DANIELLA SABINO BATAGELLO

**Identificação, Caracterização Molecular, Mapeamento e
Colocalização do Receptor 1 do Hormônio Concentrador de
Melanina em Mama de Ratas Lactantes e Não-Lactantes**

(Versão original)

Tese apresentada ao Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

São Paulo

2016

RESUMO

BATAGELLO, D.S. **Identificação, Caracterização Molecular, Mapeamento e Colocalização do Receptor 1 do Hormônio Concentrador de Melanina em Mama de Ratas Lactantes e Não-Lactantes.** 2016. 187f. Tese (Doutorado) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introdução: O Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) apresenta a maior expressão de seu RNA mensageiro (RNAm) no período final da lactação (19º dia) em áreas inusitadas no sistema nervoso central (SNC) de roedor, como a área pré-óptica medial (MPOA). Após esse período não encontramos mais o RNAm e a proteína na MPOA, e há descrições de flutuações no nível sérico do MCH, o que sugere uma possível função do MCH no período final da lactação. Foi descrita a presença de MCH em diversos órgãos como: pulmão, tireóide, baço, trato gastrointestinal e em destaque no SNC que é responsável pela expressão de 98% do peptídeo. Foram descritos dois receptores: MCHR1 e MCHR2. No entanto, não há descrição da presença do MCHR1 em tecido mamário, embora evidências sustentem uma possível relação do MCH e o período de lactação. **Objetivos:** 1) investigar a presença do MCHR1 em tecido mamário de ratas lactantes e ratas em diestro; 2) seqüenciar o receptor encontrado em tecido mamário para compará-lo com o receptor expresso no SNC e, 3) estabelecer o tipo celular reativo ao MCHR1 em tecido mamário de ratas lactantes e ratas em diestro. **Material e Métodos:** tecido mamário e do SNC de ratas *Long-Evans* lactantes e não-lactantes foram submetidos às técnicas de hibridização *in situ*, RT-PCR e RT-qPCR (com tecidos controles periféricos). Cortes do SNC de ratas *Long-Evans* (19º dia de lactação) foram submetidos à técnica RNAscope. Sequenciamento gênico foi realizado em amostras de tecidos mamários e hipocampo de rata lactante. Tecidos mamários de ratas lactantes foram submetidos às técnicas de imuno-histoquímica (fosfatase alcalina e imunofluorescência indireta) e *western blot*. **Resultados:** 1) pela técnica de hibridização *in situ* pudemos descrever a presença do *Mchr1* em tecido mamário e do SNC (12º, 19º dias de lactação e diestro); em tecido mamário de ratas lactantes o *Mchr1* se encontra em células na epiderme, derme, estroma e parênquima, e em ratas não-lactantes apenas na epiderme e derme. A técnica RNAscope confirmou a presença do *Mchr1* no SNC de rata lactante. Por RT-PCR e RT-qPCR confirmou-se a presença do *Mchr1* em tecidos mamários e controles de ratas lactantes e não-lactantes, com aumento da expressão gênica no hipocampo de ratas no 19º dia lactação. Por *western blot*, o MCHR1

encontra-se aumentado em hipocampo de ratas lactantes (12º dia); 2) o sequenciamento gênico identificou 100% de identidade da sequência do *Mchr1* do tecido mamário (com pele e sem pele) com a do SNC; 3) células MCHR1-ir foram identificadas na epiderme, derme, estroma e parênquima de glândulas mamárias (ratas lactantes). **Conclusão:** podemos inferir, de forma inédita, que o *Mchr1* é expresso no tecido mamário de ratas lactantes e não-lactantes, apresenta 100% de identidade com a sequência do SNC, a expressão varia por setor mamário, e é mais expresso no hipocampo (19º dia lactação) indicando possível neurogênese hipocampal no final da lactação e, que o MCHR1 está mais presente no tecido mamário de ratas lactantes no 12º dia lactação. Todos esses resultados sugerem um possível envolvimento do MCH no controle da lactação.

Palavras-chave: MCH, Neuroanatomia, Lactação, Receptor MCHR1, Neuroendocrinologia

ABSTRACT

BATAGELLO, D.S. **Identification, Molecular Characterization, Mapping and Colocalization of Melanin-concentrating Hormone Receptor 1 in Mammary Gland of Lactating and no-lactating rat.** 2016. 187f. Thesis (Doctorate) – Institute of Psychology, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Introduction: The melanin-concentrating hormone (MCH) mRNA shows the higher expression during lactation final period (around 19th day) in novel sites of central nervous system (CNS) of rodents, such as the ventral part of medial preoptic area (MPOAv). Thereafter, mRNA and protein are not found in the MPOAv and, there are seric alterations of MCH suggesting a possible function in the lactation final period. MCH is present peripheral tissues: lung, thyroid, spleen, gastrointestinal tract and the CNS is responsible for 98% of expression. The MCH has two receptors: MCHR1 and MCHR2. However, there are no descriptions of MCHR1 expression in the mammary glands of non-lactating or lactating dams albeit evidence support a possible relationship between MCH and lactation. **Objective:** 1) investigate the presence of MCHR1 in mammary tissue, 2) sequencing the receptor present in the mammary tissue of female rats to verify the homology to compare with central *Mchr1* and 3) identify the cellular type that express the mRNA of *Mchr1* and, the protein MCHR1 and. **Material and Methods:** mammary gland and brain tissue of Long-Evans rats (lactating and no-lactating) were submitted to *in situ* hibridization, RT-PCR and qRT-PCR (with peripheral control tissues). Sample of CNS Long-Evans rats (19th day lactation) was submitted to RNAscope technique. Sequencing was performed in mammary gland tissue and hippocampus of lactating rat. Mammary gland tissue of lactating rats was submitted to immunohistochemistry (alkaline phosphatase and indirect immunofluorescence) and *western blot*. **Results:** 1) *Mchr1* was detected by *in situ* hibridization in mammary gland and CNS tissue (12th, 19th days of lactation and diestrus phase). In mammary gland of lactating rats *Mchr1* was found in cells of epidermis, dermis, stroma and parenchyma, and in no-lactating rats only in the epidermis and dermis. RNAscope confirmed the presence of *Mchr1* in the CNS of lactating rats. By RT-PCR and qRT-PCR, *Mchr1* was detected in mammary gland and controls tissues of lactating and no-lactating rats, with higher expression in hippocampus on the 19th day lactating rats. By *western blot*, MCHR1 is increased in hippocampus of lactating rats (12th day); 2) the gene sequencing confirmed 100% identity os *Mchr1* sequence of mammary tissue (with and without skin) compared to CNS; 3) MCHR1-ir cells were

detected in epidermis, dermis, stroma and parenchyma (lactating rats). **Conclusion:** we can infer, in an unprecedented manner, the *Mchr1* is expressed in mammary tissue of lactating and non-lactating rats, presents 100% identity with the sequence of the CNS, expression varies by mammary sector, and is best expressed in the hippocampus (19th day lactation) indicating possible hippocampal neurogenesis at the end of lactation and the MCHR1 is more present in the breast tissue of lactating rats on the 12th day lactation. All these results suggest a possible involvement of MCH in the control of lactation.

Keywords: MCH, Neuroanatomy, Lactation, MCHR1 receptor, Neuroendocrinology

1. INTRODUÇÃO

O hormônio concentrador de melanina (MCH) tem sido muito estudado nos últimos anos como um dos neuromoduladores do comportamento alimentar em mamíferos (Elmqvist, 2001; Elmqvist et al., 1999; Niswender et al., 2004; Sawchenko, 1998; Smith and Grove, 2002; Woods and D'Alessio, 2008). No entanto, outras funções são atribuídas ao MCH, principalmente pelo fato de ser expresso essencialmente no hipotálamo. Provavelmente é um regulador de respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais que garantem a homeostasia do indivíduo, sua sobrevivência e, portanto, a manutenção da espécie.

Uma das características inerentes aos mamíferos e de suma importância para a sobrevivência da espécie corresponde aos períodos de gestação e de lactação. A lactação é um estado fisiológico natural posterior ao parto, caracterizado pela alta demanda energética, pela inibição da função ovariana, dentre outras alterações fisiológicas e comportamentais da fêmea, requeridas pelas circunstâncias.

Ainda vale ressaltar, que embora o MCH possa ser encontrado em vários outros órgãos (Rondini et al., 2004) além do encéfalo, ainda não foi descrito a presença do seu receptor MCHR1 em tecido mamário, embora evidências suportem uma possível relação do MCH e o período de lactação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características fisiológicas da lactação

A lactação é resultante de um mecanismo neuroendócrino sincronizado que envolve uma rede de conexões hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas. As conexões regem atividades fisiológicas que estimulam a secreção de leite (Tucker, 1979). Para garantir a adaptação da lactante a essa nova condição pós-parto, várias alterações fisiológicas ocorrem, entre elas: o aumento dos níveis séricos de prolactina (PRO) e ocitocina (OXY); um profundo efeito na

homeostasia energética, com aumento no consumo de água e alimento; a interrupção do ciclo reprodutivo; e uma indução ao comportamento maternal (Grattan, 2001; Smith and Grove, 2002).

2.2. Homeostasia energética durante a lactação

Uma das características da lactante é a hiperfagia associada a um estado de balanço energético negativo (Smith and Grove, 2002). Tanto o aumento do consumo de alimentos como o aumento do gasto energético é uma adaptação da exigência de energia para síntese e ejeção do leite (Wade et al., 1996).

Regulando todo esse comportamento alimentar encontramos uma série de hormônios e neuropeptídeos, tais como a leptina, o hormônio concentrador de melanina (MCH), o neuropeptídeo Y (NPY), o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), o pró-ópio-melanocortina (POMC), o alfa hormônio estimulador de melanócito (α -MSH), a orexina e o peptídeo relacionado à proteína agouti (AgRP), que são extensivamente descritos na literatura como envolvidos no comportamento alimentar e no controle do peso corporal (Elmqvist, 2001; Elmqvist et al., 1999; Niswender et al., 2004; Sawchenko, 1998; Smith and Grove, 2002; Woods and D'Alessio, 2008).

2.3. Inibição da reprodução durante a lactação

Durante a lactação há uma inibição da secreção do hormônio luteinizante (LH) independentemente dos hormônios ovarianos, o que promove uma inibição da ovulação (Fox and Smith, 1984; Tsukamura and Maeda, 2001). Também foi sugerido que a supressão do LH ao longo da lactação é regulada tanto por fatores metabólicos como não metabólicos. É colocado que o fator de supressão da secreção de LH durante a primeira metade do período de lactação seja o estímulo de sucção gerado pelo contato do filhote com a mãe, enquanto que na

segunda metade do período de lactação é o aumento da drenagem do leite e conseqüente aumento do gasto energético que parecem ser os fatores preponderantes (Tsukamura and Maeda, 2001).

Adicionalmente foi encontrado por Williamson-Hughes et al. (2005) terminais MCH em justa posição com corpos celulares e fibras GnRH em ratas fêmeas. Rondini et al (2010) descreveram que os neurônios MCH na MPOA coexpressam o neurotransmissor inibitório, ácido gama-aminobutírico (GABA). Os neurônios gabaérgicos na MPOA também estão envolvidos na ação de feedback negativo do estrógeno sobre a secreção de LH (Herbison et al., 1991). Assim, os neurônios MCH/GABA da MPOA podem atuar diretamente sobre os neurônio GnRH inibindo a secreção pulsátil de LH (Rondini et al., 2010).

Esta influência dos neurônios MCH sobre a secreção de LH, não está totalmente esclarecida, sendo necessários mais estudos para identificar o real papel do MCH na inibição da função reprodutiva durante a lactação.

2.4. Indução ao comportamento maternal durante a lactação

O comportamento maternal é responsável por ações bem caracterizadas que as fêmeas executam para garantir a sobrevivência dos seus filhotes. No caso dos ratos essas ações incluem: o recolhimento dos filhotes, a construção do ninho, lambidas e a limpeza do filhote, agrupamento dos filhotes no ninho com posicionamento sobre eles para a lactação e aquecimento. Os filhotes começam a mamar logo após o nascimento e esse período dura em média em torno de 20 dias (Mann and Bridges, 2001; Numan and Stolzenberg, 2009). Acrescentando-se aos eventos citados anteriormente, as ratas lactantes apresentam também um comportamento de agressividade. Essa agressão maternal consiste na execução de ações realizadas pela mãe em relação a algum tipo de intruso, que possa colocar em risco sua ninhada (Giovenardi et al., 2005).

Durante as duas primeiras semanas após o parto o comportamento maternal é expresso através do recolhimento dos filhotes, a construção do ninho e a amamentação. Com o desenvolvimento da prole esses comportamentos começam a declinar até desaparecerem em torno da terceira a quarta semana após o parto (Numan, 2006).

Existem evidências de que a MPOA e a região ventral do núcleo intersticial da estria terminal são essenciais para o início e manutenção do comportamento maternal em ratas. Estudos demonstraram alguns hormônios que atuam na MPOA e estimulam o início do comportamento maternal e que neurônios dessa região contêm receptores para alguns deles, como de prolactina, progesterona e estrógenos (Numan and Stolzenberg, 2009). Entretanto, ainda não estão conhecidos inteiramente os mecanismos que determinam o final da lactação.

Estudos realizados por Knollema et al. (1992) e Rondini et al. (2010) demonstraram um aumento da expressão do RNAm do MCH, com ápice no 19º dia de lactação, principalmente na MPOA, indicando uma possível influência do MCH no período final de lactação em ratas.

2.5. Hormônio concentrador de melanina (MCH)

Podemos observar que na maioria das características fisiológicas resultantes da lactação há uma provável influência direta ou indireta do MCH, seja na homeostasia energética, na inibição da reprodução, na indução ao comportamento maternal ou na própria lactação (Elmqvist, 2001; Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010; Schwartz, 2001; Smith and Grove, 2002; Williamson-Hughes et al., 2005).

Bittencourt et al. (1992) a partir do isolamento do MCH do hipotálamo do rato (rMCH), delimitaram as regiões imunorreativas ao MCH e ao Neuropeptídeo – N – ácido glutâmico – E – isoleucina – I (NEI) em todo sistema nervoso central do rato. As principais regiões de expressão de RNAm do pré-pró-MCH e da imunoreatividade ao peptídeo são, no macho e na fêmea, a área hipotalâmica lateral e a área incerto-hipotalâmica. As projeções desses

neurônios podem ser encontradas em todo o neuroeixo, com exceção do cerebelo e da maioria dos núcleos motores do tronco encefálico, que recebem em maior ou menor grau fibras oriundas de pericários localizados no diencéfalo, cuja distribuição é feita por meio do fascículo prosencefálico medial (Bittencourt and Elias, 1992; Nahon et al., 1989).

Desde sua descoberta atribui-se ao MCH uma ampla gama de funções, dentre elas podemos citar: mudanças adaptativas na pigmentação em peixes, anfíbios e répteis (Kawauchi et al., 1983), modulação da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Bluet-Pajot et al., 1995), regulação osmótica (Presse and Nahon, 1993), regulação de água e eletrólitos do meio interno (Parkes and Vale, 1993; Presse et al., 1996), modulação da retenção de memória (Monzon et al., 1999), redução da ansiedade (Monzon et al., 2001), envolvimento na integração sensório-motora (Miller et al., 1993), integração de processos complexos associados à resposta emocional, cognição e excitação geral (Baker, 1994; Nahon, 1994), participação no controle da ingestão alimentar e do balanço energético (Bahjaoui-Bouhaddi et al., 1994; Flier and Maratos-Flier, 1998; Presse et al., 1996; Qu et al., 1996), e participando também da regulação do peso corporal mediando mudanças nos níveis de hormônios circulantes (Kokkotou et al., 2001; Tritos and Maratos-Flier, 1999), apresenta ainda envolvimento nos circuitos que controlam o comportamento de procura de alimentos (Casatti et al., 2002), participação em circuitos autonômicos e somatomotores (Elias and Bittencourt, 1997), envolvimento no controle de comportamentos motivados (Elias et al., 2008; Sita et al., 2007) e participação nas funções materna e reprodutiva (Chiocchio et al., 2001; Knollema et al., 1992; Parkes and Vale, 1993).

2.6. Receptor de MCH

A compreensão do mecanismo de ação do MCH inclui a identificação de seus dois subtipos de receptores acoplados à proteína G (GPCR) para o MCH que são: o MCHR1 e

MCHR2. Os receptores do MCH são encontrados em roedores, primatas, cães e *ferretes*, porém somente o MCHR1 é encontrado em roedores. O MCHR2 é considerado um pseudogene em roedores, mas é funcional em primatas, cães e *ferretes* (Tan C et al., 2002). Já em humanos, o MCHR1 e MCHR2 dividem 38% de semelhança em relação aos seus genes. Através do método de hibridização *in situ* do RNAm do MCHR1 confirmou-se a presença desse receptor de maneira intensa na região da formação hipocampal, subiculum, amígdala basolateral (áreas importantes no aprendizado e memória), no *shell* do núcleo *accumbens*, parte responsável pelo comportamento motivado e alimentação. Além da expressão moderada no núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo arqueado e zona incerta todos os quais desenvolvem papel importante na fase neuronal da alimentação. No tronco cerebral, uma marcação forte foi observada no *locus coeruleus*, que implica na excitação, bem como no núcleo que contribui na função orofacial e mastigação, incluindo os núcleos facial, hipoglosso, motor do trigêmeo e motor dorsal do vago. Na maioria das regiões houve correlação entre a distribuição do RNAm do MCHR1 com a imunorreatividade das fibras de MCH. Essas informações somadas sugerem que o MCH pode agir em vários níveis cerebrais para integrar vários aspectos do comportamento alimentar (Saito et. al., 2001).

Ainda vale ressaltar que cerca de 50 a 55% dos receptores MCHR1 são expressos em neurônios GnRH (Saito et al., 2001; Williamson-Hughes et al., 2005). Estes achados apresentam provas de uma possível via neuroanatômica direta pela qual o MCH pode desempenhar um papel importante na regulação do eixo reprodutor. O MCH pode ser encontrado em vários outros órgãos como: pulmão, tiróide, baço, trato gastrointestinal e em destaque no encéfalo que é responsável pela expressão de 98% do peptídeo (Nahon et al., 1993), no entanto, ainda não foi descrito na literatura atual a presença do MCHR1 em tecido mamário, embora evidências suportem uma possível relação do MCH e o período de lactação (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010).

Segue abaixo esquema extraído e adaptado do trabalho de Presse et al., (2014) na qual podemos visualizar a estrutura do MCH e do MCHR1 em rato, bem como seus principais locais de expressão e imunorreatividade.

Figura 1 - Estrutura e distribuição do MCH e MCHR1 no SNC de rato. Figura a esquerda (superior): estrutura do MCH de rato (peptídeo cíclico); figura a esquerda (inferior): estrutura do MCHR1 de rato (7TM GPCR); figura a direita (superior): corte sagital do encéfalo de rato mostrando a distribuição de neurônios MCH e suas projeções; figura a direita (inferior): corte sagital do encéfalo de rato mostrando a expressão do RNAm do MCHR1. Pontos pretos indicam corpos celulares de neurônios MCH, e linhas correspondem a fibras. Áreas encefálicas com expressão do RNAm do MCHR1 são identificadas por pontos brancos, redesenhados, respectivamente, a partir de Bittencourt et al., 1992 e Hervieu et al., 2001. Extraído e adaptado do trabalho de Presse, F. et al., 2014 (Nature).

2.7. MCH e radioimunoensaio

Ainda permanece controverso na literatura a efetiva participação do MCH como hormônio sérico (Pissios et al., 2006). Takahashi et al., (1995) sugeriram que o MCH não é detectável no sangue e em tecidos periféricos, seja em humanos ou ratos. Waters e Krause (2005), consideram questionável a dosagem sérica/plasmática do MCH, com o uso de kits comerciais de radioimunoensaio (RIA), por possíveis reações cruzadas entre as moléculas

imunorreativas, contidas nos mesmos. Em contrapartida, outros estudos comprovam através de RIA a presença do MCH na circulação sanguínea em humanos (Carnier et al., 2010; Gavrilă et al., 2005) e em ratos (Bradley et al., 2000).

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- a) O RNAm do *Mchr1* é expresso no tecido mamário de ratas lactantes e não-lactantes;
- b) Por sequenciamento gênico houve a confirmação de que o *Mchr1* presente no tecido mamário apresenta 100% de identidade com o *Mchr1* encontrado no SNC;
- c) Ratas virgens no diestro apresentaram somente expressão do RNAm do *Mchr1* na epiderme e no tecido conjuntivo subjacente;
- d) Ratas no 12º e 19º dias de lactação apresentaram expressão do RNAm do *Mchr1* na epiderme, no estroma e parênquima mamários (ductos lactíferos);
- e) Houve a confirmação da distribuição do RNAm do *Mchr1* no SNC pelo uso da técnica de hibridização *in situ* com ³⁵S;
- f) Houve a confirmação da distribuição RNAm do *Mchr1* no SNC pelo uso da nova técnica de hibridização *in situ* não radioativa RNAscope, denotando especificidade;
- g) Houve a confirmação da presença RNAm do *Mchr1* no SNC, no tecido mamário e em órgãos periféricos controle, de ratas no diestro e ratas lactantes (5º, 12º e 19º dias) pelo método de RT-PCR;
- h) O RNAm do *Mchr1* é mais expresso no hipocampo de ratas no 19º dia de lactação, indicando possível neurogênese hipocampal;
- i) O RNAm do *Mchr1* é mais expresso em tecido mamário de ratas no 5º dia de lactação;
- j) Houve a confirmação, por *western blot*, de que o MCHR1 é mais sintetizado no hipocampo de ratas no 12º dia de lactação;
- k) Por imuno-histoquímica verificamos a presença de células MCHR1-ir na epiderme, anexos de pele e derme do tecido mamário de ratas lactantes (5º, 12º e 19º dia de lactação);
- l) Células mioepiteliais alfa-SMA-ir, presentes ao redor dos ductos lactíferos de ratas lactantes, sintetizam MCHR1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Adams AC, Domouzoglou EM, Chee MJ, Segal-Lieberman G, Pissios P, Maratos-Flier E. Ablation of the hypothalamic neuropeptide melanin concentrating hormone is associated with behavioral abnormalities that reflect impaired olfactory integration. *Behav Brain Res*. 2011; 224:195-200.
2. Adamantidis A, Lecea L. A role of Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides*. 2009; 30:2066-2070.
3. Akbari EM, Chatterjee D, Lévy F, Fleming AS. Experience-dependent cell survival in the maternal rat brain. *Behavioral neuroscience*. 2007; 121:1001.
4. Alvisi RD, Diniz GB, Da-Silva JM; Bittencourt JC, Felicio LF. Suckling-induced Fos activation and melanin-concentrating hormone immunoreactivity during late lactation (aceito para publicação – Lifesciences).
5. Amico JA, Thomas A, Crowley RS, Burmeister LA. Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci*. 1998; 63:1387–1395.
6. Andrews ZB, Kokay IC, Grattan DR. Dissociation of prolactin secretion from tuberoinfundibular dopamine activity in late pregnant rats. *Endocrinology*. 2001; 142: 2719–2724.
7. Bahjaoui-Bouhaddi M, Fellmann D, Griffond B, Bugnon C. Insulin treatment stimulates the rat melanin-concentrating hormone- producing neurons. *Neuropeptides*. 1994; 27(4):251-258.
8. Baker BI. Melanin-concentrating hormone updated - functional considerations. *Trends in Endocrinology Metabolism*. 1994; 5(3):120-126.

*De acordo com o Estilo Vancouver.

9. Baratta M, Grolli S, Tamanini C. Effect of leptin in proliferating and differentiated HC11 mouse mammary cells. *Regul. Pept.* 2003; 113: 101-107.
10. Benedetto L, Pereira M, Ferreira A, Torterolo P. Melanin-concentrating hormone in the medial preoptic area reduces active components of maternal behavior in rats. *Peptides.* 2014; 58:20-25.
11. Bittencourt JC, Elias CF. Diencephalic origins of MCH-immunoreactive projections to medial septum/diagonal band complex and spinal cord using two retrograde fluorescent tracers. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 680:462-5.
12. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* 1992; 319(2):218-245.
13. Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol.* 2011; 172(2):185-97.
14. Bluët-Pajot MT, Presse F, Voko Z, Hoeger C, Mounier F, Epelbaum J, Nahon JL. Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melanin-concentrating hormone on stress - induced release of adrenocorticotropin in the rat. *Journal of Neuroendocrinology.* 1995; 7:297-303.
15. Bjorbaek C, Uotani S, Da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and the short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272:32686–95.
16. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 1998; 19:225–268.
17. Bonnet M, Delavaud C, Laud K, Gourdou I, Leroux C, Djiane J, Chilliard Y. leptin synthesis, milk leptina and their putative physiological roles. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002; 42:

399–413.

18. Bradley RL, Kokkotou EG, Maratos-Flier E, Cheatham B. Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes*. 2000; 49(7):1073-1077.
19. Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2015; 36: 178-196.
20. Briskin C. Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2002; 7:49–66.
21. Butte NF, Hopkinson JM, Moon JK, Mehta N, Smith EO. Adjustments in energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69:299–307.
22. Carnier J, de Piano A, de Lima Sanches P, Tock L, do Nascimento CM, Oyama LM, Correa FA, Ernandes RH, Lederman H, de Mello MT, Tufik S, Damaso AR. The role of orexigenic and anorexigenic factors in an interdisciplinary weight loss therapy for obese adolescents with symptoms of eating disorders. *Int J Clin Pract*. 2010; 64(6):784-790.
23. Casatti CA, Elias CF, Sita LV, Frigo L, Furlani VC, Bauer JA, Bittencourt JC. Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. *Neuroscience*. 2002; 115(3):899-915.
24. Ceriani, R. L. Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones. II. Biochemical findings. *Develop Biol*. 1970; 21(4), 530–46.
25. Chiocchio SR, Gallardo MG, Louzan P, Gutnisky V, Tramezzani JH. Melanin-concentrating hormone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropins in the female rat acting at both median eminence and pituitary levels. *Biol Reprod*. 2001; 64(5):1466-1472.
26. Chung S, Saito Y, Civelli O. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides*.

2009; 30(11):1985-9.

27. Chung S, Parks GS, Lee C, Civelli O. Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *J Mol Neurosci.* 2011; 43(1):115-21.

28. Clevenger CV and Plank TL. Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 1997; 2:59–68.

29. CORPET F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 1988;16 (22): 10881-10890.

30. Conductier G1, Brau F, Viola A, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, Chapot R, Lucas L, Rovère C, Maitre P, Hosseiny S, Petit-Paitel A, Adamantidis A, Lakaye B, Risold PY, Prévot V, Meste O, Nahon JL, Guyon A. Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. *Nat Neurosci.* 2013; 16(7):845-7.

31. Eberle AN, Mild G, Schlumberger SE, Drozd R, Hintermann E, Zumsteg U. Expression and characterization of melanin-concentrating hormone receptors on mammalian cell lines. *Peptides.* 2004; 25: 1585-1595.

32. Elias CF, Bittencourt JC. Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter. *Brain Res.* 1997; 755:255-271.

33. Elias CF, Sita LV, Zambon BK, Oliveira ER, Vasconcelos LA, Bittencourt JC. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *J Chem Neuroanat.* 2008; 35(2):188-201.

34. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav.* 2001; 74(4-5):703-708.

35. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 1999; 22(2):221-232.

36. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*. 1998; 92(4):437- 440.
37. Fox SR, Smith MS. The suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion during lactation in the rat. *Endocrinology*. 1984; 115(6):2045-2051.
38. Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *Journal of neurobiology*. 2002; 51:115-128.
39. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev*. 2000; 80:1523–1631.
40. Gandelman R, Zarrow MX, Denenberg VH, Myers M. Olfactory bulb removal eliminates maternal behavior in the mouse. *Science*. 1971; 171:210–1.
41. Galea LA, McEwen BS. Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience*. 1999; 89: 955–964.
42. Galea LA, Ormerod BK, Sampath S, Kostaras X, Wilkie DM, Phelps MT. Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats, *Horm. Behav*. 2000; 37: 86–95.
43. Gavrilu A, Chan JL, Miller LC, Heist K, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and alpha-melanocyte- stimulating hormone levels in relation to body composition: alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(2):1047-1054.
44. Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolanos CA, Marsh DJ, Bednarek MA, Bibb JA, Maratos-Flier E, Nestler EJ, DiLeone RJ. The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci*. 2005; 25:2933-2940.
45. Giovenardi M, de Azevedo MS, da Silva SP, Hermel Edo E, Gomes CM, Lucion AB.

Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. *Physiol Behav.* 2005; 86(1-2):209-217.

46. Gottumukkala RV, Gavalas NG, Akhtar S, Metcalfe RA, Gawkrödger DJ, Haycock JW, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. Function-blocking autoantibodies to the melanin-concentrating hormone receptor in vitiligo patients. *Lab Invest.* 2006; 86(8): 781-789.

47. Grattan DR. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res.* 2001; 133:153-171.

48. Hartmann PE. Changes in the composition and yield of the mammary secretion of cows during the initiation of lactation. *J. Endocr.* 1973; 59:231–247.

49. Herbison AE, Heavens RP, Dye S, Dyer RG. Acute action of oestrogen on medial preoptic gamma-aminobutyric Acid neurons: correlation with oestrogen negative feedback on luteinizing hormone secretion. *J Neuroendocrinol.* 1991; 3(1):101-106.

50. Hervieu G, Volant K, Grishina O, Descroix-Vagne M, Nahon JL. Similarities in cellular expression and functions of melanin-concentrating hormone and atrial natriuretic factor in the rat digestive tract. *Endocrinology.* 1996; 137(2):561-71.

51. Hervieu G, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, et al. The distribution of the mRNA and protein products of the melanina-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci.* 2000; 12:1194-216.

52. Hervieu G, Maulon-Feraille L, Chambers JK, Cluderay JE, Wilson S, Presse F et al. Trans In: Quirion R, Björklund A, Hökfelt T (eds). *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide receptors, Part II.* Vol 20, Elsevier Science: San Diego, CA, USA, 2003, pp 31-101.

53. Hill HJ, Duckworth M, Murdocki P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IJ, Levy DS, Chambers JK, Muir AI. Molecular Cloning and Functional Characterization of MCH2, a Novel Human MCH Receptor. *J Biol Chem.* 2001; 276(23):20125-9.

- 54.** Hoogduijn MJ1, Ancans J, Suzuki I, Estdale S, Thody AJ. Melanin-concentrating hormone and its receptor are expressed and functional in human skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296(3):698-701.
- 55.** Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Nakaya H, Wakitani S, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H. Immunohistochemical Localization of α -Smooth Muscle Actin During Rat Molar Tooth Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54(12): 1371–1378.
- 56.** Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP. Leptin - a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94:1704-1711.
- 57.** Hu ZZ, Meng J, Dufau ML. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:41086–41094.
- 58.** Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature.* 1983; 305:321-323.
- 59.** Kemp EH, Waterman EA, Hawes BE, O'Neill K, Gottumukkala RV, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Watson PF. The melanin-concentrating hormone receptor 1, a novel target of autoantibody responses in vitiligo. *J Clin Invest.* 2002; 109(7):923-30.
- 60.** Knight CH and Peaker M. Development of the mammary gland. *J Reproduct Fertil.* 1982; 65(2): 521-536.
- 61.** Knollema S, Brown ER, Vale W, Sawchenko PE. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats. *J Neuroendocrinol.* 1992; 4(6):709-717.
- 62.** Kokkotou EG, Tritos NA, Mastaitis JW, Flier EM. Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology.* 2001; 142(2): 680-686.

- 63.** Lakaye B, Coumans B, Harray S, Grisar T. Melanin-concentrating hormone and immune function. *Peptides*. 2009; 30:2076-80.
- 64.** Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St-Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P. The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol*. 1999 Sep;1(5):267-71.
- 65.** Lin Y and Li Q. Expression and function of leptin and its receptor in mouse mammary gland. *Sci.China C Life Sci*. 2007; 50:669-675.
- 66.** Lucas JN, Rudmann DG, Credille KM, Irizarry AR, Peter A, Snyder PW. The rat mammary gland: morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(2):199-207.
- 67.** Mann PE, Bridges RS. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Prog Brain Res*. 2001; 133:251-262.
- 68.** Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002; 62(4A):609-614.
- 69.** Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM. A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2000; 5(2):165-185.
- 70.** Medina, D. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1996; 1(1):5-19.
- 71.** Miller CL, Hruby VJ, Matsunaga TO, Bickford PC. Alpha-MSH and MCH are functional antagonists in a CNS auditory gating paradigm. *Peptides*. 1993; 14:431-440.
- 72.** Mizoguchi Y, Kim JY, Sasaki T, Hama T, Sasaki M, Enami J, Sakai S. Acute expression of the PRL receptor gene after ovariectomy in midpregnant mouse mammary gland. *Endocrine. J*. 1996; 43:537-544.

- 73.** Monzon ME, Souza MM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Barros DM, Barioglio SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides*. 1999; 20:1517-1519.
- 74.** Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*. 2001; 22(7):1043-1047.
- 75.** Myers, JA. Studies of the mammary gland II. The fetal development of the mammary gland in the female albino rat. *Amer J Anat*. 1917; 22(2): 195-221.
- 76.** Mukai K, Schollmeyer JV, Rosai J. Immunohistochemical localization of actin: applications in surgical pathology. *Am J Surg Pathol*. 1981; 5:91–97.
- 77.** Nagasawa H and Yanai R. Mammary gland prolactin receptor and pituitary prolactin secretion in lactating mice with different lactational performance. *Acta Endocrinol*. 1978; 88:94–98.
- 78.** Nahon JL. The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene. *Crit Rev Neurobiol*. 1994; 8(4):221-262.
- 79.** Nahon JL, Presse F, Breton C, Hervieu G, Schorpp M. Structure and regulation of the melanin-concentrating hormone gene. *The Melanotropic Peptides 680 (Annals of The New York Academy of Sciences)*. 1993;111-129.
- 80.** Nahon JL, Presse F, Vaughan J, Fischer W, Bittencourt JC, Hoeger C, Schoepfer R, Rivier J, Sawchenko PE, Vale W. Characterization of mammalian melanin concentrating hormones and their precursors. *Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology* 1989 ed.:15-23.
- 81.** Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002; 7(1):49-66.
- 82.** Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers Jr MG, Schwartz MW. Key

enzyme in leptina induced anorexia. *Nature*. 2001; 413:794–5.

83. Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2004; 15(8):362-369.

84. Numan M. Maternal behavior. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3ed. Amsterdam: Elsevier Science and Technology. 2006; p 1921-1993.

85. Numan M, Insel TR. 2003. *The neurobiology of parental behavior*: Springer Science & Business Media.

86. Numan M, Stolzenberg DS. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol*. 2009; 30(1):46-64.

87. Oatridge, A. Holdcroft, N. Saeed, J.V. Hajnal, B.K. Puri, L. Fusi, G.M. Bydder. Change in brain size during and after pregnancy: study in healthy women and women with preeclampsia. *AJNR Am. J. Neuroradiol*. 2002; 23: 19–26.

88. Parkes DG, Vale W. Contrasting actions of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-E-I on posterior pituitary function. *New York Academy of Sciences*. 1993; 680:588-590.

89. Paxinos, G. & Watson, C. *Rat Brain Atlas*. 1998; 4th ed Academic, San Diego.

90. Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LAM. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2009; (30) 343–357.

91. Pissios P, Bradley RL, Maratos-Flier E. Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocr Rev*. 2006; 27(6):606-620.

92. Presse F, Nahon JL. Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene

expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat. *Neuroscience*. 1993; 55(3):709-720.

93. Presse F, Sorokovsky I, Max JP, Nicolaidis S, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. *Neuroscience*. 1996; 71(3):735-745.

94. Presse F, Conductier G, Rovere C, Nahon JL. The melanin-concentrating hormone receptors: neuronal and non-neuronal functions. *International Journal of Obesity Supplements*. 2014; 4 S31-S36.

95. Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie*. 1970; 21(2): 97-116.

96. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek J, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 1996; 380:243-247.

97. Rasband, WS. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.

98. 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(3):735-748.

99. Rondini TA, Donato J, Jr., Rodrigues B de C, Bittencourt JC, Elias CF. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin- concentrating hormone during lactation. *J Chem Neuroanat*. 2010; 39(1):51-62.

100. Rosenblat JS, Mayer AD, Giordano AL. Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*. 1988; 13(1-2):29-46.

101. Russo IH, Tewari M, Russo J. Morphology and Development of the Rat Mammary

Gland. Monographs on Pathology of Laboratory Animals. 1989; pp 233-252.

102. Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*. 1999; 400(6741):265-9.

103. Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2001; 435(1):26-40.

104. Saito Y and Maruyama K. Identification of Melanin-Concentrating Hormone Receptor and its Impact on Drug Discovery. *J Experim Zool*. 2006; 305A:761–768.

105. Sapino A, Macri L, Tonda L, Bussolati G. Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland. *Endocrinology*. 1993;133:838-842.

106. Sangeeta Devi Y, Halperin J. Reproductive actions prolactina mediated through short and long receptor isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014; 382: 400-410.

107. Sawchenko PE. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol*. 1998; 402(4):435-441.

108. Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001; 226(11):978-981.

109. Schwertfeger KL, Richer MM, Anderson SM. Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice. *Mol. Endocrinol*. 2001;15:867–881

110. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49(8):931-7.

111. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*. 2003; 299:117-120.

112. Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. *Neuroscience*. 2007;

148(4):949-969.

113. Sita LV, Diniz GB, Canteras NS, Xavier GF, Bittencourt JC. Effect of intrahippocampal administration of anti-melanin-concentrating hormone on spatial food-seeking behavior in rats. *Peptides*. 2016; 19(76):130-138.

114. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesse D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*. 1986; 103:2787–2796.

115. Smith MS, Grove KL. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol*. 2002; 23(3):225-256.

116. Smith-Kirwin SM., O'Connor DM., De Johnston J, Lancey ED., Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83:1810–1813.

117. Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ. Oxytocin receptors: Triggers for parturition and lactation? *Science*. 1979; 204:1313-1315.

118. Songzhu A, Cutler G, Zhao JJ, Huang S, Tian H, Li W, Liang L, Rich M, Bakleh A, Du J, Chen J, Dai K. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *PNAS*. 2001; 98(13): 7576-7581.

119. Sun G, Tian Z, Murata T, Narita K, Honda K, Higuchi T. Central and peripheral immunoreactivity of melanin-concentrating hormone in hypothalamic obese and lactating rats. *J Neuroendocrinol*. 2004;16(1):79-83.

120. Tan CP, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, et al.. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics*. 2002;79:785–92.

121. Takahashi K, Suzuki H, Totsune K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Sasano H, Mouri T, Shibahara S. Melanin-concentrating hormone in human and rat. *Neuroendocrinology*. 1995;

61(5): 493-498.

122. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore, KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995; 83:1263–1271.

123. Terkel J, Bridges RS, Sawyer CH. Effects of transecting lateral neural connections of the medial preoptic area on maternal behavior in the rat: nest building, pup retrieval and prolactin secretion. *Brain research*. 1979;169:369-380.

124. Traurig HH. Cell proliferation in the mammary gland during late pregnancy and lactation. *Anat. Rec*. 1967; 157:489–504.

125. Tritos NA, Maratos-Flier E. Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides*. 1999; 33(5):339-349.

126. Tsukamura H, Maeda K. Non-metabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. *Prog Brain Res*. 2001;133:187-205.

127. Tucker HA. Endocrinology of lactation. *Semin Perinatol*. 1979; 3(3):199-223.

128. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis JS. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011; 35(9):1343-50.

129. Uotani S, Bjorbaek C, Tornoe J, Flier JS. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes*. 1999; 48:279–86.

130. Vandenberg JG. Effects of central and peripheral anosmia on reproduction of female mice. *Physiol Behav*. 1973; 10:257–61

- 131.** Wade GN, Schneider JE, Li HY. Control of fertility by metabolic cues. *Am J Physiol* . 1996; 270(1 Pt 1): E1-19.
- 132.** Wang YY, Wang YL, Li HP, Zhu HS, Jiang QD, Zhang L, Wang LF, Han LQ, Zhong K, Guo YJ, Lu WF, Li HJ, Yang GY. Leptin mRNA expression in the rat mammary gland at different activation stages. *Genetics and Molecular Research*. 2011; 10 (4): 3657-3663.
- 133.** Waters SM, Krause JE. Letter re: melanin-concentrating hormone and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(11):6337.
- 134.** Williamson-Hughes PS, Grove KL, Smith MS. Melanin concentrating hormone (MCH): a novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. *Brain Res*. 2005; 1041(2):117-124.
- 135.** Wiesner, B. P.; Sheard, N. M. Maternal behavior in the rat. Oxford, England: Oliver & Boyd Maternal behavior in the rat. 1933; xi 244 pp.
- 136.** Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(11 Suppl 1): S37-50.
- 137.** Woodside B, Abizaid A, Walker C. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Horm. Behav*. 2000; 37:353–365.
- 138.** Zieba DA, Amstalden M, Williams GL. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*. 2005; 29:166–185.