JOSÉ DONATO JUNIOR

**ESTUDO DA AÇÃO DO NÚCLEO PRÉ-MAMILAR
VENTRAL DE RATOS NO CONTROLE REPRODUTIVO
E EM RESPOSTAS À EXPOSIÇÃO FEROMONAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências Morfofuncionais.

São Paulo

2008

JOSÉ DONATO JUNIOR

**ESTUDO DA AÇÃO DO NÚCLEO PRÉ-MAMILAR
VENTRAL DE RATOS NO CONTROLE REPRODUTIVO E
EM RESPOSTAS À EXPOSIÇÃO FEROMONAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências Morfofuncionais.

Área de Concentração:
Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Carol Fuzeti
Elias

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Donato Junior, Jose.

Estudo da ação do núcleo pré-mamilar ventral de ratos no controle reprodutivo e em respostas à exposição feromonal / Jose Donato Junior. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Carol Fuzeti Elias.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Comportamentos motivados.

Versão do título para o inglês: The role of the ventral premammillary nucleus of rats in the reproductive control and in responses to pheromonal stimulation.

Descritores: 1. Reprodução 2. Neuroendocrinologia 3. Feromônios 4. Leptina 5. Comportamento reprodutivo animal 6. Neuroanatomia I. Elias, Carol Fuzeti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós- Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB156/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jose Donato Junior.

Título da Tese: Estudo da ação do núcleo pré-mamilar ventral de ratos no controle reprodutivo e em respostas à exposição feromonal.

Orientador(a): Carol Fuzeti Elias.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Considero-me afortunado por saber que posso contar com o apoio de muitas pessoas especiais, sejam elas familiares ou amigos. Mas, tenho certeza que não há outras pessoas, senão as duas mais importantes na minha vida, a quem esta tese deve ser dedicada. Sem a ajuda, o apoio incondicional e o companheirismo de minha mãe e de minha (mu) tutuca todo esse trabalho não teria valido a pena.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho tem muitos co-autores. Sei que algumas palavras não vão de fato mostrar o quanto que cada uma dessas pessoas contribuiu para o desenvolvimento desta tese, mas gostaria de salientar que guardo comigo a prazerosa lembrança da convivência e do apoio recebido pelas tantas pessoas que fizeram deste trabalho realidade.

Em primeiro lugar, agradeço às pessoas diretamente envolvidas com seu desenvolvimento. Muito obrigado à minha orientadora, Carol, pelas oportunidades, por seu voto de confiança, orientação e paciência. Sua vontade de trabalhar servirá de exemplo e fonte de inspiração. Também agradeço ao Newton e ao Jackson pelo formidável apoio ao projeto. Jackson, ótimas lembranças do *Neuroscience* 2007! Newton, e aquelas cervejas?! Aliás, mais uma vez obrigado pela monitoria na disciplina de neuroanatomia em 2006! Outras três pessoas especiais para o projeto foram a Renatinha (Juliana) pelo grande suporte na parte experimental (boa sorte em sua carreira científica que está começando), Amanda por toda ajuda e amizade e Luciane pelo aprendizado e convivência dentro do laboratório.

Prazerosos momentos também foram proporcionados pelo convívio com os antigos e recentes companheiros de laboratório. Obrigado pelo apoio de Judney, Tati, Ed, Bruno, Marcelo, Aline, Suzana, Izabel, Paulão, Luciana (Vasconcelos), Jô, André, Carlos, Fernando, Viviane e Luiz (Bigode).

Tenho grande dívida para com os alunos e colaboradores do laboratório do Prof. Newton por toda ajuda recebida. Agradeço à Marina, Simone, Raquel, Eduardo, Isadora, Wagner e Flávia. Dedico um agradecimento especial à Sandra e à Márcia por toda ajuda e amizade.

Este trabalho foi realizado com a colaboração de diversas pessoas. Agradeço toda ajuda prestada e pela colaboração dos professores Luciano Felício, Celso Franci, Silvia Lacchini, Maria Luiza e Maria Inês. Também agradeço às diversas pessoas que colaboraram indiretamente, Patrícia (secretária), Cristiane, Celso e a todos os técnicos do bloco didático da anatomia durante as monitorias de graduação. Sou grato também à Martinha pela ajuda nas análises histológicas, ao Prof. Carlos Winter e à Ivone Fonseca.

Sem dúvida, entre as pessoas que mais colaboraram com esse trabalho estão os funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia. Sou muito grato ao Renivaldo, Fábio, Luciana, Rodrigo e Ricardo.

Agradeço aos bons momentos de convívio com todos os demais funcionários, professores e colegas de departamento, bem como aos companheiros das diversas disciplinas e cursos realizados no período de doutorado.

Também agradeço às diversas pessoas com quem tenho recentemente trabalhado no estágio na University of Texas Southwestern Medical Center em Dallas. Sei que a maioria dessas pessoas não entende português (tinha que ter uma brasileira entre elas!), mas sou grato por toda ajuda recebida por Charlotte, Michelle, Jason, Mike, Syann, Jennifer, Jeff, Jari, Joel, Kevin, Claudia, Roberto, Giorgio, Lannette e Nancy.

Tenho imensa gratidão pelo extraordinário apoio recebido por toda minha família. Esse apoio permitiu que eu chegasse até onde estou. Afinal, todos que fazem pós-graduação sabem das dificuldades enfrentadas (conforme o provérbio: rapadura é doce, mas não é mole não)! Dedico um agradecimento especial ao Guga, não só pela amizade, mas também pela montagem da tese durante minha ausência do país. Que sua carreira científica seja muito frutífera. Agradeço à minha querida Renata (Frazão) pela ajuda nos experimentos de canulação, nas fotomicrografias e, principalmente, por estar ao meu lado. André (Leite Marchi), obrigado pela amizade durante todos esses anos dividindo apartamento. Embora o consumo de álcool provoque lapsos de memória, não esqueci dos companheiros de buteco. Um grande abraço! Nada como uma cervejinha no final do dia para recarregar as baterias para outro dia de trabalho duro. Justamente por esse motivo, se minha memória falhou ao esquecer de mencionar alguém que também colaborou com o desenvolvimento deste trabalho, por favor, me perdoe.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na forma de bolsa de estudo (processo número: 05/58997-4) e por meio de verbas de Apoio à Pesquisa. Durante o período de estágio nos Estados Unidos também recebi bolsa de estudo da University of Texas Southwestern Medical Center.

With ordinary talents and extraordinary perseverance, all things are attainable

Sir Thomas Fowell Buxton (1786–1845)

RESUMO

Donato Jr J. Estudo da ação do núcleo pré-mamilar ventral de ratos no controle reprodutivo e em respostas à exposição feromonal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a relação do núcleo pré-mamilar ventral (PMV): 1) na regulação do sistema reprodutivo em fêmeas, 2) como mediador dos efeitos da leptina e 3) na resposta à estimulação feromonal. Para tanto, induzimos lesão bilateral do PMV em ratas. Foi observado que a lesão do PMV promove: alteração no ciclo estral e da histologia ovariana; redução dos níveis de estradiol e LH; e supressão de vias neurais que controlam o eixo reprodutivo. Além disso, a lesão do PMV impediu que a administração central de leptina induzisse secreção de LH durante o jejum. Em outros experimentos, realizados em ratos machos, verificou-se que neurônios que sintetizam óxido nítrico no PMV e no núcleo medial da amígdala são ativados em resposta ao odor de conspecíficos, em especial o de fêmeas. Assim, foi demonstrado que o PMV exerce papel relevante na regulação do sistema reprodutivo e media a ação estimulatória da leptina na secreção do LH. Além disso, o PMV faz parte do circuito neural relacionado com a resposta aos feromônios.

Palavras-chave: Reprodução; Neuroendocrinologia; Feromônios; Leptina; Comportamento reprodutivo animal; Neuroanatomia.

ABSTRACT

Donato Jr J. The role of the ventral premammillary nucleus of rats in the reproductive control and in responses to pheromonal stimulation [Ph. D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The objective of this study was to assess the role played by the ventral premammillary nucleus (PMV): 1) in the regulation of the female reproductive system, 2) as a mediator of the effects of leptin and 3) in response to pheromonal stimulation. For this purpose, we produced bilateral PMV lesions in female rats. We observed that PMV lesion: disrupted the estrous cycle and altered the number of ovarian antral follicles; reduced the estradiol and LH levels; and suppressed neural pathways that control the reproductive axis. We found that lesions of the PMV blocked leptin stimulation of LH secretion during fasting. In another experiment using male rats, we showed that nitric oxide synthesizing neurons in the PMV and medial nucleus of amygdala are activated by conspecific odors, especially female odors. Thus, we showed that PMV plays an important role in the control of female's reproductive system and mediates the stimulatory effects of leptin on LH secretion. Also, PMV is part of the neural circuitry related to pheromonal responses.

Keywords: Reproduction; Neuroendocrinology; Pheromones; Leptin; Animal reproductive behavior; Neuroanatomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquemas que ilustram a localização neuroanatômica do núcleo pré-mamilar ventral (PMV) no encéfalo de ratos.....	20
Figura 2. Esquema que ilustra simplificadaamente os principais mecanismos neuroendócrinos que controlam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.....	22
Figura 3. Dinâmica das concentrações plasmáticas dos hormônios progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH).	29
Figura 4. Consumo médio de ração dos animais controle ($n = 6$) e dos animais com lesão do núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$).....	30
Figura 5. Fotomicrografias de campo claro mostrando a citoarquitetura do núcleo pré-mamilar ventral (PMV) pela técnica de Nissl (tionina).....	31
Figura 6. Percentual de variação no consumo de ração nos dias de diestro, proestro e estro, em comparação à média da ingestão nos 20 dias consecutivos analisados.	32
Figura 7. Trajetória do peso corporal médio do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 6$), durante aproximadamente 48 dias após a cirurgia.....	33
Figura 8. Representação gráfica do ciclo estral dos 6 animais do grupo controle e dos 8 casos de animais com lesão bilateral do núcleo pré-mamilar ventral (PMV).	34
Figura 9. Concentração sérica do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) de cada animal do grupo controle ($n = 6$) e do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$).....	36
Figura 10. Fotomicrografias para demonstrar as alterações neuroquímicas desencadeadas pela lesão do núcleo pré-mamilar ventral (PMV).....	38
Figura 11. Peso corporal do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 4$) e do grupo controle ($n = 5$), durante aproximadamente 20 dias após a cirurgia.	40
Figura 12. Representação gráfica do ciclo estral dos animais do grupo controle ($n = 5$) e dos animais com lesão bilateral do núcleo pré-mamilar ventral (PMV) ($n = 4$).	41

Figura 13. Expressão do RNAm de KiSS-1 no núcleo periventricular ântero-ventral (AVPV) de animais controle ($n = 5$) e com lesão no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 2$).....	43
Figura 14. Análise histológica dos ovários de animais controle ($n = 5$) e com lesão no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 4$).....	43
Figura 15. Fotomicrografias de campo claro mostrando a marcação do estado fosforilado da proteína transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (pSTAT3) em animais que receberam injeção icv de leptina.	47
Figura 16. Análise da secreção do LH após administração intracerebroventricular de leptina ou salina.....	48
Figura 17. Expressão do RNAm de KiSS-1 no núcleo periventricular ântero-ventral (AVPV), nos animais que receberam administração central de salina ou leptina.....	49
Figura 18. Expressão do RNAm de KiSS-1 no núcleo arqueado (Arc), nos animais que receberam administração central de salina ou leptina.....	50
Figura 19. Expressão do RNAm de neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado (Arc), nos animais que receberam administração central de salina ou leptina.....	50
Figura 20. Fotomicrografias demonstrando a eficácia funcional da lesão do PMV e suas conseqüências na expressão do RNAm de GnRH.....	52
Figura 21. Resumo do comportamento de lordose apresentado pelas fêmeas do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 5$) ou do grupo controle ($n = 11$).....	53
Figura 22. Avaliação do comportamento sexual pelo grau de receptividade apresentado pelas fêmeas.....	54
Figura 23. Número de células que expressam GnRH e quantificação do RNAm de GnRH no OVLT.	56
Figura 24. Correlação entre a expressão do comportamento de lordose e a concentração de progesterona nas ratas após o teste de comportamento sexual.	56
Figura 25. Efeitos da estimulação do odor de machos e fêmeas no núcleo medial da amígdala (MEA) e no núcleo pré-mamilar ventral (PMV) em ratos machos.	72

Figura 26. Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo medial da amígdala (MEA) em ratos machos.....	73
Figura 27. Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo pré-mamilar ventral (PMV) em ratos machos.....	74
Figura 28. Neuroquímica dos neurônios responsivos ao odor no núcleo medial da amígdala e no núcleo pré- mamilar ventral.	77
Figura 29. Ilustração que resume o circuito neuroendócrino, no qual o núcleo pré-mamilar ventral (PMV) faz parte, segundo os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração sérica dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona e leptina dos animais do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 6$), sacrificados na tarde do proestro.	35
Tabela 2. Parâmetros neuroquímicos do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 6$), sacrificados na tarde do proestro.	37
Tabela 3. Concentração sérica dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e leptina dos animais do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 4$) e do grupo controle ($n = 5$), sacrificados no diestro.	42
Tabela 4. Concentração sérica dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) dos animais do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 5$) e do grupo controle ($n = 11$), após o teste de comportamento sexual.	55
Tabela 5. Neurônios que coexpressam atividade à NADPH diaforase (NADPHd) e imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo medial da amígdala e núcleo pré-mamilar ventral em ratos machos.	75
Tabela 6. Neurônios que coexpressam imunorreatividade à urocortina 3 (Ucn 3-ir) e imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo medial da amígdala em ratos machos.	76

LISTA DE ABREVIACÕES

AgRP	Peptídeo relacionado à proteína agouti
Arc	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo periventricular ântero-ventral
BST	Núcleo intersticial da estria terminal
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CRF	Fator de liberação de corticotrofina
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMH	Núcleo dorso-medial do hipotálamo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M.	Erro padrão médio
ER- α	Receptor de estrógeno do tipo α
Fos-ir	Imunorreatividade à proteína Fos
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HHG	Hipotálamo-hipófise-gônadas
Icv	Intracerebroventricular
IOD	Densidade óptica integrada
KPBS	Tampão fosfato de potássio
LH	Hormônio luteinizante
MEA	Núcleo medial da amígdala
MEAad	Porção ântero-dorsal do núcleo medial da amígdala
MEApd	Porção pôstero-dorsal do núcleo medial da amígdala
NaCl	Cloreto de sódio
NADPHd	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase

NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
LepR	Forma longa do receptor de leptina (tipo b)
OVL	Órgão vascular da lâmina terminal
PBS	Tampão fosfato de sódio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMV	Núcleo pré-mamilar ventral
POMC	Pró-opiomelanocortina
pSTAT3	Estado fosforilado da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição-3
SOCS-3	Supressor da sinalização de citocinas 3
SSC	Tampão cloreto de sódio/citrato de sódio
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição-3
Ucn 3	Urocortina 3
Ucn 3-ir	Imunorreatividade à urocortina 3
VMH	Núcleo ventro-medial do hipotálamo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: EXPERIMENTOS DE LESÃO DO NÚCLEO PRÉ-MAMILAR VENTRAL.....	19
1.1 Revisão da Literatura	19
1.2 Objetivos.....	26
1.3 Delineamento Experimental.....	27
1.4 Experimento I – Proestro	28
1.4.1 <i>Desenho experimental</i>	28
1.4.2 <i>Resultados</i>	30
1.5 Experimento II – Animais Sacrificados na Tarde do Diestro I.....	39
1.5.1 <i>Desenho Experimental</i>	39
1.5.2 <i>Resultados</i>	39
1.6 Experimento III – Responsividade à Leptina Após Lesão do PMV	44
1.6.1 <i>Desenho experimental</i>	44
1.6.2 <i>Resultados</i>	45
1.7 Experimento IV – Avaliação do Comportamento Sexual	51
1.7.1 <i>Desenho experimental</i>	51
1.7.2 <i>Resultados</i>	51
1.8 Discussão.....	57
1.8.1 <i>Discussão dos aspectos técnicos</i>	57
1.8.2 <i>O PMV modula os eventos neuroendócrinos na tarde do proestro</i>	58
1.8.3 <i>A integridade do PMV não é necessária para a manifestação do comportamento sexual em fêmeas</i>	60
1.8.4 <i>O PMV não regula diretamente a ingestão alimentar e o peso corporal</i>	63
1.8.5 <i>O PMV media a ação estimulatória da leptina na secreção do LH durante o jejum</i>	64
CAPÍTULO 2: EXPERIMENTOS ENVOLVENDO EXPOSIÇÃO AO ODOR DE CONSPECÍFICOS	68
2.1 Revisão da Literatura	68
2.2 Objetivo	71
2.3 Delineamento Experimental.....	71
2.4 Resultados.....	72

2.4.1 Fos-ir em resposta à exposição ao odor	72
2.4.2 Caracterização dos neurônios do MEA responsivos ao odor	75
2.4.3 Caracterização dos neurônios do PMV responsivos ao odor	76
2.5 Discussão.....	78
2.5.1 Neurônios do MEApd que expressam atividade da NADPHd respondem apenas à estimulação do odor de fêmeas	78
2.5.2 Os neurônios do PMV que expressam atividade da NADPHd respondem à estimulação feromonal	80
3 CONCLUSÕES	82
4 MATERIAL E MÉTODOS	84
4.1 Animais.....	84
4.2 Implante Estereotáxico de NMDA para Lesão do PMV.....	84
4.3 Canulação e Administração Intracerebroventricular	85
4.4 Ovariectomia	85
4.5 Canulação Endovenosa	86
4.6 Determinação do Consumo de Ração e do Peso Corporal.....	86
4.7 Análise do Comportamento Sexual.....	86
4.8 Análise do Ciclo Estral	87
4.9 Paradigma de Exposição ao Odor (Feromônios).....	88
4.10 Perfusão	88
4.11 Métodos Histoquímicos.....	88
4.12 Imunohistoquímica com a Técnica de Imunoperoxidase.....	89
4.13 Hibridização <i>In Situ</i> com ³⁵ S.....	91
4.14 Quantificação dos Hormônios (Radioimunoensaio e Elisa).....	92
4.15 Análise dos Resultados	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

CAPÍTULO 1: EXPERIMENTOS DE LESÃO DO NÚCLEO PRÉ-MAMILAR VENTRAL

Este capítulo descreve diversos experimentos realizados em animais que tiveram o núcleo pré-mamilar ventral (PMV) lesado bilateralmente. O objetivo desses experimentos foi investigar em ratas as consequências da ausência do PMV no consumo alimentar, no ganho de peso corporal e no sistema reprodutivo como um todo, o que engloba determinações do comportamento sexual, do ciclo estral, do perfil hormonal, da histologia ovariana e da neuroquímica envolvida com a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG).

1.1 Revisão da Literatura

O PMV está localizado na porção caudal da zona medial do hipotálamo, rostro-ventralmente ao núcleo pré-mamilar dorsal, dorso-lateralmente ao núcleo arqueado (Arc) e imediatamente rostral ao núcleo mamilar medial (Figura 1). Embora sua função ainda seja pouco conhecida, o PMV tem sido associado à modulação do sistema reprodutivo, baseado em algumas evidências neuroanatômicas e funcionais (Beltramino, Taleisnik, 1985; Simerly *et al.*, 1990; Canteras, Simerly e Swanson, 1992; Kollack-Walker, Newman, 1997; Yokosuka *et al.*, 1999; Rondini *et al.*, 2004; Cavalcante, Bittencourt e Elias, 2006).

Por meio de experimentos utilizando traçadores neurais, foi observado que as principais regiões que recebem projeções do PMV estão diretamente relacionadas com a modulação do sistema reprodutivo. Entre essas regiões, destacam-se: a área pré-óptica, especialmente a parte medial do núcleo pré-óptico medial; o núcleo medial da amígdala (MEA); diversos compartimentos do núcleo intersticial da estria terminal (BST); o Arc; a porção ventro-lateral do núcleo ventro-medial do hipotálamo (VMH) e toda a extensão do núcleo periventricular (Canteras, Simerly e Swanson, 1992; Rondini *et al.*, 2004; Cavalcante, 2006). Contudo, uma das regiões que mais recebe projeções do PMV é a porção ântero-ventral do núcleo periventricular (AVPV). O AVPV é um núcleo-chave para o surgimento do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) (Wiegand, Terasawa, 1982; Le *et al.*, 1999). Como consequências diretas, o AVPV modula o ciclo estral e a ovulação em roedores (Gu, Varoqueaux e Simerly, 1999).

Os neurônios do AVPV apresentam elevada expressão do receptor de estrógeno do tipo α (ER- α) (Simerly *et al.*, 1990) e se projetam maciçamente para a área pré-óptica rostral, fazendo aparente contato sináptico com neurônios que expressam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) na região do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) (Gu, Varoqueaux e Simerly, 1999; Simonian, Spratt e Herbison, 1999). Os neurônios GnRH localizados ao redor do OVLT são particularmente importantes para a regulação do eixo HHG por representar a maioria dos neurônios que sintetizam GnRH e que se projetam para a eminência mediana. Portanto, estes neurônios são diretamente responsáveis pelo controle da secreção hipofisária do LH e do hormônio folículo estimulante (FSH) (King *et al.*, 1982; Lee, Smith e Hoffman, 1990). A Figura 2 resume os principais mecanismos de regulação do eixo HHG.

O reconhecimento do papel do AVPV no controle do ciclo estral aumentou com a recente descoberta de um sistema peptidérgico importante para o funcionamento do sistema reprodutivo, formado pelo gene *Kiss1* e de seu receptor, GPR54 (de Roux *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Camundongos e seres humanos deficientes do GPR54 apresentam hipogonadismo hipogonadotrófico (de Roux *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). O mesmo fenótipo, embora menos severo, é observado em camundongos *knock-out* do gene *Kiss1* (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007). O GPR54 é expresso em neurônios GnRH e seus ligantes derivados do gene *Kiss1*, as Kisspeptinas, são expressas em restritas áreas do hipotálamo, principalmente no AVPV e no Arc. Quando as Kisspeptinas são administradas periféricamente ou intracerebroventricular (icv), ocorre liberação de LH e FSH (Matsui *et al.*, 2004; Kaiser, Kuohung, 2005; Smith *et al.*, 2005a; Smith *et al.*, 2005b; Pompolo *et al.*, 2006; Roa *et al.*, 2006; Kauffman *et al.*, 2007). Alguns estudos observaram que a expressão do RNAm das Kisspeptinas (KiSS-1) no AVPV media o mecanismo de feedback positivo dos estrógenos e, conseqüentemente, regula a ativação dos neurônios GnRH na tarde do proestro (Kinoshita *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007). A expressão de KiSS-1 no AVPV está elevada no momento do surgimento do pico de LH induzido pela administração de estradiol e progesterona em animais ovariectomizados. Além disso, a maioria dos neurônios imunorreativos às Kisspeptinas no AVPV co-expressam a proteína Fos na tarde do proestro (Smith *et al.*, 2006b). Assim, é possível que o PMV possa modular os eventos neuroendócrinos envolvidos com o surgimento do pico pré-ovulatório do LH e, por conseguinte, o ciclo estral e a ovulação, por meio de suas densas projeções para o AVPV.

Figura 2. Esquema que ilustra simplificada os principais mecanismos neuroendócrinos que controlam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Em especial, notar a ação do estradiol controlando a expressão de GnRH, tanto por meio de feedback negativo (regulação basal), quanto por feedback positivo (na tarde do proestro). GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante.

Além disso, o PMV provavelmente influencia diretamente o componente central da regulação do sistema reprodutivo, que são os neurônios que expressam o GnRH. Diversos trabalhos demonstraram que o PMV estabelece aparente contato sináptico diretamente com esses neurônios (Rondini *et al.*, 2004; Boehm, Zou e Buck, 2005; Yoon, Enquist e Dulac, 2005). Dessa forma, baseado em suas projeções, há fortes indícios de que o PMV deve ter sua função atrelada com a regulação do sistema reprodutivo.

O PMV também é influenciado pela concentração de alguns hormônios circulantes, pois seus neurônios expressam o ER- α e grande densidade de receptores de andrógenos (Simerly *et al.*, 1990). O PMV também apresenta grande expressão da forma longa (tipo b) do

receptor de leptina (LepR) (Elmqvist *et al.*, 1998a). Além disso, é observado em ratos expressão de Fos e do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS-3) após injeção endovenosa de leptina, demonstrando que os neurônios do PMV são de fato responsivos à ação desse hormônio (Elias *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2001).

A leptina é sintetizada principalmente nos adipócitos e é considerada um sinalizador fisiológico para o sistema nervoso das reservas de energia disponível, pois sua concentração é diretamente proporcional à massa corpórea de gordura (Zhang *et al.*, 1994; Maffei *et al.*, 1995b). Além da bem estabelecida importância da leptina na modulação do comportamento alimentar e do peso corporal (Elmqvist, Elias e Saper, 1999; Schwartz *et al.*, 2000), esse hormônio exerce marcante influência sobre o sistema reprodutivo (Chan, Mantzoros, 2001). Camundongos, ratos e seres humanos deficientes de leptina são obesos, diabéticos, apresentam hipogonadismo hipogonadotrófico e são inférteis (Chehab, Lim e Lu, 1996; Mounzih, Lu e Chehab, 1997; Licinio *et al.*, 2004). A reposição de leptina nesses casos restaura a concentração de LH e a fertilidade de animais e seres humanos (Chehab, Lim e Lu, 1996; Mounzih, Lu e Chehab, 1997; Farooqi *et al.*, 1999; Licinio *et al.*, 2004). Além disso, situações que reduzem demasiadamente a gordura corporal, como na anorexia nervosa, são favoráveis ao desenvolvimento de amenorréia hipotalâmica funcional e o tratamento exógeno com leptina reverte a baixa leptinemia, restaurando o funcionamento do sistema reprodutivo (Miller *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 1999; Oral *et al.*, 2002; Welt *et al.*, 2004). O jejum causa drástica redução da leptinemia e também é acompanhado de supressão de todo eixo HHG, como, por exemplo, interrupção da ciclicidade estral e redução dos níveis de estradiol e LH (Ahima *et al.*, 1996; Watanobe *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2003). A reposição de leptina durante o jejum previne a maior parte das alterações que acompanham o sistema reprodutivo, tanto em ratos e camundongos, quanto em seres humanos (Ahima *et al.*, 1996; Watanobe *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2003).

A leptina ainda está relacionada com o início da puberdade (Chehab *et al.*, 1997; Cunningham, Clifton e Steiner, 1999; Farooqi *et al.*, 1999). Existem evidências de que esse hormônio exerce influência permissiva para o início da puberdade em animais e humanos (Apter, 2003). Por exemplo, a infusão de leptina em camundongos pré-púberes antecipa a maturação sexual (Ahima *et al.*, 1997; Chehab *et al.*, 1997). Dessa forma, a leptina é considerada atualmente o mais importante elo entre a regulação do sistema reprodutivo mediado por variações do estado nutricional (balanço energético).

Embora a maioria dos tecidos endócrinos, como a hipófise e as gônadas, expressem o LepR (Zamorano *et al.*, 1997), diversos estudos demonstraram que os efeitos da leptina na regulação do sistema reprodutivo são em grande parte mediados pelo sistema nervoso central (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2001; de Luca *et al.*, 2005). Contudo, acredita-se que a leptina não aja diretamente nos neurônios GnRH, visto que eles não expressam o LepR (Todman, Han e Herbison, 2005). A infusão icv de leptina é capaz de ativar todo o eixo HHG, causando liberação do LH (Yu *et al.*, 1997a). A injeção icv de anticorpo anti-leptina leva a um decréscimo na pulsatilidade de LH, prejudicando o comportamento reprodutivo (Carro *et al.*, 1997). Somando-se a isto, estudos realizados *in vitro* com amostras hipotalâmicas demonstraram que a administração de leptina reduz o intervalo de interpulso de GnRH em ratos machos e fêmeas pré-puberes, por meio da mediação do neuropeptídeo transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Lebrethon *et al.*, 2000). Este mesmo estudo demonstrou que utilizando anticorpo anti-CART os efeitos da leptina no intervalo do interpulso de GnRH foram significativamente bloqueados, tanto em machos quanto em fêmeas (Lebrethon *et al.*, 2000). Parent *et al.* (2000), por meio de estudos *in vitro*, também demonstraram que a administração de leptina ou de CART induz a um aumento na amplitude da secreção de GnRH, independente da fase do ciclo estral. Este aumento foi revertido por incubação com anticorpo anti-CART. O PMV de ratos apresenta ampla expressão de CART e esses neurônios são responsivos à leptina (Couceyro, Koylu e Kuhar, 1997; Koylu *et al.*, 1997; Elias *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2001; Cavalcante, Bittencourt e Elias, 2006). Fibras imunorreativas ao CART estão em aposição a neurônios que expressam GnRH em hamsters e em ratos de ambos os sexos, sendo que parte dessas fibras tem o PMV como seu local de origem (Leslie *et al.*, 2001; Rondini *et al.*, 2004). Todas essas informações sugerem que os neurônios CART localizados no PMV participam como mediadores dos efeitos da leptina na regulação do sistema reprodutivo.

Os neurônios do PMV também apresentam ampla expressão de óxido nítrico (NO) (Yokosuka, Hayashi, 1996). Estudos *in vitro* demonstraram que o NO também está envolvido na liberação do GnRH (Rettori *et al.*, 1993; McCann *et al.*, 1999), inclusive na induzida pela leptina (Yu *et al.*, 1997b). Além disso, o NO parece causar atenuação do comportamento sexual em camundongos machos (Nelson *et al.*, 1995) e aumento do comportamento sexual em ratas (Mani *et al.*, 1994).

Apesar de todas essas evidências, a relação do PMV com a ação da leptina na regulação do sistema reprodutivo ainda não foi estudada. A opinião corrente atribui ao Arc os

principais efeitos da leptina no eixo reprodutivo. Isso se deve, provavelmente, ao fato da ação do Arc na mediação dos efeitos fisiológicos da leptina ser bem descrita (Elmquist, Elias e Saper, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). O Arc contém neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína agouti (AgRP), bem como neurônios que sintetizam a pró-opiomelanocortina (POMC). Já é bem conhecida a ação dessas células mediando os efeitos da leptina na regulação do balanço energético, da homeostase glicêmica e da atividade locomotora (Coppari *et al.*, 2005; Schwartz, Porte, 2005; van de Wall *et al.*, 2008). Mas, em se tratando da regulação do sistema reprodutivo, diversos trabalhos mostraram que os neurônios do Arc devem responder apenas por parte da ação da leptina (Hill, Elmquist e Elias, 2008). Por exemplo, a co-administração central de leptina e de um antagonista dos receptores de melanocortina (alguns derivados da molécula POMC são agonistas e o AgRP é antagonista desse sistema) em camundongos *ob/ob* bloqueou os efeitos da leptina no metabolismo, mas não afetou o efeito estimulatório da leptina sobre o eixo reprodutivo (Hohmann *et al.*, 2000). Além disso, manipulações genéticas que induzem deleção do LepR ou da via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), especificamente em neurônios POMC, não afetou a fertilidade dos animais (Balthasar *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2008; van de Wall *et al.*, 2008). A fertilidade também foi preservada em animais carregando uma forma mutante do LepR que impede a sinalização da leptina na via da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição-3 (STAT3), um importante mediador intracelular em neurônios POMC (Bates *et al.*, 2003). Todos esses resultados indicam que o sistema melanocortina, ativado pela leptina no Arc, provavelmente não está envolvido na regulação do eixo reprodutivo.

Por outro lado, há mais evidências relacionando as células NPY do Arc com a regulação do eixo reprodutivo. Por exemplo, a administração crônica de NPY suprime a secreção de gonadotrofinas e a função sexual em ratas intactas (Catzeflis *et al.*, 1993). Além disso, a supressão da liberação basal de LH que acompanha a privação alimentar em camundongas normais parece requerer a ação do NPY dependente de esteróides sexuais (Hill, Levine, 2003). No entanto, camundongos *ob/ob* que também são deficientes de NPY apresentam apenas melhora modesta das funções reprodutivas (Erickson, Hollopeter e Palmiter, 1996). Em adição, camundongos que não expressam LepR, tanto nas células NPY/AgRP, quanto nas células POMC, não apresentam alteração na fertilidade (van de Wall *et al.*, 2008). Assim, as células NPY do Arc parecem mediar apenas parte da ação da leptina sobre o sistema reprodutivo.

Recentemente, foi mostrado que cerca de 40% dos neurônios que expressam KiSS-1 no Arc co-localizam com o LepR. Além disso, animais *ob/ob* apresentam diminuída expressão de KiSS-1 no Arc e a administração de leptina parcialmente restaura a expressão de KiSS-1 (Smith *et al.*, 2006a). Estes resultados sugerem que as células KiSS-1 podem ser potenciais mediadores do Arc na regulação do sistema reprodutivo. Entretanto, a reativação dos LepR especificamente no Arc de camundongos que possuem uma forma não-funcional do LepR não reverte o fenótipo de infertilidade (Coppari *et al.*, 2005). Além disso, a expressão de KiSS-1 no Arc em ratas não foi afetada por um jejum de 48 horas (Kalamatianos *et al.*, 2008). Este período de jejum, sabidamente, reduz as concentrações de leptina e suprime a função reprodutiva (Ahima *et al.*, 1996; Elmquist *et al.*, 1998b). Assim, todas as evidências indicam que o Arc não deve ser o principal mediador da leptina no sistema reprodutivo. Portanto, outras regiões em potencial que expressam o LepR devem ser investigadas.

Diante do exposto, formulamos a hipótese de que o PMV apresenta todas as condições de receber informações a respeito do balanço energético, transmitidas pela leptina e, por conseguinte, modular o eixo HHG.

1.2 Objetivos

Os experimentos descritos neste capítulo tiveram como objetivo estudar a função do PMV em animais que tiveram essa região quimicamente destruída.

Os objetivos específicos podem ser divididos em:

1. Avaliar o papel do PMV no controle de diversos parâmetros reprodutivos. Nossa hipótese é que o PMV é parte integrante do circuito hipotalâmico que controla o sistema reprodutivo, ao atuar em vias neurais relacionadas ao eixo HHG.
2. Avaliar o papel do PMV na intermediação da ação da leptina sobre a indução na secreção de LH em estados de jejum. Nossa hipótese é que o PMV, por meio da ampla expressão de LepR em seus neurônios, controla os efeitos da leptina na estimulação da secreção de LH em estados de jejum.

1.3 Delineamento Experimental

Este capítulo compreende diversos experimentos que foram conduzidos para propiciar uma ampla visão das consequências da lesão bilateral do PMV no sistema reprodutivo de ratas. Além disso, esses diversos experimentos foram necessários para englobar os distintos momentos que fêmeas apresentam ao longo de seu ciclo estral, por exemplo, proestro e diestro. Vale ressaltar que foram utilizadas apenas ratas da linhagem Sprague-Dawley, operadas com idade média de 54 dias. Todos os experimentos contaram com um grupo de ratas que tiveram o PMV lesado, junto a um grupo de animais controle, submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas no qual o PMV foi mantido intacto. As lesões foram causadas por meio de injeção estereotáxica da neurotoxina N-metil-D-aspartato (NMDA) no PMV, bilateralmente. O NMDA causa morte dos neurônios por excito-toxicidade na área atingida, deixando intacta outras estruturas na região, como fibras de passagem, e tem sido amplamente utilizado para estudo de vias neurais (Sukikara *et al.*, 2006; Mitchell, Baxter e Gaffan, 2007).

Abaixo estão listados os experimentos realizados neste capítulo. Cada um dos seguintes experimentos será discutido individualmente nos próximos tópicos.

- **Experimento I – Proestro**
 - Fêmeas sacrificadas na tarde do proestro, uma hora antes da luz apagar, no momento do surgimento do pico pré-ovulatório do LH (Figura 3).
- **Experimento II – Diestro**
 - Fêmeas sacrificadas na tarde do diestro 1, com o intuito de avaliar a condição neuroendócrina *basal*.
- **Experimento III – Responsividade à leptina**
 - Foi avaliado se os animais com lesão do PMV respondem normalmente à administração icv de leptina, com aumento da secreção de LH durante o jejum.
- **Experimento IV – Comportamento sexual**
 - O comportamento sexual foi avaliado em fêmeas com lesão do PMV.

1.4 Experimento I – Proestro

1.4.1 Desenho experimental

O objetivo deste experimento foi avaliar a importância do PMV no momento crítico do ciclo estral da rata que é o pico pré-ovulatório do LH. O pico pré-ovulatório do LH ocorre na tarde do proestro e obedece a padrões circadianos relativamente regulares. Segundo alguns autores, ele pode ser observado, aproximadamente, uma hora antes do final da fase clara do proestro (Figura 3) (Smith, Freeman e Neill, 1975; Wang, Hoffman e Smith, 1995; Le *et al.*, 1999).

Um grupo de ratas foi operado com o objetivo de causar lesão bilateral no PMV e um grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, mas as micropipetas foram preenchidas com salina. Dessa forma, o PMV dos animais do grupo controle foi mantido intacto.

O ciclo estral desses animais foi determinado por um período médio de 10 dias antes da cirurgia e apenas as ratas que apresentaram pelo menos 2 ciclos normais de 4 ou 5 dias foram operadas (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002; Freeman, 2006). Após a cirurgia, as ratas foram mantidas em caixas individuais. O ciclo estral foi monitorado diariamente e o peso corporal, semanalmente, até o dia do sacrifício. Além disso, a ingestão de ração foi mensurada durante 20 dias consecutivos, tendo início após 3 semanas de recuperação da cirurgia.

Ambos os grupos foram sacrificados 1 hora antes da luz apagar na tarde do proestro, com uma margem de erro máxima menor do que 10 minutos para mais ou para menos. O proestro foi confirmado por meio de esfregaço vaginal realizada no período da manhã. Depois de constatado que havia algum animal a ser sacrificado, a sala onde os animais estavam alojados permaneceu fechada até a hora do sacrifício para minimizar qualquer interferência.

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina, xilazina e acepromazina (0,3 mL/100 g). Após alguns minutos, já sob efeito do anestésico, as ratas foram pesadas e levadas até a sala de perfusão. Antes da perfusão, foi coletado cerca de 5 mL de sangue a partir de punção da aorta abdominal. Imediatamente após a coleta de sangue, os animais foram perfundidos, conforme os detalhes descritos na seção Material e Métodos. Cabe salientar que todo o procedimento, da anestesia até a coleta de sangue propriamente dita, foi levado em consideração no cálculo do momento do sacrifício dos animais (1 hora antes da luz apagar).

Figura 3. Dinâmica das concentrações plasmáticas dos hormônios progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH).

As análises hormonais foram obtidas em intervalos de 2 horas ao longo dos 4 dias do ciclo estral de ratas. Cada ponto representa a concentração média de 5 a 6 ratas ($\pm$ E.P.M.). As barras pretas no eixo X representam o período escuro do dia e os números a hora do dia. Figura adaptada de Smith *et al.* (1975) e Freeman (2006).

1.4.2 Resultados

De um total de 20 ratas operadas, 8 animais apresentaram lesões satisfatórias e bilaterais do PMV. Outras 6 ratas, operadas com pipetas preenchidas com salina, constituem o grupo controle. As demais ratas foram descartadas por apresentarem problemas durante ou após a cirurgia ou não obtiveram lesões satisfatórias do PMV.

A Figura 5 mostra fotomicrografias do PMV de animais controle e de ratas que apresentaram lesão bilateral do PMV. Pode-se observar o PMV intacto nas ratas controle, por meio da técnica de coloração por tionina. Já nos animais com o PMV lesado, pode-se notar a falta de neurônios nessa região, tanto em sua porção rostral, quanto na caudal. Além disso, é interessante notar que os núcleos localizados ao redor do PMV não foram atingidos pela lesão, demonstrando a especificidade dos resultados obtidos (Figura 5).

Em relação à média do consumo diário de ração, o grupo com lesão do PMV não apresentou diferença quando comparado ao controle ($P = 0,8575$, Figura 4).

Figura 4. Consumo médio de ração dos animais controle ($n = 6$) e dos animais com lesão do núcle pré-mamilar ventral ($n = 8$).

O consumo de ração foi determinado durante 20 dias consecutivos, após três semanas de recuperação dos animais à cirurgia.

Figura 5. Fotomicrografias de campo claro mostrando a citoarquitetura do núcleo pré-mamilar ventral (PMV) pela técnica de Nissl (tionina).

A e C, fotomicrografias mostrando o PMV intacto em animais do grupo controle. B e D, fotomicrografias demonstrando o PMV lesado bilateralmente. A, B, porção rostral do PMV. C, D, porção caudal do PMV. Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; Arc, núcleo arqueado; fx, fórnice; PMD, núcleo pré-mamilar dorsal; TM, núcleo túbero-mamilar. Barra = 550 μ m

Entretanto, quando o consumo de ração foi avaliado separadamente em cada fase do ciclo estral, o grupo com lesão do PMV apresentou redução significativa na magnitude da variação no consumo de ração no dia do proestro (Figura 6). Cabe ressaltar que diversos autores já demonstraram que fêmeas apresentam redução na ingestão alimentar no proestro, quando a concentração de estrógenos circulantes está elevada (Wingkar, 1992; Asarian, Geary, 2006).

Figura 6. Percentual de variação no consumo de ração nos dias de diestro, proestro e estro, em comparação à média da ingestão nos 20 dias consecutivos analisados.

*, valor significativamente diferente ($P < 0,05$; obtido a partir do teste de t-Student two-tailed) comparado ao grupo controle no mesmo dia do ciclo estral. Grupo com lesão bilateral do núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 5-6$).

Os animais do grupo controle e do grupo com lesão do PMV foram operados com um peso corporal médio de $190,5 \pm 5,2$ e $187,1 \pm 6,1$ ($P = 0,7065$), respectivamente. A trajetória do peso corporal dos grupos ao longo do experimento está apresentada na Figura 7. Não foi observada diferença significativa em relação ao peso corporal entre os grupos experimentais em nenhum momento do estudo.

Figura 7. Trajetória do peso corporal médio do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 6$), durante aproximadamente 48 dias após a cirurgia.

A representação do ciclo estral de cada animal dos grupos experimentais é mostrada na Figura 8. Pode-se observar que todas as ratas apresentaram ciclo estral normal antes do dia da cirurgia, que está indicado com uma flecha vermelha em cada esquema. Pode-se ainda observar que todas as ratas do grupo controle mantiveram ciclos regulares de quatro ou cinco dias, mesmo após a cirurgia estereotáxica. Entretanto, os animais com lesão do PMV apresentaram marcante alteração do ciclo estral, geralmente nas três primeiras semanas após a cirurgia. Nesse período, as ratas com o PMV lesado mantiveram um perfil de células compatível com o diestro. Após este período de anestro, as ratas restabeleceram sua ciclicidade, embora a citologia vaginal tenha continuado a apresentar um perfil atípico de células misturadas.

Em relação às análises hormonais, não foi observada diferença significativa na média da concentração de progesterona e leptina entre os grupos experimentais. No entanto, as concentrações de estradiol e de testosterona foram significativamente menores no grupo com lesão, quando comparadas ao encontrado no grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração sérica dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona e leptina dos animais do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 6$), sacrificados na tarde do proestro.

	Controle	Lesão	<i>P</i>
Estradiol (pg/mL)	13,3 ± 0,6	9,4 ± 0,9	0,0063
Progesterona (ng/mL)	64,2 ± 11,8	38,2 ± 11,9	0,1562
Testosterona (ng/mL)	0,55 ± 0,04	0,19 ± 0,04	< 0,0001
Leptina (ng/mL)	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,4	0,3595

O valor de *P* foi obtido a partir do teste de t-Student two-tailed.

Devido ao inerente padrão pulsátil da secreção do LH e do FSH, os valores de cada animal são mostrados individualmente em um gráfico de dispersão (Figura 9). Pode-se observar que dos 6 animais do grupo controle, apenas 1 apresentou valores de LH inferiores ao esperado para o pico pré-ovulatório do LH (vide valores dos animais sacrificados no diestro 1 como referência, Tabela 3). Por outro lado, dos 8 animais com lesão do PMV, 6 deles apresentaram valores baixos de LH. Ou seja, enquanto que 83% dos animais do grupo controle apresentaram valores de LH compatíveis com o pico pré-ovulatório, apenas 25% das ratas do grupo com lesão se enquadraram nesta condição (Figura 9). Em relação ao FSH, observou-se que a maioria dos animais com lesão no PMV (7/8 ou 88%) apresentou valores de FSH próximos aos encontrados nos animais sacrificados no diestro. No grupo controle, apenas 50% (3/6) dos animais apresentaram valores de FSH semelhantes aos encontrados durante o diestro.

Figura 9. Concentração sérica do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) de cada animal do grupo controle ($n = 6$) e do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$).

Lee *et al.* (1990) observaram que ratas apresentam expressão da proteína Fos em neurônios que expressam GnRH apenas na tarde do proestro e em nenhum outro momento ao longo de seu ciclo estral, como evidência de que os neurônios GnRH são ativados para desencadear o surgimento do pico pré-ovulatório do LH. Os neurônios que apresentam co-localização com a proteína Fos representam cerca de 25 a 40% de toda população dos neurônios imunorreativos ao GnRH e concentram-se ao redor do OVLT, principalmente. Além disso, os neurônios que expressam Fos na tarde do proestro apresentam aumento do RNAm de GnRH durante o surgimento do pico de LH no proestro (Wang, Hoffman e Smith, 1995). Baseado nesses dados, investigamos as consequências da lesão do PMV nos neurônios que sintetizam GnRH na região do OVLT. Foi observado menor percentual de neurônios imunorreativos ao GnRH que co-expressam a proteína Fos na tarde do proestro nos animais com lesão do PMV. Cabe salientar que em 3 casos do grupo com lesão (38% do total), não foi observada co-localização de GnRH e Fos, enquanto que todas as ratas do grupo controle apresentaram neurônios co-expressando GnRH e Fos em proporções condizentes com a

literatura (Lee, Smith e Hoffman, 1990; Le *et al.*, 1999) (Tabela 2 e Figura 10A,D). Além disso, a expressão do RNAm de GnRH nos neurônios localizados ao redor do OVLT também apresentou-se significativamente menor no grupo com lesão, comparado ao grupo controle (Tabela 2 e Figura 10B,E). Não houve diferença ($P = 0,8430$) no número de neurônios GnRH entre os grupos controle ($45,2 \pm 2,5$) e com lesão no PMV ($46,0 \pm 2,7$).

O AVPV é considerado uma das principais regiões que regulam a secreção de GnRH na tarde do proestro (Shander, Barraclough, 1980; Le *et al.*, 1999). Além disso, ao longo de todo o ciclo estral este núcleo apresenta aumento da expressão da proteína Fos apenas na tarde do proestro (Le *et al.*, 1999). Foi observado que os animais com lesão do PMV apresentaram menor número de neurônios que expressaram a proteína Fos no AVPV, em relação ao grupo controle (Tabela 2 e Figura 10C,F).

Como anteriormente mencionado, diversos autores mostraram que o CART e as Kisspeptinas regulam o eixo reprodutivo (Lebrethon *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2000; Gottsch *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Kinoshita *et al.*, 2005). Além disso, ambos os peptídeos são expressos no AVPV (Rondini *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005a). Dessa forma, foi realizado a determinação da expressão do RNAm desses peptídeos no AVPV. Não foi observada diferença na expressão de CART e KiSS-1 no AVPV entre os animais com lesão do PMV e os animais do grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros neuroquímicos do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 8$) e do grupo controle ($n = 6$), sacrificados na tarde do proestro.

	Controle	Lesão	<i>P</i>
Co-localização de GnRH + Fos	$33,9 \pm 9,3\%$	$11,1 \pm 3,9\%$	0,0282
RNAm de GnRH no OVLT*	$33,07 \pm 1,71$	$28,53 \pm 1,04$	0,0341
Contagem de Fos no AVPV	$293,0 \pm 36,9$	$102,3 \pm 18,4$	0,0003
RNAm de KiSS-1 no AVPV	$113,0 \pm 14,6$	$120,2 \pm 9,9$	0,6769
RNAm de CART no AVPV*	$2,33 \pm 0,27$	$2,44 \pm 0,24$	0,7833

GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; AVPV, núcleo periventricular antero-ventral; CART, transcrito regulado por cocaína e anfetamina. O valor de *P* foi obtido a partir do teste de t-Student two-tailed. *, a determinação da quantidade de RNAm, após a técnica de hibridização *in situ*, foi realizada através da quantificação da densidade óptica integrada dos grãos de prata precipitados pela radioatividade na emulsão fotográfica.

Figura 10. Fotomicrografias para demonstrar as alterações neuroquímicas desencadeadas pela lesão do núcleo pré-mamilar ventral (PMV).

A, D, fotomicrografias de campo claro ilustrando a co-localização da proteína Fos em neurônios GnRH na região do OVLT. Pode-se observar que os animais com lesão do PMV (D) apresentaram menos neurônios GnRH que expressam Fos (indicado pelas flechas), comparados ao grupo controle (A). B, E, fotomicrografias de campo escuro mostrando menor expressão do RNAm de GnRH no grupo com lesão do PMV (E), comparado ao grupo controle (B), na região do OVLT. C, F, fotomicrografias de campo claro demonstrando a redução significativa na expressão da proteína Fos no AVPV dos animais com lesão do PMV (F) em relação aos animais do grupo controle (C). Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; ac, comissura anterior; AVPV, núcleo periventricular ântero-ventral; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; MPO, núcleo pré-óptico medial; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; OX, chiasma óptico. Barras: A = 50 μ m, B = 400 μ m, C = 100 μ m.

1.5 Experimento II – Animais Sacrificados na Tarde do Diestro I

1.5.1 Desenho Experimental

Visando complementar os resultados obtidos com os animais sacrificados na tarde do proestro, as ratas neste experimento foram submetidas à cirurgia estereotáxica – grupo com lesão bilateral do PMV e grupo controle – acompanhadas durante um período de algumas semanas e sacrificadas na tarde do diestro I, no mesmo horário que os animais sacrificados na tarde do proestro (uma hora antes da luz apagar). Assim, objetivou-se com esses grupos ter uma idéia da condição *basal* do perfil hormonal e neuroquímico dos animais com lesão do PMV. Além disso, os ovários desses animais foram coletados para a realização de análise histológica.

O ciclo estral das ratas foi acompanhado antes da cirurgia (para selecionar os animais que ciclavam regularmente) até o dia do sacrifício, com o intuito de confirmar os resultados já obtidos no experimento anterior. As fêmeas com lesão foram sacrificadas após sua ciclicidade estral ter sido reiniciada.

1.5.2 Resultados

De um total de 20 ratas, 4 animais apresentaram lesão bilateral satisfatória do PMV e outras 5 ratas foram operadas com micropipetas preenchidas com salina e fazem parte do grupo controle. Os demais animais foram descartados por conta de lesão insatisfatória no PMV ou apresentaram problemas durante ou após a cirurgia.

A variação média do peso corporal está apresentada na Figura 11. Os animais do grupo controle foram operados com um peso médio de $192 \pm 7\text{g}$ e os animais do grupo lesão com $186 \pm 3\text{g}$ ($P = 0,5053$). Não foi observada diferença significativa na média do peso entre os grupos experimentais em nenhum momento analisado.

Figura 11. Peso corporal do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 4$) e do grupo controle ($n = 5$), durante aproximadamente 20 dias após a cirurgia.

A representação do ciclo estral de cada animal dos grupos experimentais é mostrada na Figura 12. Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com aqueles obtidos nos animais sacrificados na tarde do proestro. Todas as ratas do grupo controle mantiveram ciclos regulares de quatro ou cinco dias, mesmo após a cirurgia estereotáxica. No entanto, os animais com lesão do PMV apresentaram um período de anestro, após a cirurgia, com um perfil de células semelhante ao observado durante o diestro. Após algumas semanas, as ratas com lesão restabeleceram sua ciclicidade estral.

Figura 12. Representação gráfica do ciclo estral dos animais do grupo controle ($n = 5$) e dos animais com lesão bilateral do núcleo pré-mamilar ventral (PMV) ($n = 4$).

O ciclo estral foi avaliado através do perfil de células obtidas por meio de esfregaço vaginal. O gráfico representa o tipo de célula predominante em cada um dos dias de observação. C, células cornificadas (estro); N, células nudeadas ou epiteliais (proestro); L, leucócitos (diestro).

Em relação aos valores referentes às dosagens hormonais nos animais sacrificados no diestro, não foi observada diferença estatística entre os grupos nas concentrações de estradiol, progesterona, testosterona, LH, FSH e leptina (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração sérica dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e leptina dos animais do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 4$) e do grupo controle ($n = 5$), sacrificados no diestro.

	Controle	Lesão	<i>P</i>
Estradiol (pg/mL)	$5,1 \pm 0,1$	$6,4 \pm 1,0$	0,1654
Progesterona (ng/mL)	$9,69 \pm 1,1$	$14,1 \pm 2,1$	0,0935
Testosterona (ng/mL)	$0,13 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,06$	0,4818
LH (ng/mL)	$2,9 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,9$	0,6296
FSH (ng/mL)	$1,7 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,2$	0,1914
Leptina (ng/mL)	$1,8 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	0,4357

O valor de *P* foi obtido a partir do teste de t-Student two-tailed.

Em relação à análise neuroquímica dos animais sacrificados no diestro, determinou-se a expressão de KiSS-1 no AVPV. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos na expressão do RNAm de KiSS-1 no AVPV ($P = 0,8093$, Figura 13).

Os ovários dos animais foram coletados e processados para análise de sinais histológicos que indicassem maturação folicular e ovulação (Junqueira, Carneiro, 2003; Tolosa *et al.*, 2003). Observamos que os animais com lesão do PMV apresentaram menor número ($P = 0,0195$) de folículos antrais (maduros), comparados às fêmeas do grupo controle (Figura 14). Porém, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos no número de corpos lúteos ($P = 0,0749$, Figura 14).

Figura 13. Expressão do RNAm de KiSS-1 no núcleo periventricular ântero-ventral (AVPV) de animais controle ($n = 5$) e com lesão no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 2$).

Figura 14. Análise histológica dos ovários de animais controle ($n = 5$) e com lesão no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 4$).

*, diferença significativa (t -Student; $P = 0,0195$) em relação ao grupo controle.

1.6 Experimento III – Responsividade à Leptina Após Lesão do PMV

1.6.1 Desenho experimental

Este experimento foi concebido com o intuito de avaliar se ratas que tiveram o PMV lesado bilateralmente apresentam alterações quanto aos efeitos desencadeados pela administração aguda de leptina. Em específico, avaliou-se a capacidade da leptina administrada icv, em fêmeas em jejum, de aumentar a concentração sérica de LH (Yu *et al.*, 1997a; Watanobe, Schioth e Suda, 2000) e alterar a expressão de neuropeptídeos relacionados com a regulação do sistema reprodutivo. A ativação dos neurônios responsivos à leptina foi confirmada por meio de imunohistoquímica para a marcação do estado fosforilado da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição-3 (pSTAT3), um indicador da sinalização intracelular do LepR (Banks *et al.*, 2000).

As ratas deste experimento foram submetidas à cirurgia estereotáxica para lesão bilateral do PMV, juntamente com ovariectomia. Os animais controle também tiveram seus ovários removidos, porém a injeção estereotáxica foi realizada com micropipetas preenchidas com salina. Essas fêmeas foram mantidas em caixas individuais durante 2 a 3 semanas para se recuperarem. Após esse período, os animais foram submetidos a uma nova cirurgia estereotáxica para fixação de uma guia metálica no ventrículo lateral. Os animais foram manipulados diariamente após essa cirurgia para habituação e após 4 a 8 dias foram submetidos à canulação da veia jugular externa. A canulação da jugular ocorreu no início da tarde (14h00min a 16h00min) e no dia seguinte, pela manhã (08h00min a 13h00min), os animais foram testados. O ciclo luminoso da sala foi ajustado para 06h00min-18h00min claro e 18h00min-06h00min escuro. Ainda, 48-51 horas antes do teste, os animais foram mantidos em jejum e receberam injeção subcutânea de benzoato de estradiol (Sigma, St. Louis, EUA).

No dia do teste, foi realizada uma coleta de sangue pela cânula endovenosa, representando o valor basal. Posteriormente, as ratas receberam administração icv de 10 µl de salina ou de leptina (1 µg/µl, Sigma), durante aproximadamente 1 minuto. Após o término da injeção icv, realizaram-se 6 coletas de sangue com 10 minutos de intervalo entre cada uma (tempos +10, +20, +30, +40, +50 e +60 min). Depois de cada coleta (0,3 mL de sangue), um volume idêntico de salina, contendo heparina (10 UI/mL), foi repostado e a cânula endovenosa foi mantida com essa solução até a próxima coleta. Sempre antes das coletas, o volume de salina da cânula era removido e o sangue era coletado com o uso de uma seringa limpa. Após a última coleta de sangue (60 minutos após a injeção de leptina), as ratas foram anestesiadas,

tiveram o sangue coletado pela aorta descendente (tempo + 70 min) e foram perfundidas transcardiacamente, conforme detalhado na sessão Material e Métodos.

Determinou-se a área sobre a curva da concentração do LH e a expressão no encéfalo de neuromediadores envolvidos com a regulação do sistema reprodutivo.

No total foram utilizados 50 animais para a realização deste experimento. Excluindo-se animais que apresentaram problemas durante ou após a cirurgia, restaram 25 animais distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

➤ **Grupo Controle-Salina**

- ✓ Grupo **sem** lesão que recebeu injeção icv de **salina** ($n = 8$)

➤ **Grupo Controle-Leptina**

- ✓ Grupo **sem** lesão que recebeu injeção icv de **leptina** ($n = 8$)

➤ **Grupo LesãoParcial-Leptina**

- ✓ Grupo **com** lesão **parcial** do PMV que recebeu injeção icv de **leptina** ($n = 4$)

➤ **Grupo Lesão-Leptina**

- ✓ Grupo **com** lesão **completa** e **bilateral** do PMV que recebeu injeção icv de **leptina** ($n = 5$)

1.6.2 Resultados

Foi realizada reação para coloração das células imunorreativas ao pSTAT3, para indicar os neurônios que responderam à leptina administrada icv (Banks et al., 2000). Em todos os animais que receberam administração de leptina observou-se marcação de pSTAT3 em regiões que expressam LepR e que reconhecidamente são responsivas à leptina, como o Arc, o DMH e o VMH (Figura 15C,F). Além disso, todos os animais do grupo Controle-Leptina apresentaram ampla expressão de pSTAT3 no PMV, confirmando trabalhos anteriores (Elias et al., 2000; Elias et al., 2001), nos quais foi mostrado que os neurônios do PMV respondem prontamente à administração de leptina (Figura 15A,B). Como esperado, os animais do grupo Controle-Salina apresentaram virtualmente nenhuma expressão de pSTAT3.

Já no grupo Lesão-Leptina, foi observado que em 5 animais as lesões bilaterais do PMV apresentaram-se satisfatórias, pois não houve expressão de pSTAT3 nesta região (Figura 15D-E). Também foi realizada coloração com tionina (Nissl) em todos os casos deste grupo

com intuito de confirmar a área lesada. É importante observar que as regiões adjacentes ao PMV que expressaram pSTAT3 – Arc, VMH e DMH – não foram atingidas pela lesão, demonstrando a especificidade da mesma (Figura 15C,F). Além disso, os casos no qual o PMV foi parcialmente lesado, visto que ainda foi possível detectar algum grau de expressão de pSTAT3, foram utilizados como um grupo controle adicional. Isto foi feito, pois, como os animais dos grupos Controle-Saline e Controle-Leptina não receberam injeção estereotáxica de NMDA, a comparação com os animais do grupo LesãoParcial-Leptina foi importante para determinar se a administração de NMDA por si só pode causar alguma alteração nos parâmetros avaliados.

Figura 15. Fotomicrografias de campo claro mostrando a marcação do estado fosforilado da proteína transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (pSTAT3) em animais que receberam injeção icv de leptina.

A-B, fotomicrografias ilustrando a marcação de pSTAT3 nas porções rostral (A) e caudal (B) do núcleo pré-mamilar ventral (PMV) de animais controle (PMV intacto). D-E, fotomicrografias demonstrando que animais com lesão do PMV perderam a capacidade responder à infusão de leptina nessa região, tanto na porção rostral (D), quanto na caudal (E). C, F, fotomicrografias da região imediatamente rostral ao PMV ilustrando que os núcleos arqueado (Arc), dorso-medial do hipotálamo (DMH) e ventro-medial do hipotálamo (VMH) não foram atingidos pela lesão do PMV, pois seus neurônios continuam a expressar pSTAT3. Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; fx, fórnice. Barra: 500 μ m.

Os grupos experimentais apresentaram valores basais de LH equivalentes. Como já demonstrado anteriormente (Yu *et al.*, 1997a; Watanobe, Schioth e Suda, 2000), a administração de leptina causou aumento na secreção de LH no grupo Controle-Leptina (Figura 16). Também foi observado aumento significativo na secreção de LH nos animais do grupo LesãoParcial-Leptina. Entretanto, no grupo Lesão-Leptina a secreção de LH não foi diferente daquela observada no grupo Controle-Salina.

Figura 16. Análise da secreção do LH após administração intracerebroventricular de leptina ou salina.

Os valores da área sobre a curva do LH nos grupos controle-leptina ($n = 8$) e LesãoParcial-Leptina ($n = 4$) foram significativamente maiores (ANOVA, $P = 0,0042$), comparados aos obtidos nos grupos Controle-Salina (*, $n = 8$) e Lesão-Leptina (#, $n = 5$).

Em relação à análise neuroquímica, determinou-se a expressão do RNAm de KiSS-1 no AVPV (Figura 17). Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais na expressão de KiSS-1 no AVPV ($P = 0,7358$).

Figura 17. Expressão do RNAm de KiSS-1 no núcleo periventricular ântero-ventral (AVPV), nos animais que receberam administração central de salina ou leptina.

Uma vez que o Arc é uma importante área que media diversas funções da leptina e também recebe densas projeções do PMV (Canteras, Simerly e Swanson, 1992; Elmquist, Elias e Saper, 1999; Rondini *et al.*, 2004), foi testado se a lesão do PMV afetou os sistemas peptidérgicos no Arc relacionados com a ação da leptina no sistema reprodutivo. Não foram encontradas alterações na expressão do RNAm de KiSS-1 no Arc entre os grupos experimentais ($P = 0,7195$, Figura 18). Por outro lado, foi observada redução ($P = 0,0013$) na expressão do RNAm de NPY no Arc em todos os grupos tratados com leptina, comparados ao grupo Controle-Salina (Figura 19). Este resultado está de acordo com a ação inibitória da leptina sobre a expressão do RNAm de NPY no Arc durante o jejum (Ahima *et al.*, 1999).

Figura 18. Expressão do RNAm de KiSS-1 no núcleo arqueado (Arc), nos animais que receberam administração central de salina ou leptina.

Figura 19. Expressão do RNAm de neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado (Arc), nos animais que receberam administração central de salina ou leptina.

*, diferença significativa ($P = 0,0013$; ANOVA) em relação ao grupo Controle-Salina.

1.7 Experimento IV – Avaliação do Comportamento Sexual

1.7.1 Desenho experimental

O objetivo deste experimento foi avaliar se ratas com lesão bilateral do PMV apresentam comprometimento do comportamento sexual – expressão de proceptividade e receptividade sexual em relação à presença de um macho. Além disso, avaliou-se o perfil hormonal e neuroquímico das ratas imediatamente após o teste de comportamento sexual.

Assim, os animais foram operados e, posteriormente, mantidos em caixas individuais durante um período médio de 70 dias. Posteriormente, as ratas foram submetidas ao teste de comportamento sexual. O teste foi realizado quando a rata se encontrava no dia do proestro e teve início a partir da terceira hora da fase escura deste dia (transição do proestro para o estro). Os detalhes sobre o teste de comportamento sexual estão descritos na sua respectiva sessão no tópico Material e Métodos. Mas, resumidamente, foi avaliada a expressão do comportamento de lordose da fêmea, mediante as 10 primeiras tentativas de monta de um macho sexualmente experiente. Além disso, avaliou-se a ocorrência de alguns comportamentos estereotipados da fêmea, em relação à presença do macho, que indicam proceptividade (Pfaff *et al.*, 2006). O teste teve duração de 30 min e após seu término as ratas foram anestesiadas, o sangue coletado por punção da aorta descendente e perfundidas transcardiacamente. Do início do teste até a perfusão transcorreram cerca de 40 min.

1.7.2 Resultados

Para este experimento 27 ratas foram operadas para implante estereotáxico de NMDA no PMV, bilateralmente. Cinco animais apresentaram lesão satisfatória e bilateral do PMV, constituindo o grupo lesão. Onze animais não apresentaram lesão do PMV (injeção fora do PMV ou a aplicação de NMDA foi ineficaz para causar morte neuronal) e fazem parte do grupo controle. A confirmação da região lesada foi realizada por meio da coloração com tionina (método de Nissl). Ainda foi realizada marcação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPHd) para confirmação funcional da lesão no PMV. Nesse sentido, pode-se observar nos animais do grupo controle que o PMV é densamente composto por neurônios que expressam a enzima NADPHd (Figura 20A-B). Por outro lado, os animais com lesão deixaram de apresentar expressão dessa enzima no PMV, indicando o caráter funcional da lesão. Outras regiões ao redor do PMV que também expressam a enzima NADPHd, como o núcleo pré-mamilar dorsal, não foram atingidas (Figura 20C).

Figura 20. Fotomicrografias demonstrando a eficácia funcional da lesão do PMV e suas consequências na expressão do RNAm de GnRH.

A, fotomicrografia de campo claro para mostrar a citoarquitetura do PMV. B, fotomicrografia de campo claro para mostrar a expressão da enzima NADPH-diaforase, que atua na síntese de óxido nítrico, nos animais do grupo controle. C, fotomicrografia demonstrando o caráter funcional da lesão do PMV, pois os neurônios dessa região deixaram de expressar a NADPH-diaforase. Notar que as regiões adjacentes ao PMV não foram atingidas pela lesão. D, citoarquitetura da região que compreende o OVLT. E, F, fotomicrografias de campo escuro ilustrando o aumento significativo na expressão do RNAm de GnRH na região do OVLT com a lesão do PMV (F), comparado aos animais do grupo controle (E), de ratas sacrificadas após o teste de comportamento sexual. Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; ac, comissura anterior; Arc, núcleo arqueado; fx, fórnice; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; PMD, núcleo pré-mamilar dorsal; PMV, núcleo pré-mamilar ventral; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal. Barras: A = 200 μ m, D = 500 μ m.

Avaliamos o percentual de fêmeas que apresentaram sinais de proceptividade em relação à presença do macho e não foi observada diferença entre os grupos controle (55% dos animais demonstraram sinais de proceptividade) e com lesão do PMV (60% dos animais demonstraram sinais de proceptividade). Em relação aos resultados da avaliação do comportamento sexual, observamos que as ratas com lesão bilateral do PMV não apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão de receptividade sexual (percentual de lordoses realizadas durante o teste), comparados ao grupo controle ($P = 0,5629$; Figura 21).

Figura 21. Resumo do comportamento de lordose apresentado pelas fêmeas do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 5$) ou do grupo controle ($n = 11$).

Foi avaliado o percentual das dez primeiras tentativas de monta realizadas por um macho sexualmente experiente que resultaram na expressão de lordose.

Ainda foi analisado o percentual de fêmeas que apresentam alta, baixa ou nenhuma expressão de lordose durante o teste de comportamento sexual (Figura 22). Nesse sentido, 45% (5/11) das fêmeas do grupo controle apresentaram grande receptividade sexual (alto índice de lordose), comparado à 20% (1/5) dos animais do grupo com lesão. Por outro lado, 40% (2/5) das fêmeas com lesão do PMV não apresentaram nenhuma lordose durante o teste,

comparado à 18% (2/11) dos animais do grupo controle. Imediatamente antes da perfusão, realizamos esfregaço vaginal e constatamos que nenhuma fêmea com lesão do PMV induziu ejaculação do macho durante o teste, enquanto que 27% dos animais (3/11) do grupo controle apresentaram espermatozóides na análise de esfregaço vaginal (Figura 22).

Figura 22. Avaliação do comportamento sexual pelo grau de receptividade apresentado pelas fêmeas.

Avaliou-se o percentual de fêmeas do grupo controle ($n = 11$) e do grupo com lesão no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 5$) que apresentaram alta (de 70 a 100%), baixa (de 10 a 60%) ou nenhuma (0%) expressão de receptividade sexual (comportamento de lordose), bem como que induziram ejaculação do macho durante o teste. A ausência de barras de erros nos gráficos indica que apenas o percentual de animais em cada grupo foi mostrado e nenhuma análise estatística foi realizada.

Não foi observada alteração significativa entre os grupos na média das concentrações dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona, LH e FSH (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração sérica dos hormônios estradiol, progesterona, testosterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) dos animais do grupo com lesão bilateral no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 5$) e do grupo controle ($n = 11$), após o teste de comportamento sexual.

	Controle	Lesão	<i>P</i>
Estradiol (pg/mL)	$9,9 \pm 1,0$	$8,6 \pm 0,6$	0,4214
Progesterona (ng/mL)	$99,5 \pm 12,5$	$94,3 \pm 28,3$	0,8454
Testosterona (ng/mL)	$0,14 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$	0,7166
LH (ng/mL)	$46,4 \pm 18,7$	$23,5 \pm 13,6$	0,4513
FSH (ng/mL)	$7,5 \pm 1,4$	$9,7 \pm 4,3$	0,5356

O valor de *P* foi obtido a partir do teste de t-Student two-tailed.

Com relação à neuroquímica, os animais com lesão do PMV apresentaram maior número de células que expressam GnRH ($P = 0,0469$) e maior quantidade do RNAm de GnRH por célula ($P = 0,0047$) após o comportamento sexual, comparados aos animais do grupo controle (Figura 20D-F e Figura 23). Além disso, foi analisada a expressão de KiSS-1 no AVPV. Os animais com lesão do PMV apresentaram menor quantidade do RNAm de KiSS-1 no AVPV, comparados aos animais do grupo controle (Controle: 8831 ± 652 ; Lesão: 6423 ± 829 ; $P = 0,0498$).

Foram realizadas algumas análises de correlação entre os valores da expressão do comportamento de lordose e as concentrações dos hormônios circulantes. Observou-se correlação positiva entre a expressão de lordose e a concentração de progesterona (regressão linear; $r = 0,6759$; $P = 0,0041$). Nesse sentido, as fêmeas que apresentaram os maiores níveis de progesterona circulante foram aquelas que mais expressaram o comportamento de lordose (Figura 24).

Figura 23. Número de células que expressam GnRH e quantificação do RNAm de GnRH no OVLT.

Foram quantificados individualmente todos os neurônios GnRH em um nível da região pré-óptica, ao redor do OVLT. A determinação da quantidade de RNAm, após a técnica de hibridização *in situ*, foi realizada através da quantificação da IOD dos grãos de prata precipitados pela radioatividade na emulsão fotográfica. Consideraram-se apenas os neurônios que apresentaram IOD pelo menos 3 vezes maior que o IOD do tecido adjacente sem marcação. *, diferença estatística ($P < 0,05$, *t*-Student) em relação ao grupo controle. GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; IOD, densidade óptica integrada; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal.

Figura 24. Correlação entre a expressão do comportamento de lordose e a concentração de progesterona nas ratas após o teste de comportamento sexual.

A correlação foi determinada por regressão linear (Pearson). Foram incluídos na análise os dados dos animais do grupo controle ($n = 11$) e do grupo com lesão no núcleo pré-mamilar ventral ($n = 5$).

1.8 Discussão

Os experimentos descritos neste capítulo utilizaram um modelo experimental de lesão excitotóxica bilateral para avaliar se a integridade do PMV é necessária para que diversas funções do sistema reprodutivo apresentem atividade normal. Nesse sentido, foi observado que a integridade do PMV é necessária para que a leptina exerça seu efeito estimulatório sobre a secreção de LH em animais em jejum. Além disso, a integridade do PMV também é necessária para o controle adequado dos eventos neuroendócrinos que ocorrem durante o surgimento do pico pré-ovulatório do LH.

1.8.1 Discussão dos aspectos técnicos

A proteína Fos tem sido amplamente empregada como um indicador de ativação neuronal. Embora tenhamos baseado a maioria das nossas análises neuroquímicas em resultados de trabalhos já publicados (Lee, Smith e Hoffman, 1990; Le *et al.*, 1999), é importante mencionar que respostas fisiológicas podem se originar em neurônios que não apresentam mudanças intracelulares suficientes para induzir expressão de Fos. Contudo, os resultados encontrados nos animais dos grupos controle, utilizando a imunoreatividade à Fos, estão plenamente de acordo com os observados por outros autores (Lee, Smith e Hoffman, 1990; Le *et al.*, 1999).

Foi utilizado o NMDA para causar lesão química nos neurônios do PMV. O NMDA vem sendo empregado com sucesso por nosso grupo de pesquisa (Sukikara *et al.*, 2006) e por outros (Mitchell, Baxter e Gaffan, 2007) e apresenta diversas vantagens, comparado a outros métodos, como o de lesão eletrolítica. O NMDA causa morte celular por excito-toxicidade, deixando intactas fibras de passagem, o que, por outro lado, poderia dificultar a interpretação dos resultados (Sisk, Nunez e Thebert, 1988). Além disso, uma grande vantagem no uso de injeção de NMDA por iontoforese é a possibilidade de se realizar pequenas lesões, restritas aos limites do núcleo alvo. Conforme demonstrado pelas fotomicrografias da coloração por tionina, foram incluídos nos grupos de lesão do PMV apenas os casos em que se observou completa lesão bilateralmente e nos quais os núcleos adjacentes foram mantidos intactos. Utilizamos ainda outros métodos para confirmar os resultados encontrados na coloração com tionina, como a marcação do pSTAT3 (nos animais que receberam leptina icv), da atividade da NADPHd (Experimento IV) ou do RNAm de CART (dados não mostrados). Essas marcações

foram realizadas com o intuito confirmar se os neurônios do PMV haviam sido completamente lesados, sem afetar núcleos adjacentes.

Outro aspecto que se refere ao uso do NMDA é o fato dos animais do grupo controle (com exceção do Experimento IV) não terem recebido injeção de NMDA (foi realizado aplicação de salina). A integridade do PMV foi confirmada em todos os animais do grupo controle. Além disso, foi realizada análise dos casos em que houve lesão parcial do PMV. Observamos que os animais com lesão parcial apresentaram resultados similares aos encontrados nos grupos controle. Este fato é uma evidência de que a aplicação de NMDA por si só não teve efeito algum nos parâmetros avaliados, confirmando a validade de nossos grupos controles.

1.8.2 O PMV modula os eventos neuroendócrinos na tarde do proestro

Os presentes resultados confirmam de maneira funcional as suspeitas obtidas em trabalhos neuroanatômicos anteriores que haviam constatado que a grande maioria das projeções dos neurônios do PMV se dirige para núcleos envolvidos com a regulação do sistema reprodutivo (Canteras, Simerly e Swanson, 1992; Rondini *et al.*, 2004; Cavalcante, 2006) ou mesmo para os neurônios que expressam GnRH (Rondini *et al.*, 2004; Boehm, Zou e Buck, 2005; Yoon, Enquist e Dulac, 2005). Assim, o PMV pode regular o sistema reprodutivo de forma direta (via neurônios GnRH) ou indiretamente.

As projeções do PMV para o AVPV podem constituir importante via indireta de regulação do eixo reprodutivo. Sabe-se que o crescente aumento do estradiol ao longo do ciclo estral desencadeia a ativação dos neurônios do AVPV, causando o efeito de feedback positivo dos estrógenos (Gu, Varoquaux e Simerly, 1999; Le *et al.*, 1999; Ottem *et al.*, 2004; Dungan, Clifton e Steiner, 2006; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007). Além disso, lesões eletrolíticas do AVPV causam interrupção permanente do ciclo estral e abolem o surgimento do pico de LH induzido pela administração de progesterona (Wiegand, Terasawa, 1982). Como indicação de que o AVPV pode mediar parte da ação do PMV na regulação do sistema reprodutivo, observamos que os animais com lesão do PMV apresentaram expressão de Fos na tarde do proestro significativamente menor no AVPV, comparados aos animais controle. Esse achado sugere que a ausência do PMV resulta na ativação de um menor número de neurônios no AVPV durante o surgimento do pico pré-ovulatório do LH. Recentemente, alguns autores mostraram que mais de 80% dos neurônios que expressam Fos no AVPV co-expressam KiSS-1 (Smith *et al.*, 2006b). Todavia, não encontramos alteração na expressão de KiSS-1 na tarde

do proestro. Talvez, a menor expressão de Fos no AVPV não necessariamente implique em mudanças na expressão de KiSS-1. Alguns autores mostraram, por meio de hibridização *in situ*, aumento do número de neurônios que expressam KiSS-1, mas não da expressão de KiSS-1 por célula na tarde do proestro (Smith *et al.*, 2006b). Outro estudo, utilizando RT-PCR como método quantitativo, não encontrou mudança significativa da expressão de KiSS-1 no AVPV ao longo do ciclo estral em ratas intactas (Kinoshita *et al.*, 2005). Usando camundongos *knock-out* do gene do receptor das Kisspeptinas, o GPR54, foi demonstrado que o sistema Kisspeptinas–GPR54 não é a única via necessária para a geração do pico de LH, induzido após tratamento com estrógeno (Dungan *et al.*, 2007). Além disso, é importante mencionar que a falta de diferenças na expressão do RNAm de KiSS-1 não é uma garantia de que os neurônios KiSS-1 não apresentaram mudanças na síntese ou liberação das Kisspeptinas. Assim, apesar das densas projeções do PMV para o AVPV, nossos resultados não são suficientes para mostrar uma inter-relação entre esses dois núcleos na regulação do eixo reprodutivo, especialmente no que se refere à função das Kisspeptinas nessa região. Dessa forma, a menor expressão de Fos no AVPV com a lesão do PMV pode ter sido consequência da redução na concentração do estradiol na tarde do proestro, o que em última instância, poderia reduzir a ativação dos neurônios do AVPV, que são sensíveis ao aumento dos estrógenos ao longo do ciclo estral, sem necessariamente afetar a expressão do RNAm de KiSS-1.

Por outro lado, a análise da expressão de GnRH nos neurônios localizados ao redor do OVLT revelou marcante alteração após a lesão do PMV. A lesão diminuiu o número de neurônios GnRH que co-localizaram Fos, bem como, reduziu a expressão do RNAm de GnRH nos animais sacrificados no momento do pico pré-ovulatório do LH. Estes achados sugerem que os efeitos do PMV na regulação do eixo reprodutivo podem ser por meio das projeções diretas para os neurônios GnRH (Rondini *et al.*, 2004; Boehm, Zou e Buck, 2005; Yoon, Enquist e Dulac, 2005). Uma vez que a secreção das gonadotropinas é regulada pela atividade dos neurônios GnRH, não é surpreendente que a maioria dos animais com lesão do PMV apresentou valores de LH abaixo do que seria esperado para o surgimento do pico de LH na tarde do proestro. Resultados semelhantes foram encontrados com o FSH, porém de forma menos evidente.

Já alterações na secreção das gonadotropinas podem promover mudanças nos níveis dos esteróides sexuais e na função ovariana. De fato, a lesão do PMV reduziu a concentração de estradiol no proestro e alterou parâmetros histológicos do ovário que indicam maturação

dos folículos (redução no número de folículos antrais) (Junqueira, Carneiro, 2003; Tolosa *et al.*, 2003). Observamos ainda redução significativa na concentração de testosterona nos animais com lesão sacrificados no proestro. Estes resultados estão de acordo com estudos que mostraram que o estradiol e a testosterona apresentam o mesmo padrão de variação ao longo do ciclo estral de ratos (Haim *et al.*, 2003). Assim, ao suprimir os níveis de estradiol no proestro, a lesão do PMV também aboliu o aumento da testosterona circulante observado nesse período.

Apesar de todos os sinais de supressão no eixo HHG, os animais com lesão do PMV aparentemente foram capazes de recuperar a ciclicidade estral após algumas semanas da cirurgia. Estes resultados estão de acordo com trabalhos que demonstraram que o circuito neural que regula o sistema reprodutivo apresenta alta redundância e mecanismos compensatórios (Bronson, 1998; Herbison *et al.*, 2008). Assim, nossos resultados indicam que a integridade do PMV não é uma condição *sine qua non* para o controle basal dos hormônios envolvidos no eixo HHG, para que a fêmea mantenha aparente ciclicidade estral ou para o surgimento espontâneo do pico de LH durante o proestro. No entanto, a ausência da regulação exercida pelo PMV promove claros sinais de supressão em todos os componentes do eixo reprodutivo, particularmente na tarde do proestro, demonstrando que o PMV exerce papel modulatório sobre este sistema.

1.8.3 A integridade do PMV não é necessária para a manifestação do comportamento sexual em fêmeas

No Capítulo 2 deste trabalho estão descritos experimentos que mostram que o PMV está relacionado com o circuito neural que responde a certas pistas do ambiente, como os feromônios. Outros trabalhos já demonstraram que os neurônios do PMV em machos são ativados após exposição ao odor de fêmeas (Yokosuka, Hayashi, 1996; Cavalcante, Bittencourt e Elias, 2006). É bem descrito na literatura que diversos comportamentos, inclusive o sexual, são induzidos pela estimulação de circuitos neurais responsivos aos feromônios e outras pistas olfatórias (Boehm, Zou e Buck, 2005; Lin *et al.*, 2005; Yoon, Enquist e Dulac, 2005; Zufall, Leinders-Zufall, 2007). Assim, o PMV parece apresentar condições ideais de regular o comportamento sexual, pois os resultados do Capítulo 1 demonstraram que o PMV é capaz de regular o eixo reprodutivo e os resultados do Capítulo 2 mostraram que o PMV responde a estímulos do ambiente que são importantes para a manifestação de comportamentos inatos. Cabe ressaltar que, até o presente momento, a

relação do PMV com as respostas feromonais foi investigada apenas em machos, o que não descarta a possibilidade de diferenças entre gêneros.

Em relação aos resultados da avaliação do comportamento sexual de fêmeas com lesão do PMV, observamos que a integridade do PMV não é necessária para a manifestação de proceptividade sexual, nem de lordose. De fato, um grande número de estudos já demonstrou que a manifestação do comportamento de lordose depende de um circuito neural formado pelos neurônios GnRH, por núcleos da área pré-óptica e pelo VMH que, em conjunto, regulam neurônios localizados na região da substância cinzenta peri-aquedutal (vide Pfaff *et al.* (2006) para uma revisão sobre o tema). A partir dos resultados do presente trabalho não temos condições de aferir se o PMV tem uma relação direta com este circuito.

Sabe-se que a condição endócrina do animal exerce profunda influência sobre a manifestação de lordose em fêmeas intactas ou ovariectomizadas (Pfaff *et al.*, 2006). Apesar de não termos observado diferença quanto à média do percentual de lordose apresentada pelas fêmeas durante o teste de comportamento sexual, um menor percentual de animais com lesão do PMV apresentou alto índice de lordose. Além disso, 40% dos animais com lesão do PMV não apresentaram qualquer lordose, contra 18% dos animais do grupo controle. Ainda, nenhuma fêmea com lesão do PMV induziu ejaculação do macho durante o teste, contra 27% dos animais do grupo controle. Embora a ocorrência de ejaculação esteja mais relacionada ao comportamento sexual do macho (Hull, Wood e McKenna, 2006), é possível que o menor percentual de fêmeas com alta receptividade sexual no grupo com lesão do PMV tenha impedido que os machos apresentassem ejaculação ao longo das 10 montas realizadas no teste. Cabe ressaltar que foram utilizados os mesmos machos nos testes dos grupos controle e com lesão no PMV. Além disso, todos os machos já eram sexualmente experientes previamente aos testes.

Com base nos presentes resultados, pode-se hipotetizar que o PMV deve ter interferido indiretamente na manifestação do comportamento sexual, por meio da regulação do eixo HHG. Observamos correlação entre os valores de progesterona e o índice de lordose nos animais do teste de comportamento sexual ($r = 0,68$; $P < 0,01$). Assim, os animais que apresentaram os maiores níveis de progesterona circulante eram aqueles que estavam mais sexualmente receptivos (maior percentual de lordose). Sabe-se que a administração de progesterona em fêmeas ovariectomizadas e previamente tratadas com estradiol age como indutor do comportamento sexual (Powers, 1972). Porém, a ação da progesterona é dependente da condição endócrina prévia. Nesse sentido, o aumento da concentração de

estradiol ao longo do ciclo estral (ou o tratamento de estradiol em fêmeas ovariectomizadas) promove mudanças na distribuição e expressão de receptores hormonais, como, por exemplo, aumento da quantidade do receptor de progesterona em núcleos hipotâmicos que regulam a expressão do comportamento de lordose (Musatov *et al.*, 2006; Pfaff *et al.*, 2006). Embora não tenha sido encontrada diferença na média das concentrações de estradiol e progesterona entre os grupos sacrificados após o teste de comportamento sexual, este resultado pode ter sido consequência do momento do sacrifício. Uma vez que os animais foram sacrificados cerca de 4 horas após o início da fase escura do proestro (início do estro), os níveis de estradiol provavelmente já estavam suprimidos (vide Figura 3 como referência das variações hormonais ao longo do ciclo estral). Assim, os níveis de estrógenos obtidos nas fêmeas após o comportamento sexual não reflete, necessariamente, sua concentração em outros períodos do ciclo estral. Por outro lado, no Experimento I observamos que fêmeas com lesão do PMV sacrificadas na tarde do proestro apresentaram menor concentração de estradiol. Dessa forma, esses resultados sugerem que a supressão do eixo HHG com a lesão do PMV pode ter contribuído para atenuar as mudanças neuroendócrinas que ocorrem ao longo do ciclo estral e que regulam a expressão de receptividade sexual no final do proestro. Outros experimentos serão necessários para testar essa hipótese.

Com relação à neuroquímica após o teste de comportamento sexual, observamos que os animais com lesão do PMV apresentaram menor expressão de KiSS-1 no AVPV, comparados ao grupo controle. Este resultado é mais uma evidência da supressão do eixo reprodutivo com a lesão do PMV. Por outro lado, foi observado maior quantidade de neurônios GnRH e maior expressão de RNAm do GnRH por célula, nos animais com lesão do PMV. Até o presente momento não temos uma explicação para este resultado, sendo necessários outros experimentos para esclarecer esta questão. No entanto, sabe-se que a expressão gênica nem sempre é um indicador fisiológico fidedigno, pois neurônios podem mudar sua atividade sem necessariamente ocorrer alterações gênicas. Além disso, variações do RNAm não necessariamente promovem mudanças dos produtos protéicos gerados por este gene (Lipscombe, 2005). Assim, apenas pela determinação do RNAm de GnRH não temos condições de saber se esses neurônios estavam sintetizando mais hormônio GnRH, ou mesmo, se o GnRH estava sendo liberado. Por exemplo, a secreção das gonadotropinas pela hipófise é considerada um dos mais fidedignos marcadores indiretos da liberação de GnRH na região da eminência mediana (Eskay, Mical e Porter, 1977; Freeman, 2006). Nesse sentido, nossos dados de LH sugerem que o GnRH não estava sendo liberado, pois os animais com lesão do PMV

apresentaram valor médio do LH equivalente à metade do encontrado no grupo controle, apesar da maior expressão de GnRH. Além disso, não foi encontrada correlação entre a expressão do RNAm de GnRH e os níveis de estradiol, progesterona, LH e FSH (dados não mostrados).

Adicionalmente, diversos autores demonstraram que a liberação de GnRH ou de alguns de seus metabólitos exerce papel estimulatório sobre a manifestação do comportamento de lordose (Pfaus *et al.*, 1994; Gargiulo, Donoso, 1995; Wu *et al.*, 2006; Gomora-Arrati *et al.*, 2008). Contudo, também não foi observada maior receptividade sexual nos animais com lesão do PMV. Assim, todos esses resultados sugerem que, nos animais sacrificados após o teste de comportamento sexual, a maior expressão do RNAm de GnRH com a lesão do PMV não esteja, necessariamente, refletindo numa maior liberação neuronal do hormônio GnRH.

1.8.4 O PMV não regula diretamente a ingestão alimentar e o peso corporal

O PMV apresenta ampla expressão do LepR (Elmquist *et al.*, 1998a). Além disso, outros trabalhos mostraram que os neurônios do PMV são responsivos à administração de leptina (Elias *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2001). A ação da leptina no controle do balanço energético do organismo é bem descrita na literatura (Elmquist, Elias e Saper, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). A deficiência de leptina ou do LepR em roedores e em seres humanos causa hiperfagia e obesidade e o tratamento exógeno com leptina em casos de deficiência promove redução da ingestão alimentar e redução do peso corporal (Zhang *et al.*, 1994; Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Tartaglia *et al.*, 1995; Montague *et al.*, 1997; Farooqi *et al.*, 1999; Farooqi *et al.*, 2007). Além disso, outros núcleos hipotalâmicos que também expressam o LepR, como o Arc e o VMH (Elmquist *et al.*, 1998a), estão envolvidos com a regulação do balanço energético (Elmquist, Elias e Saper, 1999; Coppari *et al.*, 2005; Elmquist *et al.*, 2005; Zigman *et al.*, 2005; Dhillon *et al.*, 2006; King, 2006; Musatov *et al.*, 2007; Bingham *et al.*, 2008). Contudo, nenhum estudo até então determinou se o PMV exerce alguma influência nas ações mediadas pela leptina.

Nossos resultados mostraram que a lesão do PMV não alterou a ingestão alimentar média, nem o peso corporal das ratas. Contudo, algumas ressalvas devem ser consideradas. A avaliação do peso corporal foi realizada durante um período relativamente curto de 7 semanas. Assim, não está descartada a possibilidade de que num acompanhamento mais prolongado os animais com lesão do PMV apresentassem alguma alteração da ingestão alimentar ou do peso corporal. Além disso, não foram realizadas análises mais detalhadas dos componentes da

composição corporal. Experimentos futuros podem esclarecer se animais com lesão do PMV apresentam diferenças na massa corporal magra ou na quantidade de gordura corporal, a despeito de ausência de alterações no peso corporal. Adicionalmente, neste experimento foram avaliadas apenas fêmeas. Finalmente, experimentos futuros podem avaliar os efeitos da lesão do PMV em situações que desafiam a manutenção adequada do peso corporal, como por exemplo, em dietas que induzem à obesidade. Nesse sentido, com o desenho experimental usado, não temos condições de saber se o PMV influencia o balanço energético em condições particulares, mas não necessariamente em uma dieta padrão *ad libitum*.

Apesar de não termos encontrado diferença na ingestão alimentar média, foi observado que a lesão do PMV aboliu a típica variação da ingestão alimentar durante o ciclo estral. É sabido que ratas apresentam redução na ingestão alimentar na transição do proestro para o estro. Acredita-se que este efeito seja causado pelo aumento da concentração de estrógenos, quando atinge seu ápice na tarde do proestro (Wingkar, 1992; Asarian, Geary, 2006). Em adição, a ovariectomia causa aumento do ganho de peso e da ingestão alimentar, enquanto que a reposição de estradiol em níveis basais impede essas alterações (Geary, Asarian, 1999). Não observamos alteração da concentração sérica de leptina entre os grupos com lesão e controle, tanto no proestro, como no diestro. Dessa maneira, hipotetizamos que o PMV não esteja necessariamente regulando a ingestão alimentar, mas as alterações no eixo HHG causadas pela lesão do PMV podem ter interferido no comportamento alimentar. Assim, é possível que a ausência de redução na ingestão alimentar no proestro com a lesão do PMV tenha sido causada pelo bloqueio da ação anorexígena do estradiol (ausência de aumento no proestro). Experimentos envolvendo ovariectomia e reposição de estradiol em animais com lesão do PMV podem esclarecer melhor esta questão.

1.8.5 O PMV media a ação estimulatória da leptina na secreção do LH durante o jejum

Há muito tempo já se sabe que situações de privação alimentar causam supressão do eixo HHG (Frisch, McArthur, 1974). Contudo, o circuito neural envolvido com esse controle ainda permanece desconhecido. Inúmeros estudos mostraram que a leptina é um dos mais importantes hormônios que integram variações do balanço energético com a regulação da reprodução. Nesse sentido, acredita-se que a concentração de leptina circulante age fisiologicamente como um indicador do estado nutricional do organismo (Maffei *et al.*, 1995a; Maffei *et al.*, 1995b). Dessa maneira, variações na concentração da leptina causam marcante influência sobre o funcionamento do sistema reprodutivo, tanto em roedores, como em seres

humanos (Ahima *et al.*, 1996; Chehab, Lim e Lu, 1996; Chehab *et al.*, 1997; Mounzih, Lu e Chehab, 1997; Yu *et al.*, 1997a; Miller *et al.*, 1998; Cunningham, Clifton e Steiner, 1999; Farooqi *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 1999; Watanobe *et al.*, 1999; Chan, Mantzoros, 2001; Oral *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Licinio *et al.*, 2004; Welt *et al.*, 2004; Chan, Mantzoros, 2005).

Apesar da distribuição do LepR em diversos núcleos hipotalâmicos (Elmquist *et al.*, 1998a), o Arc é a região mais bem estudada em relação às ações da leptina, inclusive no que se refere à regulação do sistema reprodutivo (Hill, Elmquist e Elias, 2008). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, diversas evidências indicam que a ação da leptina no Arc explica apenas parte da inter-relação entre variações do estado nutricional e a regulação do eixo reprodutivo (Erickson, Hollopeter e Palmiter, 1996; Hohmann *et al.*, 2000; Bates *et al.*, 2003; Balthasar *et al.*, 2004; Coppari *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2008; van de Wall *et al.*, 2008). Por exemplo, a lesão do Arc em ratos neonatos, por meio de administração de glutamato monossódico, não reproduz o fenótipo de hipogonadismo e infertilidade observado pela deficiência de leptina ou do LepR (Barash *et al.*, 1996; Chehab, Lim e Lu, 1996; Montague *et al.*, 1997; Farooqi *et al.*, 1999), mas causa apenas redução da taxa de fecundidade (Lamperti, Blaha, 1976; Lengvari, 1977; Pizzi, Barnhart e Fanslow, 1977). Assim, outras regiões também mediam a ação da leptina na regulação do eixo reprodutivo e nosso estudo avaliou se o PMV pode ser uma delas.

Entre os principais efeitos sobre o sistema reprodutivo causados pela redução na concentração de leptina, estão: redução nos níveis de estradiol e LH, interrupção do ciclo estral (menstrual) e alteração de marcadores ovarianos (Ahima *et al.*, 1996; Nagatani *et al.*, 1998; Farooqi *et al.*, 1999; Watanobe *et al.*, 1999; Farooqi *et al.*, 2002; Welt *et al.*, 2004). Os animais com lesão do PMV apresentaram, de uma forma geral, alterações similares ao que ocorre com a deficiência parcial de leptina, como a induzida por privação alimentar (Gruaz *et al.*, 1998; Roman, Ricci e Faletti, 2005; Terry *et al.*, 2005). Além disso, um dos mais bem descritos efeitos da leptina sobre o eixo reprodutivo é a indução da secreção de LH durante estados de jejum, como uma evidência de que a redução da leptina nessa condição é responsável por boa parte da supressão do sistema reprodutivo (Ahima *et al.*, 1996; Nagatani *et al.*, 1998; Watanobe *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2003; Welt *et al.*, 2004; Chan, Mantzoros, 2005). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que a integridade do PMV é necessária para que a leptina induza secreção de LH no jejum. O bloqueio sobre este efeito da leptina ocorreu apenas quando o PMV foi completa e bilateralmente destruído, visto que os animais com lesão parcial do PMV apresentaram aumento na secreção de LH após a administração icv

de leptina, de forma equivalente ao grupo controle. Estes achados sugerem que o PMV media ao menos parte da ação da leptina no eixo reprodutivo. Contudo, como anteriormente mencionado, o PMV não deve estar relacionado aos efeitos da leptina na regulação do balanço energético. Assim, parece haver dissociação entre os efeitos da leptina sobre o controle da reprodução e do balanço energético. Alguns autores (Hohmann *et al.*, 2000; Bates *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2008), baseados em estudos que investigaram mediadores intracelulares recrutados pela leptina (STAT3 e PI3K), já haviam predito esta dissociação. Porém, nossos resultados mostram que essa dissociação pode ocorrer em um núcleo como um todo.

Com o intuito de investigar regiões que pudessem mediar a ação do PMV, após a administração de leptina, foi determinada a expressão do RNAm de KiSS-1 no AVPV. Contudo, nem a lesão do PMV, nem a administração de leptina aparentemente influenciaram a expressão de KiSS-1. Estes resultados sugerem que a ação estimulatória da leptina sobre o LH não depende das Kisspeptinas sintetizadas no AVPV. Outro possível mediador da ação da leptina sobre a secreção do LH é o Arc. Como já mencionado, existem mais evidências mostrando que a regulação do Arc sobre o sistema reprodutivo é mediado por células que expressam NPY ou KiSS-1 (Catzeflis *et al.*, 1993; Erickson, Hollopeter e Palmiter, 1996; Hill, Levine, 2003; Smith *et al.*, 2006a). Dessa maneira, determinamos no Arc a expressão gênica desses dois neuropeptídeos. Semelhantemente aos resultados observados no AVPV, a expressão de KiSS-1 no Arc não foi influenciada pela lesão do PMV ou pela administração de leptina. Kalamatianos *et al.* (2008) observaram que o jejum de 48 horas também não afetou a expressão de KiSS-1 no Arc. Todavia, nossos resultados contrastam com o observado por Castellano *et al.* (2006) que encontraram aumento da expressão de KiSS-1 no hipotálamo, após 6 dias de administração icv de leptina em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Smith *et al.* (2006a) também observaram que a administração de leptina em camundongos machos *ob/ob* restaurou parcialmente a baixa expressão de KiSS-1 no Arc. Contudo, as diferenças nos modelos experimentais impedem a comparação entre nossos dados e os resultados obtidos por esses autores. Com relação à expressão de NPY, foi observado que a administração de leptina reduziu significativamente a quantidade do RNAm de NPY no Arc, sem qualquer efeito da lesão do PMV. Estes resultados estão de acordo com a ação inibitória da leptina sobre a expressão de NPY no Arc (Ahima *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 1999). Esses resultados também indicam que a resposta dos neurônios NPY no Arc, em relação à administração de leptina, estava preservada nos grupos com lesão total e parcial do PMV.

Apesar disso, apenas o grupo com lesão completa do PMV teve a secreção de LH bloqueada, sugerindo que o PMV e não o Arc tenha sido responsável por este efeito.

Diante de todas as evidências apresentadas, pode-se concluir que o PMV modula a atividade do eixo HHG, pois a lesão de seus neurônios acarreta diversos distúrbios endócrinos e funcionais. Mostramos ainda uma ação até então desconhecida do PMV mediando os efeitos da leptina sobre a secreção do LH durante a condição de jejum. Além disso, os presentes resultados sugerem a existência de dissociação entre os núcleos hipotalâmicos recrutados pela leptina no controle da reprodução e do balanço energético. Finalmente, como uma forma de continuidade a este trabalho, sugerimos o uso de ferramentas e modelos genéticos que possibilitem a manipulação gênica do LepR ou de vias intracelulares recrutadas pela leptina, especificamente nos neurônios do PMV, para se determinar de forma contundente a interação entre a leptina e o PMV.

CAPÍTULO 2: EXPERIMENTOS ENVOLVENDO EXPOSIÇÃO AO ODOR DE CONSPECÍFICOS

Este capítulo descreve experimentos realizados em ratos machos com o objetivo de estudar a resposta neuroquímica à exposição ao odor (feromônios) de conspecíficos. Nesse sentido, buscou-se realizar uma descrição das vias neuroquímicas ativadas quando ratos machos são expostos ao odor de fêmeas, bem como de outros machos, estabelecendo-se, portanto, uma comparação entre essas duas condições. Ressalta-se que as análises foram focadas na inter-relação entre o PMV e o MEA.

2.1 Revisão da Literatura

Conforme mencionado anteriormente, a função do PMV ainda não é bem descrita, mas existem evidências sugerindo que este núcleo pode ter ação modulatória no comportamento reprodutivo. Uma das regiões que recebe projeção do PMV é o MEA. O MEA, ao mesmo tempo que recebe grande projeção do PMV, também tem nesse núcleo uma de suas principais fontes de projeções (Canteras, Simerly e Swanson, 1992; 1995; Coolen, Wood, 1998; Cavalcante *et al.*, 2006). O MEA está envolvido com a regulação de diversos comportamentos motivados, inclusive com o comportamento sexual (Wood, Coolen, 1997; Kondo, Sachs, 2002).

Além de possuir grande quantidade de receptores de esteróides sexuais (Simerly *et al.*, 1990), o MEA recebe a informação proveniente do bulbo olfatório acessório, relacionada à capacidade de reconhecimento de substâncias de relevância social conspecífica, ou seja, os feromônios. O MEA, em conjunto com o órgão vômero-nasal, o bulbo olfatório acessório, o BST e alguns núcleos hipotalâmicos, como o núcleo pré-óptico medial e o VMH, constituem o sistema vômero-nasal que classicamente é responsável pela detecção, processamento e desencadeamento de respostas aos feromônios (Halpern, Martinez-Marcos, 2003). Além do MEA, o PMV também envia e recebe substancial quantidade de fibras para praticamente todos os núcleos hipotalâmicos envolvidos com o sistema vômero-nasal (Canteras, Simerly e Swanson, 1992; Rondini *et al.*, 2004).

Dessa forma, baseado em estudos neuroanatômicos, há fortes evidências de que o PMV está apto a responder ao estímulo feromonal e, em contrapartida, modular as respostas relacionadas a esse sistema. Nesse sentido, Cavalcante, Bittencourt e Elias (2006) observaram que o PMV de ratos machos apresenta acentuada expressão da proteína Fos após exposição ao odor de fêmeas adultas, indicando que uma parte significativa dos neurônios do PMV é ativada pelos feromônios de fêmeas. O mesmo resultado foi observado em camundongos machos, após exposição ao feromônio de fêmeas (Yokosuka *et al.*, 1999). Ratos machos apresentam aumento da concentração sérica do LH quando expostos ao feromônio de fêmeas (Kamel *et al.*, 1977). Beltramino e Taleisnik (1978) observaram que ratas fêmeas ovariectomizadas e tratadas com estrógeno apresentam aumento da concentração de LH quando o MEA é eletricamente estimulado na tarde do proestro. Posteriormente, estes mesmos autores observaram que o aumento do LH desencadeado pela estimulação do MEA é suprimido quando o PMV ipsilateral está lesado (Beltramino, Taleisnik, 1985). Estes resultados sugerem a existência de uma inter-relação entre o PMV e o MEA, responsável por alterações hormonais desencadeadas por feromônio. Apesar desses estudos, ainda é pouco conhecida a função e as vias neuroquímicas pelas quais o PMV atua na modulação das respostas desencadeadas pela exposição feromonal.

Entre os neurotransmissores que conhecidamente modulam aspectos do sistema reprodutivo e que são expressos no PMV estão o CART e o NO (Vincent, Kimura, 1992; Nelson *et al.*, 1995; Vincent, 1995; Yokosuka, Hayashi, 1996; Yu *et al.*, 1997a; Lebrethon *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2001). Cavalcante, Bittencourt e Elias (2006) observaram que a expressão do RNAm de CART no PMV de ratos machos é significativamente aumentada após exposição ao odor de fêmeas. Fibras imunorreativas ao CART fazem aposição a neurônios que expressam GnRH (Leslie *et al.*, 2001), que por sua vez são responsáveis pela regulação da concentração das gonadotrofinas. Além disso, foi observado que parte dessas fibras tem o PMV como local de origem (Rondini *et al.*, 2004). Já em relação ao NO, este é um neurotransmissor que está relacionado com a modulação de diversos comportamentos motivados (Nelson *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1998; McCann *et al.*, 1999). Além disso, cerca de 90% dos neurônios imunorreativos ao CART no PMV também expressam enzimas que sintetizam NO, demonstrando que essas populações de neurônios são praticamente as mesmas (Cavalcante, 2006). Assim, é possível que neurônios CART/NO no PMV sejam responsáveis pela modulação da resposta feromonal.

Já no MEA, pode-se encontrar a expressão de diversos neurotransmissores, incluindo o NO e o peptídeo urocortina 3 (Ucn 3) (Vincent, Kimura, 1992; Vincent, 1995; Li *et al.*, 2002; Cavalcante *et al.*, 2006). A Ucn 3 faz parte da família do fator de liberação de corticotrofina (CRF), sendo um ligante do receptor de CRF do tipo 2 (Lewis *et al.*, 2001). Sua função ainda não está esclarecida, mas alguns estudos relacionaram a Ucn 3 a funções vegetativas, como a atividade autonômica e a ingestão alimentar (Lewis *et al.*, 2001; Valdez *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2004). Cavalcante *et al.* (2006) observaram que o PMV é densamente innervado por fibras imunorreativas à Ucn 3 e que essas fibras têm como principal local de origem o MEA. Dessa forma, uma vez que há evidências de que o circuito neural formado entre o MEA e o PMV modula a resposta feromonal, é possível que a Ucn 3 seja um dos mediadores neuroquímicos deste sistema.

Além das evidências anteriormente descritas, relacionando o PMV ao comportamento sexual, existem estudos associando o PMV na modulação do comportamento agressivo (entre machos da mesma espécie). Por exemplo, van den Berg *et al.* (1983) constataram que lesões relativamente restritas à região pré-mamilar provocaram aumento no comportamento agressivo entre machos da mesma espécie. Estudos mais recentes observaram a expressão da proteína Fos no PMV de hamsters e ratos após o comportamento agonístico (Kollack-Walker, Newman, 1995; Veening *et al.*, 2005). Assim, ao mesmo tempo em que o PMV tem sido relacionado com o processamento da informação feromonal durante o comportamento reprodutivo, é bem provável que o PMV também esteja envolvido com a resposta feromonal em comportamentos agressivo ou de defesa (entre dois machos).

Finalmente, uma característica bastante interessante sobre o PMV, já mencionada anteriormente, é que essa região apresenta ampla expressão da forma ativa do receptor de leptina (LepR) (Elmqvist *et al.*, 1998a). Nesse sentido, é tentador especular que o PMV possa integrar informações a respeito do estado nutricional (por meio da leptina), junto com informações feromonais (através das inter-relações que o PMV possui com o MEA e algumas regiões do BST) para modular aspectos comportamentais, ainda mais que já é sabido que a expressão do comportamento sexual é sensível à disponibilidade de alimentos (Gill, Rissman, 1997; Jones, Wade, 2002).

2.2 Objetivo

Os experimentos do presente capítulo têm como objetivo identificar, com o uso da proteína Fos, algumas vias neuroquímicas em potencial relacionadas com a resposta à exposição feromonal. Além disso, visa-se estudar possíveis diferenças em relação à neuroquímica ativada quando ratos machos são expostos ao odor de fêmeas ou de outros machos. Cabe ressaltar que será dada ênfase na análise do MEA e do PMV e dos neuromoduladores envolvidos com este circuito, como por exemplo, Ucn 3 e NO.

2.3 Delineamento Experimental

Este estudo utilizou ratos machos e adultos da linhagem Wistar. O paradigma de exposição ao odor (feromônios) está detalhado na sessão Material e Métodos, mas, resumidamente, consistiu na exposição dos ratos durante aproximadamente 90 min a uma caixa onde outros animais adultos estiveram alojados por cerca de uma semana. Dessa forma, os ratos expostos ao odor de outros animais tiveram ativado todo o circuito neural relacionado com a resposta feromonal. Os animais do grupo controle foram expostos a uma caixa limpa. Posteriormente a esta exposição, os animais foram perfundidos transcardiacamente e seus encéfalos processados e analisados.

Analisaram-se dois níveis rostro-caudal do MEA: núcleo medial da amígdala antero-dorsal (MEAad) e núcleo medial da amígdala postero-dorsal (MEApd). A análise do PMV também foi segmentada em: porção anterior e posterior. Além da contagem da expressão de imunorreatividade à proteína Fos (Fos-ir), determinou-se o total e o percentual de neurônios imunorreativos à urocortina 3 (Ucn 3-ir) que co-expressaram Fos. O mesmo ocorreu com neurônios que apresentaram atividade à enzima NADPHd.

Este experimento compreende três grupos experimentais:

- Grupo Odor-M ➔ machos expostos ao odor de outros machos ($n = 5$);
- Grupo Odor-F ➔ machos expostos ao odor de fêmeas ($n = 6$);
- Grupo Controle ➔ animais expostos apenas à caixa limpa ($n = 8$).

2.4 Resultados

2.4.1 Fos-ir em resposta à exposição ao odor

O grupo Odor-F apresentou Fos-ir maior que os grupos Controle e Odor-M no MEAad. No MEApd, ambos os odores induziram Fos-ir, embora os animais do grupo Odor-F apresentaram maior Fos-ir (Figura 25). Observou-se padrão distinto de distribuição de Fos-ir, entre os grupos Odor-F e Odor-M, em termos das camadas do MEApd. Enquanto que os animais expostos ao odor de fêmeas apresentaram densa distribuição de neurônios Fos-ir na camada medial (próximo ao trato óptico, Figura 26F), os animais expostos ao odor de machos apresentaram Fos-ir, principalmente nas camadas laterais do MEApd (Figura 26D). Ambos os odores induziram Fos-ir por toda extensão do PMV (Figura 27C-F). Contudo, foi observado maior Fos-ir no grupo Odor-F, comparado ao Odor-M (Figura 25). Foi encontrada pequena expressão de Fos-ir no MEA e no PMV do grupo Controle (Figura 25, Figura 26 e Figura 27).

Figura 25. Efeitos da estimulação do odor de machos e fêmeas no núcleo medial da amígdala (MEA) e no núcleo pré-mamilar ventral (PMV) em ratos machos.

Gráficos de barra mostrando a quantificação de neurônios imunorreativos ao Fos nas subdivisões antero-dorsal e postero-dorsal do MEA (MEAad e MEApd, respectivamente), bem como nos níveis rostral e caudal do PMV. * $P < 0,05$ vs. Controle; # $P < 0,05$ vs. ratos expostos ao odor de outros machos.

Figura 26. Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo medial da amígdala (MEA) em ratos machos.

A-F, Fotomicrografias de campo claro mostrando a distribuição de Fos-ir em duas subdivisões do MEA em animais Controle (A-B), em ratos expostos ao odor de machos (C-D) e em ratos expostos ao odor de fêmeas (E-F). Abreviações: LHA, área hipotalâmica lateral; MEAad, porção antero-dorsal do MEA; MEApd, porção postero-dorsal do MEA; opt, trato óptico. Escala = 400 μ m.

Figura 27. Distribuição de imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo pré-mamilar ventral (PMV) em ratos machos.

A–F, Fotomicrografias de campo claro mostrando a distribuição de Fos-ir em dois níveis do PMV em animais Controle (A–B), em ratos expostos ao odor de machos (C–D) e em ratos expostos ao odor de fêmeas (E–F). Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; Arc, núcleo arqueado; cPMV, nível caudal do PMV; rPMV, nível rostral do PMV. Escala = 400 μ m.

2.4.2 Caracterização dos neurônios do MEA responsivos ao odor

Foi encontrada ampla distribuição de neurônios que expressam atividade da NADPHd no MEAad e na camada medial do MEApd. Observamos que muito poucos neurônios co-expressaram atividade da NADPHd e Fos-ir no grupo Odor-M (os valores não foram significativamente diferentes aos observados no grupo Controle). Por outro lado, uma co-localização significativamente maior foi encontrada no grupo Odor-F, especialmente no MEApd (Tabela 5 e Figura 28D). Virtualmente, nenhuma co-localização entre NADPHd e Fos-ir foi observada no grupo Controle.

Tabela 5. Neurônios que coexpressam atividade à NADPH diaforase (NADPHd) e imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo medial da amígdala e núcleo pré-mamilar ventral em ratos machos.

Região	Nível	Neurônios que co-expressaram NADPHd e Fos-ir			
	no	Grupo Odor-M		Grupo Odor-F	
	Atlas	Número	Proporção	Número	Proporção
MEAad	28/27	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,5%	2,7 ± 0,6*	4,1 ± 0,9%* [#]
MEApd	31/29	2,2 ± 0,9	2,6 ± 0,9%	9,4 ± 2,1* [#]	10,6 ± 1,7%* [#]
PMVr	33/32	21,6 ± 5,3*	13,8 ± 2,7%*	28,0 ± 3,9*	19,1 ± 1,7%*
PMVc	34/33	16,6 ± 6,9*	10,7 ± 3,3%*	15,8 ± 2,3*	18,4 ± 2,4%*

Valores representam a contagem média ± E.P.M. ($n = 5$ para o grupo Odor-M e $n = 6$ para o grupo Odor-F). Abreviações: MEAad, porção antero-dorsal do núcleo medial da amígdala; MEApd, porção postero-dorsal do núcleo medial da amígdala; rPMV, nível rostral do núcleo pré-mamilar ventral; cPMV, nível caudal do núcleo pré-mamilar ventral. As designações dos níveis dos atlas correspondem àquelas descritas por Paxinos e Watson (1997) e Swanson (1992), respectivamente. * $P < 0,05$ vs. Controles. # $P < 0,05$ vs. ratos expostos ao odor de outros machos. Ratos do grupo Controle apresentaram virtualmente nenhuma dupla marcação e, portanto, esses dados não foram mostrados.

Conforme já descrito (Li *et al.*, 2002), foi encontrada Ucn 3-ir no MEAad (Figura 28A) e no MEApd, principalmente em sua porção lateral (camadas profundas; Figura 28B). É interessante mencionar que Cavalcante (2006) não observou co-localização significativa entre a atividade de NADPHd e Ucn 3-ir no MEA. Em todos os grupos, foi observado que apenas poucos neurônios Ucn 3-ir co-expressam Fos-ir (Figura 28C). Não foi encontrada diferença entre os grupos em relação ao número ou a proporção de neurônios Ucn 3-ir que co-expressam Fos-ir no MEApd (Tabela 6). Entretanto, no MEAad, observou-se que o número e a proporção dos neurônios Ucn-ir que co-localizam Fos-ir foi significativamente menor no grupo Odor-F, comparado ao grupo Controle (Tabela 6).

2.4.3 Caracterização dos neurônios do PMV responsivos ao odor

Observou-se que o PMV contém uma densa população de neurônios que expressam atividade da NADPHd (Figura 28E). Parte desses neurônios (10 a 19%) co-localiza com Fos-ir, tanto nos animais expostos ao odor de machos, quanto de fêmeas (Tabela 5, Figura 28F). Praticamente, não foi encontrada co-expressão de NADPHd e Fos-ir no grupo Controle.

Tabela 6. Neurônios que coexpressam imunorreatividade à urocortina 3 (Ucn 3-ir) e imunorreatividade ao Fos (Fos-ir) no núcleo medial da amígdala em ratos machos.

Região	Neurônios que co-expressaram Ucn 3-ir e Fos-ir					
	Grupo Controle		Grupo Odor-M		Grupo Odor-F	
	Número	Proporção	Número	Proporção	Número	Proporção
MEAad	2,3 ± 0,6	16,9 ± 4,0%	1,4 ± 0,6	6,8 ± 2,9%	0,3 ± 0,2*	1,8 ± 1,2%*
MEApd	1,6 ± 0,5	7,5 ± 2,0%	1,4 ± 0,5	6,1 ± 2,0%	1,0 ± 0,2	5,0 ± 1,3%

Valores representam a contagem média ± E.P.M. ($n = 8$ para o grupo Controle, $n = 5$ para o grupo Odor-M e $n = 6$ para o grupo Odor-F). Abreviações: MEAad, porção antero-dorsal do núcleo medial da amígdala; MEApd, porção postero-dorsal do núcleo medial da amígdala; Nesta análise foi utilizados os mesmos níveis de atlas indicados na Tabela 5. * $P < 0,05$ vs. Controles.

Figure 28. Neuroquímica dos neurônios responsivos ao odor no núcleo medial da amígdala e no núcleo pré-mamilar ventral.

A, Fotomicrografias de campo claro mostrando a distribuição de neurônios imunorreativos ao Fos (Fos-ir) e à urocortina 3 (Ucn-ir, conjunto de células indicados pelas flechas) na subdivisão antero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEAad). **B,** Fotomicrografias de campo claro mostrando a Fos-ir e a Ucn3-ir na porção postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEApd) em ratos machos expostos ao odor de fêmeas. Notar que, enquanto a expressão de Fos-ir concentra-se nas proximidades do trato óptico, os neurônios imunorreativos à Ucn3 estão distribuídos (flechas indicam conjunto de neurônios que expressam Ucn3-ir) nas camadas mais laterais do MEApd. **C,** Fotomicrografia de campo claro mostrando o diferente padrão de distribuição de Fos-ir e Ucn3-ir no MEApd de ratos machos expostos ao odor de fêmeas. Notar que praticamente todos os neurônios Ucn3-ir não co-localizam com Fos-ir (flechas). **D,** Fotomicrografias de campo claro de ratos machos expostos ao odor de fêmeas mostrando neurônios que expressam atividade da enzima NADPH diaforase (NADPHd, citoplasma azul) e Fos-ir (núcleo preto, flechas horizontais) no MEApd. Os neurônios que expressam atividade da NADPHd no MEApd estão próximos ao trato óptico. Notar a presença de células marcadas apenas com NADPHd (flechas verticais). **E,** Fotomicrografias de campo claro mostrando a distribuição de neurônios que expressam atividade da NADPHd no núcleo pré-mamilar ventral (PMV). **F,** Fotomicrografias de campo claro mostrando neurônios que expressam atividade da NADPHd (citoplasma azul) e Fos-ir (núcleo preto, flechas horizontais) no PMV, em resposta ao estímulo do odor de machos. Notar a presença de neurônios marcados apenas com NADPHd (flechas verticais). Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; f, fórnice; opt, trato óptico. Barras de escala: A,B,E = 500 μ m; C = 200 μ m; D,F = 100 μ m.

2.5 Discussão

No presente experimento, ratos machos sexualmente inexperientes foram utilizados para comparar a distribuição e as características neuroquímicas dos neurônios do MEA e do PMV responsivos à estimulação do odor de machos e de fêmeas. Foi observado que os neurônios do MEA e do PMV expressam Fos-ir em resposta aos odores de machos e fêmeas, embora o número de neurônios Fos-ir tenha sido maior, em ambos os núcleos, após a exposição ao odor de fêmeas. No MEA, neurônios que expressam atividade da NADPHd co-localizam com a proteína Fos apenas em resposta ao odor de fêmeas, enquanto que neurônios Ucn 3-ir não expressam Fos-ir em nenhuma das situações pesquisadas. Além disso, parte dos neurônios do PMV que apresentam atividade da NADPHd co-expressam Fos-ir após exposição a ambos os odores.

2.5.1 Neurônios do MEA_{pd} que expressam atividade da NADPHd respondem apenas à estimulação do odor de fêmeas

A ação desempenhada pelo MEA na regulação das funções reprodutivas é amplamente reconhecida (Beltramino, Taleisnik, 1983; Wood, Coolen, 1997; Kondo, Sachs, 2002). O MEA é uma estação de segunda ordem das projeções vomeronasais, contém receptores de esteróides gonadais e facilita o comportamento sexual do macho, quando recebe administração de estradiol. Dessa forma, o MEA integra informações hormonais e feromonais (Scalia, Winans, 1975; Simerly *et al.*, 1990; Rasia-Filho *et al.*, 1991; Wood, 1996; Wood, Coolen, 1997). Contudo, o MEA é anatômica e funcionalmente heterogêneo. Enquanto que a porção posterior do MEA parece estar relacionada com estimulações específicas, como o reconhecimento do odor de conspecíficos, a porção anterior do MEA está aparentemente envolvida com o estado de alerta e com a modulação de comportamentos sociais inespecíficos (Newman, 1999; Meredith, Westberry, 2004). Halem, Cherry e Baum (1999) mostraram que, em camundongos machos castrados e tratados com estradiol, o odor de machos ativa os neurônios do MEA_{ad}, mas não os do MEA_{pd}. Os resultados do presente experimento mostram uma relação contrária em ratos expostos ao odor de outros machos, uma vez que a Fos-ir aumentou apenas no MEA_{pd}. É possível que o tratamento com estradiol aumente a responsividade ao odor no MEA_{ad} de machos. Todavia, o processamento sensorial também pode ser diferente entre espécies. Deve-se salientar que a ativação do MEA_{pd} observado nos ratos expostos ao odor de outros machos foi similar, embora em menor magnitude, ao

encontrado após o comportamento agonístico (Kollack-Walker, Newman, 1995; Veening *et al.*, 2005). Portanto, a ativação do MEApd de ratos expostos ao odor de outros machos pode representar um importante passo na inicialização do comportamento agressivo.

Com relação à resposta dos ratos ao odor de fêmeas, observamos que a Fos-ir está aparentemente mais concentrada nos aspectos mediais do MEApd, em concordância com o achado de outros trabalhos (Kollack-Walker, Newman, 1995; Coolen *et al.*, 1997; Kollack-Walker, Newman, 1997). Neurônios que expressam enzimas que sintetizam NO – óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e NADPHd – também estão concentrados nas adjacências do trato óptico e uma parcela desses neurônios expressou Fos-ir apenas após a exposição ao odor de fêmeas. Scordalakes, Shetty e Rissman (2002) mostraram que os neurônios no MEApd que expressam nNOS são regulados por esteróides gonadais e, conseqüentemente, estão envolvidos com a resposta aos hormônios que sinalizam o estado reprodutivo do organismo. Injeções de traçadores anterógrados confirmaram que o MEApd envia densas projeções ao PMV (Canteras, Simerly e Swanson, 1992; Coolen, Wood, 1998), indicando que os neurônios com atividade da NADPHd e sensíveis aos hormônios sexuais são ativados pela exposição feromonal e participam do circuito MEA-PMV.

Os neurônios Ucn 3-ir estão distribuídos lateralmente, na camada mais profunda do MEApd. Foi observado que essas células não co-expressam Fos-ir em resposta aos odores, tanto de machos, quanto de fêmeas. Em outro experimento realizado em nosso laboratório, Cavalcante (2006) encontrou que os neurônios Ucn 3-ir constituem uma população distinta daqueles que sintetizam NO. A Ucn 3 é um peptídeo da família do CRF e sua função tem sido relacionada com a modulação das respostas ao estresse, à ingestão de alimentos e à atividade autonômica (Lewis *et al.*, 2001; Bale *et al.*, 2002; Valdez *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2004). A localização dos neurônios Ucn 3-ir motivou-nos a examinar sua função na circuitaria feromonal. Embora não tenha sido encontrada Fos-ir nos neurônios Ucn 3-ir, já foi mencionado anteriormente que o uso de Fos apresenta algumas limitações. Por exemplo, a expressão de Fos não permite a identificação de vias inibitórias, que representam importante parcela das funções neurais (Chan *et al.*, 1993; Kovacs, Sawchenko, 1993). Portanto, a falta de Fos-ir em uma região não descarta a possibilidade de que neurônios naquela área estejam envolvidos com o estímulo. Diversos estudos têm indicado que a porção lateral do MEApd é ativada após a intromissão seguida de ejaculação (Fernandez-Fewell, Meredith, 1994; Coolen, Peters e Veening, 1996; Coolen *et al.*, 1997; Pfau, Heeb, 1997). Assim, o MEApd pode estar relacionado com a consumação do comportamento sexual de machos e com a saciedade sexual

(Parfitt, Newman, 1998). Outros experimentos ainda são necessários com o intuito de examinar mais profundamente a importância da Ucn 3 nessas funções.

2.5.2 Os neurônios do PMV que expressam atividade da NADPHd respondem à estimulação feromonal

Um grande número de neurônios do PMV expressa receptores de andrógenos e mantém conexões recíprocas com áreas relacionadas com a reprodução, resposta ao odor e dimorfismo sexual (Simerly *et al.*, 1990; Canteras, Simerly e Swanson, 1992). Os autores de estudos envolvendo extensas lesões eletrolíticas na região pré-mamilar em ratos machos têm postulado que o PMV é importante na expressão da agressividade entre conspecíficos (van den Berg, ter Horst e Koolhaas, 1983). Entretanto, não existem trabalhos nos quais foram realizadas pequenas lesões químicas, confinadas dentro dos limites do PMV, que tenham confirmado esta hipótese. Em hamsters, neurônios do PMV apresentam Fos-ir em resposta, tanto à cópula, quanto à comportamentos agonísticos (Kollack-Walker, Newman, 1995; Veening *et al.*, 2005). Todavia, no presente experimento foi observado que, no PMV de ratos machos, a exposição ao odor de fêmeas induziu consistentemente um maior grau de Fos-ir, comparado ao odor de outros machos.

O PMV contém uma densa concentração de neurônios que expressam NO e a maioria dessas células também apresenta receptores de andrógenos (Yokosuka, Hayashi, 1996), o que faz com que esses neurônios sejam sensíveis à concentração dos esteróides gonadais. Tem sido demonstrado que o NO induz a secreção de GnRH e favorece o comportamento sexual em roedores machos e fêmeas (McCann *et al.*, 1999). Além disso, a administração de inibidores de nNOS diminuem a incidência de montas e impede a ejaculação em ratos machos (Sato *et al.*, 1998). Em outro trabalho de nosso laboratório, foi demonstrado que fibras do PMV fazem aparente contato sináptico com neurônios que expressam GnRH em ratos de ambos os sexos (Rondini *et al.*, 2004). Assim, baseado nessas evidências, somadas aos resultados encontrados no Capítulo 1, sugerimos que os neurônios do PMV apresentam função modulatória sobre a secreção de GnRH. Contudo, os efeitos do NO nesta circuitaria ainda merece uma investigação mais detalhada.

Observou-se que neurônios do PMV que expressam atividade da NADPHd respondem à estimulação do odor de fêmeas e de machos, embora a proporção tenha sido maior após o odor de fêmeas. Em estudo anterior de nosso laboratório, Cavalcante, Bittencourt e Elias (2006) observaram que neurônios imunoreativos ao CART no PMV co-expressam Fos-ir após

exposição ao odor de fêmeas. Além disso, CART e NADPHd apresentam grande co-localização no PMV, representando, praticamente a mesma população de células (Cavalcante, 2006).

A concentração de LH circulante está aumentada em ratos machos expostos ao odor de fêmeas (Kamel *et al.*, 1977; Purvis, Haynes, 1978). Ademais, Beltramino e Taleisnik (1985) observaram que a lesão do PMV de ratos bloqueia a secreção de LH induzida pela estimulação elétrica do MEA, sugerindo que a interação PMV-MEA medeia a liberação de LH induzida por feromônios. Os neurônios que expressam CART no PMV são ativados pela leptina (Bjorbaek *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2001) e grande parte dos terminais imunoreativos ao CART distribuídos em áreas relacionadas com o controle reprodutivo tem o PMV como local de origem (Rondini *et al.*, 2004). Como anteriormente mencionado, a redução nos níveis de leptina causa hipogonadismo e infertilidade (Zhang *et al.*, 1994; Ahima *et al.*, 2000). Dessa forma, todas essas evidências indicam que o PMV tem plena capacidade de intermediar os efeitos de mudanças na leptina circulante no controle da secreção de LH. Portanto, estes achados sugerem que os neurônios que co-expressam CART e NO no PMV integram sinais sensoriais (feromônios) e de hormônios circulantes e, por conseguinte, podem modular as respostas neuroendócrinas provocadas pela estimulação feromonal entre conspecíficos.

3 CONCLUSÕES

Os resultados dos diversos experimentos realizados no presente trabalho indicam que:

1. A lesão bilateral do PMV causa:

- a. Alterações morfo-funcionais relativas ao ciclo estral
 - ✓ Anestro (temporário) após a lesão
 - ✓ Alteração em parâmetros histológicos do ovário indicativos de maturação folicular
 - ✓ Perda da variação na ingestão alimentar ao longo do ciclo estral
- b. Supressão dos eventos neuroendócrinos que ocorrem durante o pico pré-ovulatório do LH
 - ✓ Diminuição do estradiol e do LH;
 - ✓ Diminuição da ativação de neurônios relacionados ao controle do eixo HHG;
- c. Bloqueio da ação da leptina sobre a liberação do LH durante o jejum

2. A exposição de machos a odores (feromônios) de outros machos ou de fêmeas da mesma espécie induz:

- a. Ativação (expressão de Fos) de neurônios do PMV (em maior número após odor de fêmea do que de macho);
- b. Ativação de neurônios NADPHd/CART no PMV (parte desses neurônios coexpressa o LepR);
- c. Resposta diferenciada dos neurônios nitrérgicos do MEA (emitem densa projeção para o PMV).

Assim, nossos achados mostraram que o PMV exerce papel relevante na regulação do sistema reprodutivo e media ao menos parte da ação estimulatória da leptina sobre o eixo HHG. Além disso, o PMV faz parte do circuito neural relacionado com a resposta aos feromônios (Figura 29).

Figura 29. Ilustração que resume o circuito neuroendócrino, no qual o núcleo pré-mamilar ventral (PMV) faz parte, segundo os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2.

Este esquema mostra que, ao integrar informações referentes à condição do sistema reprodutivo (expressão de receptores dos hormônios sexuais), do balanço energético (LepR) e de sinais químicos do ambiente (feromônios), o PMV possui características ideais para modular o eixo reprodutivo por meio de suas densas projeções, seja indiretamente para áreas que controlam o sistema reprodutivo (AVPV, por exemplo) ou diretamente para os neurônios secretores de GnRH. A fotomicrografia (campo escuro) que representa o AVPV mostra as projeções do PMV para este núcleo, após injeção de traçador anterógrado no PMV (BDA a 10%). Abreviações: 3v, terceiro ventrículo; AVPV, núcleo periventricular ântero-ventral; f, fórnice; FSH, hormônio folículo estimulante; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; LepR, receptor de leptina; LH, hormônio luteinizante; OX, quiasma óptico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os animais da linhagem Wistar foram fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Já os ratos da linhagem Sprague-Dawley foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Anatomia do ICB/USP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade (12 horas claro/ 12 horas escuro). Utilizou-se ratos da linhagem Sprague-Dawley nos experimentos do Capítulo 1 e animais da linhagem Wistar nos experimentos do Capítulo 2. Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP.

4.2 Implante Estereotáxico de NMDA para Lesão do PMV

Os animais foram anestesiados com ectesin (0,3 mL/100 g), que é uma mistura de pentobarbital sódico (Cristália, São Paulo, Brasil) e hidrato de cloral, administrado i.p. Posteriormente, foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante estereotáxico bilateral de solução, preparada em água destilada, com NMDA (Sigma, St. Louis, EUA) a 0,15 M, no PMV. Os implantes foram feitos com o uso de micropipetas de vidro com diâmetro interno de ponta na ordem de 30-40 μ m, mediante aplicação de -8μ A de corrente pulsátil (7 seg. ligado; 7 seg. desligado) durante 15 minutos, proveniente de uma fonte de corrente elétrica (modelo CS3, Midgard Eletronics, Watertown, EUA). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém a micropipeta foi preenchida com salina (cloreto de sódio a 0,9%). A confirmação da área lesada foi feita pela técnica de coloração com tionina. Em alguns experimentos, também foi realizada confirmação funcional da lesão pela marcação da enzima NADPHd, amplamente expressa pelos neurônios do PMV, ou pela imunorreatividade ao pSTAT3, após administração central de leptina. Posteriormente à cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais dentro de salas de teste climatizadas e com livre acesso à água e ração.

4.3 Canulação e Administração Intracerebroventricular

Os animais, após aproximadamente três semanas de recuperação à primeira cirurgia estereotáxica (lesão do PMV ou cirurgia controle), foram anestesiados com solução contendo cetamina (5 mg/100 g), xilazina (1 mg/100 g) and acepromazina (0,2 mg/100 g). Três pequenos parafusos de aço inoxidável foram fixados ao crânio para ancorar a prótese cirúrgica e, em seguida, as ratas receberam, por meio de procedimento estereotáxico, uma cânula-guia (Plastics One, Roanoke, EUA) de aço inoxidável de 0,71 mm de diâmetro externo e 0,39 mm de diâmetro interno no ventrículo lateral direito, utilizando-se as coordenadas em relação à posição do bregma: antero-posterior (–0,4 mm), médio-lateral (–1,4 mm) e dorso-ventral (–3,8 mm). A cânula-guia foi presa ao crânio com o uso de resina acrílica autopolimerizante (Clássico, São Paulo, Brasil) e a seguir fechada com uma cânula “dummy” para garantir a permeabilidade da cânula-guia.

Para administração intracerebroventricular de leptina ou salina, os animais foram habituados durante aproximadamente uma semana a manipulações diárias da cânula-guia para reduzir o estresse no dia do experimento. No dia do teste, a cânula-dummy foi removida e no lugar foi inserida a cânula de injeção (0,18 mm de diâmetro externo e 0,36 mm de diâmetro interno, Plastics One), ligada a um tubo de polietileno (PE50, Clay Adams, Beckton Dickinson, Parsippany, EUA) já preenchido com 10 µL de solução de leptina (1 µg/µL, Sigma) ou salina e acoplado a uma microseringa de 100 µL (Hamilton Company, Reno, EUA). Cabe ressaltar que usou-se cânulas novas para cada animal e catéteres diferentes para aplicação de salina ou leptina. Após dois minutos de recuperação do animal à inserção da cânula de injeção, a solução contendo leptina ou salina foi administrada manual e lentamente, com o uso da seringa de Hamilton, a fim de que todo o volume (10 µL de solução) fosse aplicado durante um minuto. Depois de cinco minutos, a cânula de injeção foi removida e a cânula-guia foi novamente fechada com a cânula “dummy”.

4.4 Ovariectomia

Os animais ovariectomizados foram operados imediatamente antes da cirurgia estereotáxica para lesão do PMV ou cirurgia falsa. Cada ovário foi removido por meio de incisão abdominal (aproximadamente 1 cm de comprimento) na adjacência ao mesmo. Imediatamente antes da remoção dos ovários, o suprimento sanguíneo foi interrompido por

meio de firmes nós, utilizando-se linha cirúrgica estéril. A camada muscular do abdômen foi suturada com linha cirúrgica e a camada cutânea com cliques metálicos. As fêmeas receberam analgésico (Paracetamol) nos bebedouros durante uma semana após a cirurgia.

4.5 Canulação Endovenosa

Para a canulação endovenosa, os animais foram anestesiados com solução contendo cetamina (5 mg/100 g), xilazina (1 mg/100 g) and acepromazina (0,2 mg/100 g). Após a exposição da veia jugular externa, um catéter de silicone contendo salina e heparina foi introduzido no vaso através de um pequeno corte e avançado até o átrio direito para permitir repetidas coletas de sangue. A cânula foi fixada por meio de dois nós, utilizando-se linha cirúrgica e a extremidade livre da cânula foi exteriorizada entre as escápulas e vedada com um plugue metálico estéril.

4.6 Determinação do Consumo de Ração e do Peso Corporal

O consumo diário de ração foi determinado pela pesagem da ração peletizada, disponibilizada diariamente para os animais que estavam em caixas individuais, e das sobras de um dia para o outro. A medida do consumo diário de ração teve início após três semanas de recuperação do animal à cirurgia estereotáxica e foram avaliados 20 dias consecutivos. Calculou-se a média de todo o período e o consumo de ração em cada dia do ciclo estral (diestro, proestro e estro). Além disso, os animais foram pesados semanalmente, do dia da cirurgia até o dia da perfusão.

4.7 Análise do Comportamento Sexual

O comportamento sexual foi mensurado quando a fêmea se encontrava na fase escura do dia do proestro (transição do proestro para o estro), que é caracterizado pela receptividade sexual da fêmea (Pfaff *et al.*, 2006). O proestro foi verificado por meio de esfregaço vaginal, realizado no período da manhã. Constatado o proestro, a rata foi testada em uma sala própria para testes de comportamento, com apenas uma luz vermelha acesa. O teste teve início após 90 minutos do término da fase clara do dia. As fêmeas foram gentilmente colocadas e mantidas em habituação durante 30 minutos em uma caixa de acrílico transparente (dimensões: 40 cm de

largura $\times$ 40 cm de altura $\times$ 60 cm de comprimento), contendo uma pequena camada de maravalha. Passado esse tempo, um macho sexualmente experiente foi colocado dentro da caixa e o comportamento da fêmea foi avaliado durante o período correspondente às 10 primeiras montas ou quando o teste atingisse 30 minutos. Caso as 10 montas ocorressem antes de 30 minutos, os machos eram removidos da caixa e a fêmea era deixada sozinha até que o tempo de teste atingisse 30 minutos. Foram avaliados os comportamentos de lordose da fêmea, mediante as tentativas de monta do macho, e de proceptividade da fêmea à presença do macho. Especificamente, foi determinado o percentual de montas que resultaram na expressão do comportamento de lordose pela fêmea. Além disso, em relação à proceptividade, que indica o quanto a fêmea “se apresenta”, “se expõe” ou “solicita” o macho (Pfaff *et al.*, 2006), foi avaliado se a fêmea apresentou alguns comportamentos sexuais estereotipados, como saltos e corridas (*dartings* e *hoppings*), seguidas de paradas abruptas em frente ao macho assumindo postura genuflexa com exposição da porção posterior do dorso para induzir a perseguição do macho, seguida de monta, solicitações e movimentos com a cabeça, junto a vibrações com as orelhas (*ear wiggings*) (Pfaff *et al.*, 2006). Posteriormente, as fêmeas foram levadas para a sala de perfusão, anestesiadas, pesadas e ainda foi realizado mais um esfregaço vaginal para a verificação da presença de espermatozóides, o que indicaria ejaculação do macho.

4.8 Análise do Ciclo Estral

O ciclo estral das ratas foi determinado por meio da técnica de esfregaço vaginal, que consiste na introdução de uma pipeta de plástico no canal vaginal para a aplicação e imediata coleta de um pequeno volume de salina (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002). O líquido coletado foi colocado em lâminas de vidro e observado no microscópio com aumento de 10 $\times$ para a avaliação do perfil das células presentes. Pelo tipo de célula predominante foi possível identificar a fase que a rata se encontrava em seu ciclo estral (Maeda, Ohkura e Tsukamura, 2000; Freeman, 2006). Caso houvesse predominância de leucócitos a fêmea se encontrava no diestro; predominância de células nucleadas epiteliais caracterizava o proestro e o estro foi caracterizado pela grande quantidade de células cornificadas (descamadas). Nos animais sacrificados na tarde do proestro ou no diestro, a avaliação do ciclo estral teve início cerca de uma semana antes da cirurgia e prosseguiu sem interrupção até o sacrifício dos animais.

4.9 Paradigma de Exposição ao Odor (Feromônios)

Os ratos machos, com idade adulta (aproximadamente 90 dias de vida), foram colocados em caixas individuais e habituados a trocas diárias para caixas limpas, com o objetivo de diminuir o estresse no dia do experimento. Após uma semana de habituação, os animais foram transferidos para uma caixa onde um macho adulto ou uma fêmea adulta, dependendo do grupo, havia permanecido durante uma semana. Os animais controle foram transferidos novamente para uma caixa limpa. Cerca de 90-120 minutos após essa troca, os animais foram anestesiados e perfundidos. Todo experimento, com exceção da perfusão, ocorreu em uma sala de teste que possui isolamento adequado para este tipo de estudo.

4.10 Perfusão

Os animais foram perfundidos transcardiacamente, inicialmente com salina (aproximadamente 100 mL) e, posteriormente, com cerca de 1 litro de fixador a 4°C durante 25 minutos. O fixador foi preparado a partir de paraformaldeído a 4% e tampão de tetraborato de sódio (bórax) a 3,8%, pH 9,5. Os encéfalos foram dissecados e pós-fixados na mesma solução usada na perfusão durante 1-2 horas. Os encéfalos ainda sofreram tratamento de crioproteção *overnight* em solução de tampão fosfato de sódio (PBS) + 20% de sacarose. Finalmente, os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelação na espessura de 30 µm e separados em cinco séries. Todo o material foi processado com o cuidado para não contaminação com RNase e, posteriormente, mantido em freezer a -20°C em solução anti-congelante (50% PBS, 30% etilenoglicol e 20% glicerina).

4.11 Métodos Histoquímicos

Para identificação da citoarquitetura do encéfalo foi utilizada a técnica de coloração com tionina (método de Nissl). Para tanto, os tecidos foram montados em lâminas e deixados secar a 37°C *overnight*. Antes do mergulho do tecido na solução com tionina, o tecido foi desidratado em álcool etílico (2 banhos de 3 min em álcool a 95% e 3 banhos de 3 min em álcool absoluto) e deslipidificado em xilol (5 min no primeiro rack de xilol, 30 min no segundo rack e 5 min novamente no primeiro rack). Posteriormente, o tecido foi progressivamente reidratado em soluções decrescentes de álcool etílico (banhos de 2 min em: álcool absoluto, 3

vezes; 95%, 2 vezes; 70 e 50%, uma vez cada). Após o último álcool, o tecido foi mergulhado durante aproximadamente 1 min em solução preparada com tionina a 0,25%. Após esta etapa, o tecido foi mergulhado algumas vezes em água destilada para lavar o excesso de tionina e sofreu banhos rápidos em concentrações crescentes de álcool etílico, seguido por um mergulho de 3 min em xilol e, finalmente, as lâminas foram cobertas com DPX e lamínula.

Para a marcação dos neurônios que sintetizam NO, foi utilizada uma técnica que marca uma enzima-chave na síntese do NO, a NADPHd. Toda reação ocorreu com os tecidos na condição *free-floating*. O primeiro passo consistiu em 4 lavagens do tecido em PBS, onde foi deixado agitando *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram mantidos em estufa a 37°C, protegidos da luz e mergulhados em solução preparada a partir de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,4, contendo: 0,1% de Triton X-100, 0,02% de nitroblue tetrazolium (Sigma) e 0,02% de NADPH β (Sigma). Os cortes permaneceram nesta condição até que a marcação fosse evidenciada por meio de observação no microscópio. Para terminar a reação, o tecido foi lavado algumas vezes em PBS. Posteriormente, o tecido foi montado em lâminas gelatinizadas ou iniciou-se o procedimento de imunohistoquímica, descrito a seguir.

Os ovários foram coletados e pós-fixados *overnigh* em solução preparada a partir de paraformaldeído a 4%. Os ovários foram processados em *paraplast* e cortados em micrótomo Leica RM 2145 na espessura de 5 μ m. Posteriormente, os tecidos passaram por banho a 4° C, seguido de banho a 42° C para serem colocados nas lâminas. Ainda, as lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por no mínimo 24 horas, seguido de mergulhos em xilol e em concentrações decrescentes de etanol, com o objetivo de desparafinar e reidratar os tecidos. Finalmente, os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (Tolosa *et al.*, 2003), desidratados em etanol e deslipidificados em xilol. As lâminas foram cobertas com DPX e lamínula. Analisou-se a ocorrência de folículos antrais (maduros) e corpos lúteos nos ovários (Junqueira, Carneiro, 2003).

4.12 Imunohistoquímica com a Técnica de Imunoperoxidase

As reações de imunohistoquímica foram realizadas com o tecido na condição *free-floating*. Antes da exposição ao anticorpo o tecido recebeu um pré-tratamento que consistiu em 2 lavagens de 10 min em solução de tampão fosfato de potássio (KPBS) para remover a solução anti-congelante dos cortes. Posteriormente, o tecido foi incubado durante 30 min em solução KPBS + 0,3% Triton X-100 contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio. O tecido foi

lavado diversas vezes em KPBS até que todas as bolhas resultantes da exposição ao peróxido de hidrogênio sumissem e após essa etapa o tecido foi incubado durante 1 hora em solução KPBS + 0,3% Triton X-100 contendo 3% de soro normal de burro (Jackson Laboratories, West Grove, EUA). Depois, foi adicionado, na mesma solução, o anticorpo primário, produzido em coelho e específico contra antígenos de rato. O tecido permaneceu incubado à temperatura ambiente por 18h no caso do anti-Fos (1:20.000, Ab5, Oncogene, Boston, EUA) e do anti-GnRH (1:5.000, DiaSorin, Stillwater, EUA). Já o anticorpo anti-Ucn 3 (#6570, gentilmente cedido pelos Drs. Wylie W. Vale e Joan Vaughan, The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, EUA) permaneceu incubado à 4°C por 66 horas na concentração 1:8.000 e o anti-pSTAT3 (Cell Signaling Technology, Danvers, EUA) permaneceu incubado à temperatura ambiente por 24 horas e à 4°C por 36 horas na concentração de 1:4.000. Especificamente para a marcação do pSTAT3, antes da incubação no anticorpo primário o tecido ainda foi pré-tratado em soluções de glicina (0,3%) e SDS (0,03%), durante 10 minutos cada.

Posteriormente à incubação com o anticorpo primário, o tecido sofreu 3 lavagens de 10 min em KPBS e foi então transferido para solução KPBS + 0,3% Triton X-100, contendo anticorpo secundário biotilado na concentração 1:1000 (Jackson Laboratories) produzido em burro contra IGg de coelho, onde permaneceu por 1 hora. Mais uma vez o tecido foi lavado 3 vezes em KPBS e incubado durante 1 hora em KPBS, acrescido do complexo avidina-biotina (Vector Labs, Burlingame, EUA) na concentração de 1:500. Após 3 lavagens em KPBS, foi realizada a reação, utilizando-se os reagentes: 0,05% de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,01% de peróxido de hidrogênio. Os tecidos foram mantidos em contato com o cromógeno DAB até que fosse constatada a eficácia da reação por meio de observação visual. A reação foi interrompida por meio de várias lavagens em KPBS. Nas reações para marcação do Fos e do pSTAT3 foi acrescido na solução 0,25% de sulfato de níquel. O uso do sulfato de níquel teve como objetivo escurecer a marcação e foi uma estratégia utilizada para a obtenção de colorações distintas nas duplas marcações. Vale lembrar que no caso das duplas reações de imunohistoquímica, a marcação da proteína Fos antecedeu as demais.

Após a coloração, os tecidos foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados secar em estufa a 37°C por um período mínimo de 18 horas. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico a 50%, 70%, 95% (2 vezes) e 100% (3 vezes) durante 3 min cada banho e deslipidificados com xilol (primeiro banho de 5 min e segundo de pelo menos 30 min). As lâminas foram então cobertas com DPX e lamínula.

4.13 Hibridização *In Situ* com ^{35}S

A técnica de hibridização *in situ* com ^{35}S foi utilizada para localização e quantificação de RNA mensageiros de interesse. Foi tomado cuidado para que todas as soluções utilizadas nesta metodologia estivessem livre de RNase ou tivessem sido preparadas a partir de água tratada com dietilpírocarbonato (DEPC) e auto-clavadas. As sondas foram geradas a partir de transcrição *in vitro*, utilizando ^{35}S -UTP e uma polimerase específica para o plasmídeo (T3, T7 ou SP6, Promega, Madison, EUA). As sondas foram purificadas em microcolunas de resina (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), após a digestão com RQ1 DNase (Promega), quando, então, foram diluídas em solução de hibridização (10^6 cpm/mL). A solução de hibridização consistiu de 50% formamida (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA), 0,01% de SDS, 0,01% de Na Thio, 0,2% de 5 M ditioneitol (DTT), 10 mM Tris-HCl (Gibco-BRL, Rockville, EUA), 0,01% DNA de espermatozoides de salmão, 0,01% RNase de levedura, 0,05% RNA total de levedura (Sigma), 10 mM DTT, 10% sulfato de dextran, 0,3 M cloreto de sódio (NaCl), 1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, pH 8,0) e 1 $\times$ solução de Denhardt (Sigma, St. Louis, EUA).

Previamente à hibridização, os tecidos foram montados em lâminas SuperFrost plus (Fisher Scientific) e pré-tratados, o que consistiu nas etapas de: 1) fixação em 4% de formaldeído em 0,1 M PBS por 5 min; 2) desproteinização com proteinase K (10 mg/mL em solução contendo tampão 0,05 M EDTA e 0,1 M Tris em pH 8 por 30 min a 37°C); 3) acetilação com solução de TEA-HCl contendo 0,25% de anidrido acético por 10 min; 4) desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100% 1 min cada); 5) deslipidificação em xilol (15 min) e rápida reidratação em álcool etílico 100% e 95%. Após essa etapa, cada lâmina com o tecido pré-tratado recebeu 100 μL da solução de hibridização contendo a sonda marcada com ^{35}S -UTP e uma lamínula flexível para sua cobertura, onde permaneceu incubada a 56 °C por aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte, as lamínulas foram removidas por meio de banho em tampão 2 $\times$ SSC, quando, então, a série foi incubada em solução com 0,002% de RNase A (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemanha) em 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA (pH 8), durante 30 min. Posteriormente, as lâminas passaram por banhos de estringência crescente com SSC (2 $\times$ SSC a 50°C por 1 hora, 0,2 $\times$ SSC a 55°C por 1 hora e 0,2 $\times$ SSC a 60°C por 1 hora, sempre com adição de 0,02% de 5 M DTT). Finalmente, o tecido foi desidratado em

álcool etílico a 70% + 0,02 × SSC + 0,02% de 5 M DTT e colocadas em filme autoradiográfico (BMR-2, Kodak, Rochester, EUA) por aproximadamente 36 horas.

Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em emulsão autoradiográfica líquida (NTB2, Kodak) para a detecção do sinal, deixadas secar por 3 horas a 37°C e armazenadas a 4°C em caixas protegidas da luz e com dessecadores durante cerca de 7 dias. Depois, as lâminas foram reveladas com revelador D-19 (Kodak), os cortes foram contra-corados com tionina, desidratados, deslipidificados com xilol e as lâminas cobertas com DPX e lamínula.

O plasmídeo contendo o DNA circular do CART foi gentilmente cedido pelos Drs. P. Couceyro (Finch University of Health Sciences, Chicago Medical School, North Chicago, EUA) e J. Elmquist (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, EUA) (Douglass, McKinzie e Couceyro, 1995). O plasmídeo contendo o DNA circular do GnRH foi gentilmente cedido pelo Dr. Rexford Ahima (University of Pennsylvania, Philadelphia, EUA) (Bond *et al.*, 1989). O DNA circular do NPY foi gentilmente cedido pelo Dr. Robert Steiner (University of Washington, EUA) e as ribosondas de NPY marcadas com ³⁵S foram geradas conforme já descrito (Chan, Steiner e Clifton, 1996). A ribosonda de KiSS-1 foi produzida e gerada no Department of Hypothalamic Research, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, EUA. A sonda foi derivada de fragmentos de PCR amplificados com iTaq DNA polimerase (Bio-Rad) com DNA circular gerado com o *SuperScript III First-Strand Synthesis System* para Rt-PCR (Invitrogen), a partir de RNA total do hipotálamo de camundongo (RD Biosciences). Os produtos de PCR foram clonados com o kit TOPO TA Cloning® para seqüenciamento (Invitrogen). A sonda de KiSS-1 compreende as posições 77-480 do número de acesso NM_178260 do *Genbank*. Foram realizadas hibridizações em tecidos de rato e camundongo com a sonda sense ou após tratamento com RNase, como controle de especificidade da sonda.

4.14 Quantificação dos Hormônios (Radioimunoensaio e Elisa)

O sangue para as dosagens hormonais foi coletado a partir da aorta abdominal, imediatamente antes do início da perfusão. O sangue foi coletado em tubos sem a presença de anti-coagulante e, posteriormente, centrifugado (4°C, 4000 rpm, 15 min) para obtenção de sua porção sérica. As amostras de soro para cada determinação foram armazenadas individualmente em microtubos do tipo eppendorf no freezer a -20°C até o momento da análise. Para a determinação dos hormônios estradiol e progesterona foram utilizados kits de

radioimunoensaio MAIA vendidos comercialmente, contendo todos os reagentes necessários, como artícorpos, curva-padrão, amostras de referência, solução tampão e antígenos marcados com ^{125}I (BioChem ImmunoSystems, Bologna, Itália). Foram seguidas todas as instruções fornecidas pelos fabricantes dos kits comerciais. O mesmo ocorreu no caso do kit de testosterona (ACTIVE DSL-4000, Diagnostics Systems Laboratories, Webster, EUA). Em relação ao LH e FSH, a dosagem foi gentilmente realizada por Rogério R. Azevedo e Dr. Celso R. Franci (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), utilizando-se kits específicos de radioimunoensaio fornecidos pelo *National Hormone and Peptide Program* (Harbor-UCLA Medical Center, EUA). Os padrões foram LH-RP₃ e FSH-RP₂, os limites mínimos de detecção foram 0,05 ng/mL e 0,2 ng/mL e os coeficientes de variação intra-ensaio foram 4% and 3%, respectivamente, para o LH e FSH. A leitura das amostras foi realizada em um contador de cintilação de raios gama, durante 1 min cada. Para o estradiol, a progesterona e a testosterona, os resultados foram gerados pelo programa GraphPad Prism, versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA), a partir dos valores obtidos da contagem de uma curva-padrão. A concentração sérica de leptina foi analisada com o uso de kit comercial de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA; Ultra Sensitive Rat Assay, Crystal Chem Inc).

4.15 Análise dos Resultados

Os cortes histológicos foram observados em um microscópio Leica DMR contendo campo claro e escuro. As fotomicrografias foram adquiridas com uma câmera digital SPOT RT[®] (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EUA), adaptada ao microscópio. O programa Adobe Photoshop 7.0 foi usado para combinar as fotomicrografias em pranchas. Apenas nitidez, contraste and luminosidade foram ajustados. Para a contagem da imunoreatividade ao Fos e das duplas marcações foi utilizada uma área constante em cada núcleo analisado e um quadro de escalas com objetivas em 10× ou 20×. A posição do quadro de contagem dentro de cada núcleo foi definida com o uso de referências adjacentes.

Nos experimentos de hibridização *in situ* foi realizada a análise dos resultados por meio da quantificação da densidade óptica integrada (IOD) dos grãos de prata precipitados pela radioatividade na emulsão fotográfica. Para tanto, imagens em preto e branco e em campo escuro foram adquiridas sem o conhecimento dos grupos experimentais. Utilizando-se o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), foi determinada a IOD da região de interesse e, deste valor, subtraiu-se a IOD da região adjacente sem marcação (*background*). No caso da

análise da expressão do GnRH, determinou-se a IOD de todos os neurônio em cada caso. Foi considerado neurônios GnRH apenas as células que apresentaram valores de IOD pelo menos três vezes maiores que aqueles do *background*. Finalmente, o IOD médio de cada animal foi calculado considerando-se todas as células classificadas como neurônios GnRH, localizadas nas adjacências do OVLT.

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste de *t*-Student *two-tailed* não pareado nas comparações entre apenas dois grupos, por exemplo, grupo lesão *versus* grupo controle. Nas comparações entre três ou mais grupos simultaneamente, foi utilizado o teste ANOVA *one-way* e os contrastes identificados pelo teste de Tukey. As correlações entre os dados foram obtidas por meio de regressão linear de Pearson. Foi considerado um valor de alfa de 0,05 em todas as análises. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K *et al.* Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev.* 2007;53:367-78.
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest.* 1997;99:391-5.
- Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology.* 1999;140:4923-31.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382:250-2.
- Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 2000;21:263-307.
- Apter D. The role of leptin in female adolescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;997:64-76.
- Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361:1251-63.
- Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J Neurosci.* 2002;22:193-9.
- Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V *et al.* Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron.* 2004;42:983-91.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:14563-72.
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 1996;137:3144-7.
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y *et al.* STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature.* 2003;421:856-9.
- Beltramino C, Taleisnik S. Facilitatory and inhibitory effects of electrochemical stimulation of the amygdala on the release of luteinizing hormone. *Brain Res.* 1978;144:95-107.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Beltramino C, Taleisnik S. Release of LH in the female rat by olfactory stimuli. Effect of the removal of the vomeronasal organs or lesioning of the accessory olfactory bulbs. *Neuroendocrinology*. 1983;36:53-8.

Beltramino C, Taleisnik S. Ventral premammillary nuclei mediate pheromonal-induced LH release stimuli in the rat. *Neuroendocrinology*. 1985;41:119-24.

Bingham NC, Anderson KK, Reuter AL, Stallings NR, Parker KL. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2008;149:2138-48.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*. 1998;1:619-25.

Boehm U, Zou Z, Buck LB. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell*. 2005;123:683-95.

Bond CT, Hayflick JS, Seeburg PH, Adelman JP. The rat gonadotropin-releasing hormone: SH locus: structure and hypothalamic expression. *Mol Endocrinol*. 1989;3:1257-62.

Bronson FH. Energy balance and ovulation: small cages versus natural habitats. *Reprod Fertil Dev*. 1998;10:127-37.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995;269:546-9.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol*. 1992;324:195-212.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*. 1995;360:213-45.

Carro E, Pinilla L, Seoane LM, Considine RV, Aguilar E, Casanueva FF *et al*. Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology*. 1997;66:375-7.

Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Roa J, Vigo E, Pineda R *et al*. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes*. 2006;55:2602-10.

Catzefflis C, Pierroz DD, Rohner-Jeanrenaud F, Rivier JE, Sizonenko PC, Aubert ML. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotrophic axis in intact adult female rats. *Endocrinology*. 1993;132:224-34.

Cavalcante JC. Caracterização do núcleo pré-mamilar ventral: um estudo morfológico, neuroquímico e funcional. [grau (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

- Cavalcante JC, Bittencourt JC, Elias CF. Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. *Physiol Behav.* 2006;88:160-6.
- Cavalcante JC, Sita LV, Mascaro MB, Bittencourt JC, Elias CF. Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. *Brain Res.* 2006;1089:116-25.
- Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest.* 2003;111:1409-21.
- Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and the hypothalamic-pituitary regulation of the gonadotropin-gonadal axis. *Pituitary.* 2001;4:87-92.
- Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet.* 2005;366:74-85.
- Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci.* 1993;13:5126-38.
- Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinology.* 1996;137:1319-25.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet.* 1996;12:318-20.
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science.* 1997;275:88-90.
- Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P *et al.* Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest.* 2001;108:1113-21.
- Coolen LM, Olivier B, Peters HJ, Veening JG. Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. *Physiol Behav.* 1997;62:881-91.
- Coolen LM, Peters HJ, Veening JG. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.* 1996;738:67-82.
- Coolen LM, Wood RI. Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol.* 1998;399:189-209.
- Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA *et al.* The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* 2005;1:63-72.

- Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat.* 1997;12:229-41.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* 1999;60:216-22.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:10714-9.
- de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, Elmquist JK, Lee C, Kilimann MW *et al.* Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific *LEPR-B* transgenes. *J Clin Invest.* 2005;115:3484-93.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *KiSS1*-derived peptide receptor *GPR54*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10972-6.
- Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V *et al.* Leptin directly activates *SF1* neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron.* 2006;49:191-203.
- Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci.* 1995;15:2471-81.
- Dungan H, Clifton D, Steiner R. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 2006;147:1154-8.
- Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK *et al.* The role of kisspeptin-*GPR54* signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci.* 2007;27:12088-95.
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C *et al.* Leptin differentially regulates *NPY* and *POMC* neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.* 1999;23:775-86.
- Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker D, Saper CB *et al.* Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2000;423:261-81.
- Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB *et al.* Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol.* 2001;432:1-19.
- Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1998a;395:535-47.
- Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol.* 2005;493:63-71.

- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999;22:221-32.
- Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci*. 1998b;1:445-50.
- Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*. 1996;274:1704-7.
- Eskay RL, Mical RS, Porter JC. Relationship between luteinizing hormone releasing hormone concentration in hypophysial portal blood and luteinizing hormone release in intact, castrated, and electrochemically-stimulated rats. *Endocrinology*. 1977;100:263-70.
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM *et al*. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 1999;341:879-84.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C *et al*. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110:1093-103.
- Farooqi IS, Wangenstein T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM *et al*. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*. 2007;356:237-47.
- Fernandez-Fewell GD, Meredith M. c-fos expression in vomeronasal pathways of mated or pheromone-stimulated male golden hamsters: contributions from vomeronasal sensory input and expression related to mating performance. *J Neurosci*. 1994;14:3643-54.
- Freeman ME. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neill JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Amsterdam; Boston: Elsevier; 2006, 2283-2388.
- Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science*. 1974;185:949-51.
- Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A *et al*. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:1357-63.
- Gargiulo PA, Donoso AO. Interaction between glutamate and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in lordosis behavior and luteinizing hormone release (LH): further studies on NMDA receptor mediation. *Physiol Behav*. 1995;58:169-73.
- Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav*. 1999;67:141-7.
- Gill CJ, Rissman EF. Female sexual behavior is inhibited by short- and long-term food restriction. *Physiol Behav*. 1997;61:387-94.

- Gomora-Arrati P, Beyer C, Lima-Hernandez FJ, Gracia ME, Etgen AM, Gonzalez-Flores O. GnRH mediates estrous behavior induced by ring A reduced progestins and vaginocervical stimulation. *Behav Brain Res.* 2008;187:1-8.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 2004;145:4073-7.
- Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF *et al.* Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol.* 1998;10:627-33.
- Gu G, Varoqueaux F, Simerly RB. Hormonal regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* 1999;19:3213-22.
- Haim S, Shakhar G, Rossene E, Taylor AN, Ben-Eliyahu S. Serum levels of sex hormones and corticosterone throughout 4- and 5-day estrous cycles in Fischer 344 rats and their simulation in ovariectomized females. *J Endocrinol Invest.* 2003;26:1013-22.
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:8878-83.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269:543-6.
- Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol.* 1999;39:249-63.
- Halpern M, Martinez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol.* 2003;70:245-318.
- Hashimoto K, Nishiyama M, Tanaka Y, Noguchi T, Asaba K, Hossein PN *et al.* Urocortins and corticotropin releasing factor type 2 receptors in the hypothalamus and the cardiovascular system. *Peptides.* 2004;25:1711-21.
- Herbison AE, Porteous R, Pape JR, Mora JM, Hurst PR. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology.* 2008;149:597-604.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E827-32.
- Hill JW, Levine JE. Abnormal response of the neuropeptide Y-deficient mouse reproductive axis to food deprivation but not lactation. *Endocrinology.* 2003;144:1780-6.
- Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R *et al.* Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:1796-1805.

Hohmann JG, Teal TH, Clifton DK, Davis J, Hruby VJ, Han G *et al.* Differential role of melanocortins in mediating leptin's central effects on feeding and reproduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R50-9.

Hull EM, Wood RI, McKenna KE. Chapter 33: Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: Neill JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Amsterdam; Boston: Academic Press; 2006, 1729-1824.

Jones JE, Wade GN. Acute fasting decreases sexual receptivity and neural estrogen receptor-alpha in female rats. *Physiol Behav.* 2002;77:19-25.

Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. New York: McGraw-Hill Companies; 2003.

Kaiser UB, Kuohung W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine.* 2005;26:277-84.

Kalamatianos T, Grimshaw SE, Poorun R, Hahn JD, Coen CW. Fasting Reduces KiSS-1 Expression in the Anteroventral Periventricular Nucleus (AVPV): Effects of Fasting on the Expression of KiSS-1 and Neuropeptide Y in the AVPV or Arcuate Nucleus of Female Rats. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:1089-1097.

Kamel F, Wright WW, Mock EJ, Frankel AI. The influence of mating and related stimuli on plasma levels of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin, and testosterone in the male rat. *Endocrinology.* 1977;101:421-9.

Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK *et al.* Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology.* 2007;148:1774-83.

King BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 2006;87:221-44.

King JC, Tobet SA, Snavelly FL, Arimura AA. LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J Comp Neurol.* 1982;209:287-300.

Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K *et al.* Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology.* 2005;146:4431-6.

Kollack-Walker S, Newman SW. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience.* 1995;66:721-36.

Kollack-Walker S, Newman SW. Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations. *J Neurobiol.* 1997;32:481-501.

- Kondo Y, Sachs BD. Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol Behav.* 2002;76:443-7.
- Kovacs KJ, Sawchenko PE. Mediation of osmoregulatory influences on neuroendocrine corticotropin-releasing factor expression by the ventral lamina terminalis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:7681-5.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol.* 1997;9:823-33.
- Lamperti A, Blaha G. The effects of neonatally-administered monosodium glutamate on the reproductive system of adult hamsters. *Biol Reprod.* 1976;14:362-9.
- Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F *et al.* Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology.* 2007;148:4927-36.
- Le WW, Berghorn KA, Rassnick S, Hoffman GE. Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. *Endocrinology.* 1999;140:510-9.
- Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, Parent AS, Bourguignon JP. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. *J Neuroendocrinol.* 2000;12:383-5.
- Lee WS, Smith MS, Hoffman GE. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5163-7.
- Lengvari I. Effect of perinatal monosodium glutamate treatment on endocrine functions of rats in maturity. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 1977;28:133-41.
- Leslie RA, Sanders SJ, Anderson SI, Schuhler S, Horan TL, Ebling FJ. Appositions between cocaine and amphetamine-related transcript- and gonadotropin releasing hormone-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the Siberian hamster. *Neurosci Lett.* 2001;314:111-4.
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C *et al.* Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:7570-5.
- Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW. Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci.* 2002;22:991-1001.
- Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F *et al.* Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:4531-6.

- Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*. 2005;434:470-7.
- Lipscombe D. Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15:358-63.
- Maeda K, Ohkura S, Tsukamura K. Chapter 9: Physiology of reproduction. In: Krinke GJ. *The laboratory rat*. London: Academic Press; 2000, 145-176.
- Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y *et al*. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995a;92:6957-60.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y *et al*. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995b;1:1155-61.
- Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6468-72.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62:609-14.
- Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320:383-8.
- McCann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. The role of nitric oxide in reproduction. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:1367-79.
- Meredith M, Westberry JM. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci*. 2004;24:5719-25.
- Miller KK, Parulekar MS, Schoenfeld E, Anderson E, Hubbard J, Klibanski A *et al*. Decreased leptin levels in normal weight women with hypothalamic amenorrhea: the effects of body composition and nutritional intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2309-12.
- Mitchell AS, Baxter MG, Gaffan D. Dissociable Performance on Scene Learning and Strategy Implementation after Lesions to Magnocellular Mediodorsal Thalamic Nucleus. *J Neurosci*. 2007;27:11888-11895.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ *et al*. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387:903-8.
- Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology*. 1997;138:1190-3.

- Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Kaplitt MG, Ogawa S. RNAi-mediated silencing of estrogen receptor {alpha} in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10456-60.
- Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ *et al*. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2501-6.
- Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda KI, Foster DL. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology*. 1998;67:370-6.
- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM *et al*. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;378:383-6.
- Newman SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;877:242-57.
- Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P *et al*. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2002;346:570-8.
- Ottem EN, Godwin JG, Krishnan S, Petersen SL. Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *J Neurosci*. 2004;24:8097-105.
- Parent AS, Lebrethon MC, Gerard A, Vandersmissen E, Bourguignon JP. Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. *Regul Pept*. 2000;92:17-24.
- Parfitt DB, Newman SW. Fos-immunoreactivity within the extended amygdala is correlated with the onset of sexual satiety. *Horm Behav*. 1998;34:17-29.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3th ed. San Diego: Academic Press; 1997.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005.
- Pfaff DW, Sakuma Y, Kow L, Lee AWL, Easton A. Hormonal, neural, and genomic mechanisms for female reproductive behaviors, motivation, and arousal. In: Neill JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Boston: Elsevier; 2006, 1825-1920.
- Pfaus JG, Heeb MM. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull*. 1997;44:397-407.
- Pfaus JG, Jakob A, Kleopoulos SP, Gibbs RB, Pfaff DW. Sexual stimulation induces Fos immunoreactivity within GnRH neurons of the female rat preoptic area: interaction with steroid hormones. *Neuroendocrinology*. 1994;60:283-90.

- Pizzi WJ, Barnhart JE, Fanslow DJ. Monosodium glutamate administration to the newborn reduces reproductive ability in female and male mice. *Science*. 1977;196:452-4.
- Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*. 2006;147:804-10.
- Powers JB. Facilitation of lordosis in ovariectomized rats by intracerebral progesterone implants. *Brain Res*. 1972;48:311-25.
- Purvis K, Haynes NB. Effect of the odour of female rat urine on plasma testosterone concentrations in male rats. *J Reprod Fertil*. 1978;53:63-5.
- Rasia-Filho AA, Peres TM, Cubilla-Gutierrez FH, Lucion AB. Effect of estradiol implanted in the corticomedial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24:1041-9.
- Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10130-4.
- Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Casanueva FF *et al*. Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology*. 2006;147:2864-78.
- Roman EA, Ricci AG, Faletti AG. Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;242:33-41.
- Rondini TA, Baddini SP, Sousa LF, Bittencourt JC, Elias CF. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. *Neuroscience*. 2004;125:735-48.
- Sato Y, Horita H, Kurohata T, Adachi H, Tsukamoto T. Effect of the nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behavior in rats. *Am J Physiol*. 1998;274:R243-7.
- Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol*. 1975;161:31-55.
- Schwartz MW, Porte D, Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*. 2005;307:375-9.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661-71.
- Scordalakes EM, Shetty SJ, Rissman EF. Roles of estrogen receptor alpha and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J Comp Neurol*. 2002;453:336-44.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK *et al*. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med*. 2003;349:1614-1627.

- Shander D, Barraclough CA. Role of the preoptic brain in the regulation of preovulatory gonadotropin surges in the hamster. *Exp Brain Res*. 1980;40:123-30.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 1990;294:76-95.
- Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE. Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol*. 1999;411:346-58.
- Sisk CL, Nunez AA, Thebert MM. Differential effects of electrolytic and chemical hypothalamic lesions on LH pulses in rats. *Am J Physiol*. 1988;255:E583-90.
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*. 2006a;18:298-303.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005a;146:3686-92.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM *et al*. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005b;146:2976-84.
- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2006b;26:6687-94.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975;96:219-26.
- Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J Neurosci*. 2006;26:2583-9.
- Swanson LW. Brain maps: structure of the rat brain. Amsterdam: Elsevier; 1992.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R *et al*. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83:1263-71.
- Terry KK, Chatman LA, Foley GL, Kadyszewski E, Fleeman TL, Hurtt ME *et al*. Effects of feed restriction on fertility in female rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2005;74:431-41.
- Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF *et al*. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:850-8.

Todman MG, Han SK, Herbison AE. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience*. 2005;132:703-12.

Tolosa EMC, Rodriguez CJ, Behmer OA, Neto ASF. Manual de técnicas histológicas normal e patológica. 2ª São Paulo: Manole; 2003.

Valdez GR, Zorrilla EP, Rivier J, Vale WW, Koob GF. Locomotor suppressive and anxiolytic-like effects of urocortin 3, a highly selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist. *Brain Res*. 2003;980:206-12.

van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM *et al*. Collective and Individual Functions of Leptin Receptor Modulated Neurons Controlling Metabolism and Ingestion. *Endocrinology*. 2008;149:1773-1785.

van den Berg M, ter Horst G, Koolhaas J. The nucleus premammillaris ventralis (PMV) and aggressive behavior in the rat. *Aggressive behavior*. 1983;9:41-47.

Veening JG, Coolen LM, de Jong TR, Joosten HW, de Boer SF, Koolhaas JM *et al*. Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-Fos and pharmacological studies. *Eur J Pharmacol*. 2005;526:226-39.

Vincent SR. Localization of nitric oxide neurons in the central nervous system. In: Vincent SR. *Nitric Oxide in the Nervous System*. San Diego: Academic Press; 1995, 82-102.

Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992;46:755-84.

Wang HJ, Hoffman GE, Smith MS. Increased GnRH mRNA in the GnRH neurons expressing cFos during the proestrous LH surge. *Endocrinology*. 1995;136:3673-6.

Warren M, Voussoughian F, Geer E, Hyle E, Adberg C, Ramos RH. Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:873-7.

Watanobe H, Schioth HB, Suda T. Stimulation of prolactin secretion by chronic, but not acute, administration of leptin in the rat. *Brain Res*. 2000;887:426-31.

Watanobe H, Suda T, Wikberg JE, Schioth HB. Evidence that physiological levels of circulating leptin exert a stimulatory effect on luteinizing hormone and prolactin surges in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:162-5.

Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM *et al*. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med*. 2004;351:987-97.

Wiegand SJ, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1982;34:395-404.

- Wingkar KC. Alterations in feeding and sexual behaviour during reproductive cycle in female rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1992;36:174-6.
- Wood RI. Estradiol, but not dihydrotestosterone, in the medial amygdala facilitates male hamster sex behavior. *Physiol Behav.* 1996;59:833-41.
- Wood RI, Coolen LM. Integration of chemosensory and hormonal cues is essential for sexual behaviour in the male Syrian hamster: role of the medial amygdaloid nucleus. *Neuroscience.* 1997;78:1027-35.
- Wu TJ, Glucksman MJ, Roberts JL, Mani SK. Facilitation of Lordosis in Rats by a Metabolite of Luteinizing Hormone Releasing Hormone. *Endocrinology.* 2006;147:2544-2549.
- Yokosuka M, Hayashi S. Colocalization of neuronal nitric oxide synthase and androgen receptor immunoreactivity in the preammillary nucleus in rats. *Neurosci Res.* 1996;26:309-14.
- Yokosuka M, Matsuoka M, Ohtani-Kaneko R, Iigo M, Hara M, Hirata K *et al.* Female-soiled bedding induced fos immunoreactivity in the ventral part of the preammillary nucleus (PMv) of the male mouse. *Physiol Behav.* 1999;68:257-61.
- Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell.* 2005;123:669-82.
- Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997a;94:1023-8.
- Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology.* 1997b;138:5055-8.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK, Brann DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology.* 1997;65:223-8.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-32.
- Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE *et al.* Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005;115:3564-72.
- Zufall F, Leinders-Zufall T. Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17:483-9.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.