. J.; POPA, S. M.; SMITH, J. T.; JAKAWICH, S. K.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A.; HERBISON, A. E. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 49, p. 11349-11356, 2005.

HERKENHAM, M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 177, n. 4, p. 589-610, 1978.

HOFFMAN, G. E.; LE, W. W.; SITA, L. V. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. **Curr. Protoc. Neurosci.**; Chapter 2: Unit 2 12, 2008.

HÖKFELT, T.; MARTENSSON, R.; BJÖRKLUND, A.; KLEINAU, S.; GOLDSTEIN, M. Distributional maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; editors. **Handbook of Chemical Neuroanatomy**, Amsterdam: Elsevier; p. 277-379, 1984.

IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v.80, n. 4, p. 264-272, 2004.

KALIA, V.; FENSKE, C.; HOLE, D. R.; WILSON, C. A. Effect of gonadal steroids and gamma-aminobutyric acid on LH release and dopamine expression and activity in the zona incerta in rats. **J. Reprod. Fertil.**, v. 117, n. 1, p. 189-197, 1999.

KAWANA, E.; WATANABE, K. A cytoarchitectonic study of zona incerta in the rat. **J. Hirnforsch.**, v. 22, n. 5, p. 535-541, 1981.

KNOLLEMA, S.; BROWN, E. R.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats. **J. Neuroendocrinol.**, v. 4, n. 6, p. 709-717, 1992.

LAGOS, P.; TORTEROLO, P.; JANTOS, H.; CHASE, M. H.; MONTI, J. M. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. **Brain Res.**, v. 1265, p.103-110, 2009.

LANCIEGO, J. L.; WOUTERLOOD, F. G. A half century of experimental neuroanatomical tracing. **J. Chem. Neuroanat.**, V. 42, n. 3, p. 157-183, 2011.

LE, W. W.; BERGHORN, K. A.; RASSNICK, S.; HOFFMAN, G. E. Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. **Endocrinology**, v. 140, p. 510-519, 1999.

MACKENZIE, F. J.; HUNTER, A. J.; DALY, C.; WILSON, C. A. Evidence that the dopaminergic incerto-hypothalamic tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotrophin release. **Neuroendocrinology**, v. 39, n. 4, p. 289-295, 1984.

MACKENZIE, F. J.; JAMES, M. D.; WILSON, C. A. Changes in dopamine activity in the zona incerta (ZI) over the rat oestrous cycle and the effect of lesions of the ZI on cyclicity: further evidence that the incerto-hypothalamic tract has a stimulatory role in the control of LH release. **Brain Res.**, v. 444, n. 1, p. 75-83, 1988.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MASSON, P. Carcinoids (Argentaffin-cell tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa. **Am .J. Pathol.**, v. 4, n. 3, p. 181-211, 1928.

MCBRIDE, R. B.; BECKWITH, B. E.; SWENSON, R. R.; SAWYER, T. K.; HADLEY, M. E.; MATSUNAGA, T. O.; HRUBY, V. J. The actions of melanin-concentrating hormone (MCH) on passive avoidance in rats: a preliminary study. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 757-759, 1994.

MCKENNA, J. T.; VERTES, R. P. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 480, n. 2, p. 115-142, 2004.

MITROFANIS, J. Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta. **Neuroscience**, v. 130, n. 1, p. 1-15, 2005.

MONZON, M. E.; DE BARIOGLIO, S. R. Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. **Physiol. Behav.**, v. 67, n. 5, p. 813-817, 1999.

MONZON, M. E.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; DE BARIOGLIO, S. R. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. **Peptides**, v. 20, n. 12, p. 1517-1519, 1999.

MURRAY, J. F.; ADAN, R. A.; WALKER, R.; BAKER, B. I.; THODY, A. J.; NIJENHUIS, W. A.; YUKITAKE, J.; WILSON, C. A. Melanin-concentrating hormone, melanocortin receptors and regulation of luteinizing hormone release. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, n. 3, p. 217-223, 2000a.

MURRAY, J. F.; BAKER, B. I.; LEVY, A.; WILSON, C. A. The influence of gonadal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, n. 1, p. 53-59, 2000b.

MURRAY, J. F.; HAHN, J. D.; KENNEDY, A. R.; SMALL, C. J.; BLOOM, S. R.; HASKELL-LUEVANO, C.; COEN, C. W.; WILSON, C. A. Evidence for a stimulatory action of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release involving MCH1 and melanocortin-5 receptors. **J. Neuroendocrinol.**, v. 18, n. 3, p. 157-167, 2006.

NAKAMURA, S.; TSUMORI, T.; YOKOTA, S.; OKA, T.; YASUI, Y. Amygdaloid axons innervate melanin-concentrating hormone- and orexin-containing neurons in the mouse lateral hypothalamus. **Brain Res.**, 2009.

National Research Council of the National Academy of Sciences. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. Washington: The National Academies Press, 2003.

OAKLEY, A. E.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin signaling in the brain. **Endocr. Rev.**, v. 30, n. 6, p. 713-743, 2009.

OERTEL, W. H.; TAPPAZ, M. L.; BEROD, A.; MUGNAINI, E. Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. **Brain Res. Bull.**, v. 9, n. 1-6, p. 463-474, 1982.

ONAT, F. Y.; AKER, R.; SEHIRLI, U.; SAN, T.; CAVDAR, S. Connections of the dorsomedial hypothalamic nucleus from the forebrain structures in the rat. **Cells Tissues Organs.**, v. 172, n. 1, p. 48-52, 2002.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1998.

PEREIRA-DA-SILVA, M.; TORSONI, M. A.; NOURANI, H. V.; AUGUSTO, V. D.; SOUZA, C. T.; GASPARETTI, A. L.; CARVALHEIRA, J. B.; VENTRUCCI, G.; MARCONDES, M. C.; CRUZ-NETO, A. P.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 4831-4840, 2003.

PIELECKA-FORTUNA, J.; CHU, Z.; MOENTER, S. M. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1979-1986, 2008.

QU, D.; LUDWIG, D. S.; GAMMELTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; MATHES, W. F.; PRZYPEK, R.; KANAREK, R.; MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v. 380, n. 6571, p. 243-247, 1996.

RONDINI, T. A.; DE CRUDIS RODRIGUES, B.; DE OLIVEIRA, A. P.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Melanin-concentrating hormone is expressed in the laterodorsal tegmental nucleus only in female rats. **Brain Res. Bull.**, v. 74, n. 1-3, p. 21-28, 2007.

RONDINI, T. A.; DONATO, J. JR.; RODRIGUES, B. DE C.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 39, n. 1, p. 51-62, 2010.

ROSSI, M.; CHOI, S. J.; O'SHEA, D.; MIYOSHI, T.; GHATEL, M. A.; BLOOM, S. R. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 351-355, 1997.

SANGHERA, M. K.; ANSELMO-FRANCI, J.; MCCANN, S. M. Effect of medial zona incerta lesions on the ovulatory surge of gonadotrophins and prolactin in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 54, n. 5, p. 433-438, 1991.

SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO, J. S. JR.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B.; CROWLEY, W. F. JR.; APARICIO, S. A.; COLLEDGE, W. H. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, n. 17, p. 1614-1627, 2003.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat Central Nervous System. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 388, p. 507-525, 1997.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; GORSKI, R. A. Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 225, p. 151-166, 1984.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; GORSKI, R. A. The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. **Brain Res.**, v. 330, p. 55-64, 1985a.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; HANDA, R. J.; GORSKI, R. A. Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. **Neuroendocrinology**, v. 40, p. 501-510, 1985b.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 246, p. 312-342, 1986.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 270, p. 209-242, 1988.

SIMERLY, R.B. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. **Behav. Brain Res.**, v. 92, n. 2, p. 195-203, 1998.

SITA, L. V.; BITTENCOURT, J. C. Imunoistoquímica. In: BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F.; editors. **Métodos em Neurociência**, São Paulo: Roca, p. 57-79, 2007.

SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. **Brain Res.**, v. 970, n. 1-2, p. 232-237, 2003.

SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience**, v. 148, n. 4, p. 949-969, 2007.

SITA, L. V.; GONÇALVES, L. F. Z.; MARTINEZ, R. C. R.; CARVALHO-NETTO, E. F.; BITTENCOURT, J. C.; CANTERAS, N. S. Does the incerto-hypothalamic area have a role in unconditioned defensive behavior? em preparação.

SMITH, J. T.; POPA, S. M.; CLIFTON, D. K.; HOFFMAN, G. E.; STEINER, R. A. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. **J. Neurosci.**, v.26, p.6687-6694, 2006.

SWANSON, L.W. Brain maps: structure of the rat brain. Amsterdam: **Elsevier**, 2004.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7. p. 1263-1271, 1995.

TENA-SEMPERE, M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 314, n. 2, p. 164-169, 2010.

TORTEROLO, P.; SAMPOGNA, S.; CHASE, M. H. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. **Brain Res.**, v. 1268, p. 76-87. 2009.

TSUKAMURA, H.; THOMPSON, R. C.; TSUKAHARA, S.; OHKURA, S.; MAEKAWA, F.; MORIYAMA, R.; NIWA, Y.; FOSTER, D. L.; MAEDA, K. Intracerebroventricular administration of melanin-concentrating hormone suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the female rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, n. 6, p. 529-534, 2000.

VEENMAN, C. L.; REINER, A.; HONIG, M. G. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. **J. Neurosci. Methods**, v. 41, n. 3, p. 239-254, 1992.

VERRET, L.; GOUTAGNY, R.; FORT, P.; CAGNON, L.; SALVERT, D.; LEGER, L.; BOISSARD, R.; SALIN, P.; PEYRON, C.; LUPPI, P. H. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. **BMC Neurosci.**, v. 4, n. 1, p. 19, 2003.

VERTES, R. P.; CRANE, A. M.; COLOM, L. V.; BLAND, B. H. Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA- L analysis in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 359, n. 1, p. 90-116, 1995.

VRANG, N.; LARSEN, P. J.; CLAUSEN, J. T.; KRISTENSEN, P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 10, p. RC5, 1999.

WAGNER, C. K.; EATON, M. J.; MOORE, K. E.; LOOKINGLAND, K. J. Efferent projections from the region of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. **Brain Res.**, v. 677, n. 2, p. 229-237, 1995.

WALKER, L. C.; KITT, C. A.; CORK, L. C.; STRUBLE, R. G.; DELLOVADE, T. L.; PRICE, D. L. Multiple transmitter systems contribute neurites to individual senile plaques. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 47, n. 2, p. 138-144, 1988.

WIEGAND, S. J.; TERASAWA, E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 34, p. 395-404, 1982.

WILLIAMSON-HUGHES, P. S.; GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Melanin concentrating hormone (MCH): a novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. **Brain Res.**, v. 1041, n. 2, p. 117-124, 2005.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.