

JÉSSICA BETETO DA SILVA

“O efeito do anestro induzido por restrição alimentar sobre a morfologia de útero e ovários e a expressão do RNAm do precursor do hormônio concentrador de melanina”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Versão corrigida

São Paulo
2017

RESUMO

Silva, JB. O efeito do anestro induzido por restrição alimentar sobre a morfologia de útero e ovários e a expressão do RNAm do precursor do hormônio concentrador de melanina. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Estudos hodológicos sugerem um dimorfismo sexual das projeções da área incerto-hipotalâmica (IHy), com áreas relevantes para o controle reprodutivo mais densamente inervadas em fêmeas. Estudos funcionais mostraram que o RNAm do precursor do hormônio concentrador de melanina (ppMCH) varia apenas na IHy, durante o ciclo estral e é reduzido em ratas em anestro induzido por restrição alimentar (RA). Nosso objetivo foi analisar em camundongos fêmeas, as alterações na morfologia de útero e ovários e na expressão do RNAm do ppMCH da IHy ocasionadas pelo anestro induzido por RA. Para isso, camundongos fêmeas C57BL/6 foram distribuídas em controle (C), restrito (R; ração = 70% do C) e realimentado (RR). Os animais R foram perfundidos após 4, 8 e 12 dias para coleta de encéfalo, útero e ovários. Houve um aumento no número de folículos antrais nos animais R12 comparados ao R4 e redução da área uterina nos animais R8 com recuperação dos RR. Não foi possível detectar alterações na expressão do RNAm do ppMCH na IHy.

Palavras-chave: Área incerto-hipotalâmica (IHy). Restrição alimentar. Hibridização *in situ*. Hormônio concentrador de melanina (MCH). Regulação neuroendócrina. Sistema reprodutivo. Ciclo estral.

ABSTRACT

Silva, JB. The effect of food restriction-induced anestrus on the morphology of uterus and ovaries and the melanin-concentrating hormone precursor mRNA expression. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Hodological studies suggest a sexual dimorphism of the incerto-hypothalamic area (IH_y) projections since relevant areas to the reproductive control are more densely innervated in females. Functional studies have shown that the MCH precursor mRNA (ppMCH) varies only in the IH_y during the estrous cycle of an intact rat and is decreased in anestrus rats induced by food restriction. We aim to analyze, in female mice, the changes in uterine and ovarian morphology and expression of IH_y ppMCH mRNA in anestrus induced by food restriction. For this, C57BL/6 female mice were distributed in control (C), food restricted (FR) and refed (RR). FR were perfused after 4, 8 and 12 days to collect the brain, uterus and ovaries. Our results show an increased number of antral follicles of R12 compared to R4 and a reduction in the uterine area of R8 with restoration in RR. It was not possible to detect changes in ppMCH mRNA expression in IH_y.

Key words: Incerto-hypothalamic area (IH_y). Food restriction. *In situ* hybridization. Melanin-concentrating hormone (MCH). Neuroendocrine regulation. Reproductive system. Estrous cycle.

1 INTRODUÇÃO

A área incerto-hipotalâmica (IHy) é uma região localizada no diencéfalo, na junção entre o hipotálamo medial e a zona incerta. Devido à sua pobre delimitação citoarquitetônica, o uso da marcação neuroquímica dessa região foi padronizado como referência ideal para a definição de seus limites, o que serviu de base para o estudo de diversos aspectos citoarquitetônicos, hodológicos e funcionais em ratos (Sita, Elias, Bittencourt, 2003, 2007; Elias et al., 2008; Bueno et al., 2013; Silva et al., 2013; Bueno et al., 2017; Sita et al., 2017), os quais promoveram a padronização da nomenclatura dessa região para área incerto-hipotalâmica (Sita, Elias, Bittencourt, 2007), e esta já foi incorporada por diversos grupos de pesquisa (Bittencourt, Celis, 2008; Elias et al., 2008; Lagos et al., 2009; Lee et al., 2009; Nakamura et al., 2009; Torterolo, Sampogna, Chase, 2009; Geerling et al., 2010; Mul et al., 2011; Espana, Clotman, 2012). Assim sendo, a IHy é caracterizada pela presença de dois grupamentos neuroquímicos distintos, um deles sendo o grupamento dopaminérgico A13 e o outro predominantemente GABAérgico. Entre as células GABAérgicas, encontramos uma população colocalizada com o hormônio concentrador de melanina (MCH, Bittencourt et al., 1992; Sita, Elias, Bittencourt, 2003), objeto desse trabalho.

Estudos funcionais sugerem que a IHy atua na regulação da manutenção do ciclo estral através do sistema peptidérgico do MCH, sob influência do estrogênio e do metabolismo energético. Resultados prévios de nosso grupo demonstram que o RNAm do precursor do MCH (ppMCH) presente nos neurônios da IHy varia com o ciclo estral normal e no anestro induzido pela restrição alimentar (Bueno et al., 2013; Silva et al., 2013; Bueno et al., 2017), sugerindo um papel significativo para o Sistema MCH no controle do ciclo estral regulado pelo balanço energético, função esta que será abordada em maiores detalhes nesse estudo.

1.1 *Arquitetura da IHy*

A IHy apresenta dois grupamentos neuroquímicos distintos. Inicialmente, foi descrito o grupamento dopaminérgico A13, visualizado pela presença de tirosina hidroxilase (TH, Dahlström, Fuxe, 1964; Hökfelt et al., 1984). Entremeados às células dopaminérgicas, observam-se células GABAérgicas em contato sináptico aparente com as células dopaminérgicas, mas sem colocalização (Oertel et al., 1982; Sita, Elias, Bittencourt, 2003). As células GABAérgicas também apresentam o MCH e/ou o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART,

Vrang et al., 1999; Elias et al., 2001). De fato, GABA, MCH e CART estão amplamente coexpressos (Elias et al., 2001; Elias et al., 2008).

O significado neurofisiológico da proximidade celular, sem colocalização, entre células dopaminérgicas *versus* GABA/CART/MCH é desconhecido, mas sabendo que a função das células dopaminérgicas na regulação da secreção hormonal depende de uma modulação de uma inibição tônica GABAérgica (Kalia et al., 1999), postulamos que o MCH poderia modular essa transmissão. Estudos *in vitro* demonstram que o MCH promove uma redução na frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias em sinapses GABAérgicas (Gao, van den Pol, 2001).

Além disso, os primeiros trabalhos funcionais da IHy são lesões bilaterais dessa região através de ácido ibotênico ou 6-hidroxidopamina, as quais abolem o pico ovulatório plasmático do hormônio luteinizante (LH) e induzem diestro constante (MacKenzie et al., 1984; MacKenzie, James, Wilson, 1988; Sanghera, Anselmo-Franci, McCann, 1991). Aparentemente o mecanismo de ação dessa lesão envolve uma transmissão dopaminérgica, visto que a injeção local de dopamina induz a um aumento na concentração plasmática de LH (MacKenzie et al., 1984).

Em virtude de parte das células dopaminérgicas ocuparem a parte rostral da ZI, e da ausência de limites citoarquitetônicos mais precisos, essa região foi por muito tempo considerada parte da ZI (Kawana, Watanabe, 1981; Paxinos, Watson, 1998; Swanson, 2004; Mitrofanis, 2005), inclusive por nosso grupo (Bittencourt et al., 1992; Elias, Bittencourt, 1997; Bittencourt, Elias, 1998; Casatti et al., 2002; Sita, Elias, Bittencourt, 2003; Elias et al., 2008), e recebeu diversas denominações ao longo de sua história, incluindo ZI rostral (Mitrofanis, 2005), ZI medial (Wagner et al., 1995) e ZI rostromedial (Bittencourt et al., 1992; Sita, Elias, Bittencourt, 2003). Uma análise mais precisa mostra que os neurônios da IHy coincidem com parte da ZI rostral e a parte mais rostral e medial da ZI dorsal, mas aproximadamente metade da área da IHy está fora dos limites citoarquitetônicos da ZI (Sita, Elias, Bittencourt, 2007), justificando o abandono dessa terminologia.

1.2 Hodologia da IHy

A IHy possui um padrão de projeções semelhante ao de núcleos do hipotálamo medial, projetando-se especialmente para estruturas mediais do encéfalo desde os núcleos septais até a substância cinzenta da ponte. Estudos hodológicos prévios de nosso grupo sugerem um dimorfismo sexual das projeções da IHy, com áreas relevantes para o controle reprodutivo

sendo mais densamente inervadas em fêmeas do que em machos (Sita, Elias, Bittencourt, 2007; Bueno et al., 2013; Barbeiro, 2016; Bueno et al., 2017).

Em ambos os sexos, suas principais projeções são a parte intermédia do núcleo septal lateral, núcleo *reuniens*, área hipotalâmica anterior, núcleo pré-comissural e área hipotalâmica posterior. A substância cinzenta periaquedutal recebe inervação mais expressiva em ratos do que em ratas e de modo geral, em machos, a IHy possui conexões que a colocam claramente como um componente do circuito de defesa hipotalâmico medial. Recentemente, observamos que lesões citotóxicas bilaterais da IHy de ratos machos utilizando NMDA interferem no mecanismo de defesa dos animais lesados. A lesão da IHy abole a resposta de defesa de ratos frente ao gato, seu predador natural (Sita et al., 2017). Em fêmeas, as conexões da IHy com componentes desse circuito são mais discretas e o efeito de lesões no comportamento de defesa ainda precisa ser investigado.

Por outro lado, regiões relevantes para a regulação neuroendócrina como a área pré-óptica medial (MPA) e núcleo pré-óptico mediano que apresentam o hormônio liberador do LH (hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH); o núcleo periventricular do hipotálamo; e o núcleo periventricular anteroventral (AVPe) e o núcleo arqueado (Arc) que expressam kisspeptina (KiSS-1); recebem inervação ausente e/ou discreta em machos, porém evidente em fêmeas (Sita, Elias, Bittencourt, 2007; Oakley, Clifton, Steiner, 2009; Bueno et al., 2013; Bueno et al., 2017). Esse padrão de projeções da IHy diferencial em fêmeas, relacionado a núcleos com relevância neuroendócrina, reforça a ideia de que a IHy esteja exercendo funções relacionadas ao controle neuroendócrino das fêmeas. Entretanto, é desconhecida a anatomia da inervação da IHy nessas regiões e se a IHy é capaz de influenciar as células que expressam GnRH e KiSS-1.

1.3 A função das células MCH na IHy

O MCH é um peptídeo neuromodulador, que está expresso principalmente na área hipotalâmica lateral e IHy (Bittencourt et al., 1992; Qu et al., 1996; Rossi et al., 1997). O MCH é codificado a partir de um precursor (pré-pró-MCH ou ppMCH) que também codifica outro peptídeo (neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina - NEI), coexpresso com o MCH (Bittencourt et al., 1992). A maior parte dos estudos funcionais envolvendo o MCH está relacionada com o controle do comportamento alimentar e metabolismo energético, devido à sua função orexígena. Porém, além destas, o MCH também está envolvido em diversas outras funções incluindo regulação neuroendócrina, comportamento maternal, alerta comportamental,

regulação do humor, homeostase do sono, homeostasia ventricular cerebral (Bittencourt et al., 1992; McBride et al., 1994; Elias, Bittencourt, 1997; Elias, Frigo, Bittencourt, 1997; Bittencourt, Elias, 1998; Monzon, De Barioglio, 1999; Monzon et al., 1999; Murray et al., 2000a; Tsukamura et al., 2000; Borowsky et al., 2002; Casatti et al., 2002; Pereira-da-Silva et al., 2003; Verret et al., 2003; Conductier et al., 2013; Mul et al., 2013; Benedetto et al., 2014; Alachkar et al., 2016), entre outras. Analisando as conexões da IHy, observamos que essa região não deve atuar diretamente no controle do comportamento alimentar, como seria esperado pela presença do MCH, sendo mais provável que as células MCH contribuam para o controle neuroendócrino.

Recentemente, foi ampliado o estudo dos aspectos neuroendócrinos associados ao Sistema MCH. Desde 1992, é conhecido que células da área pré-óptica medial de fêmeas expressam MCH apenas no final do período de lactação (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010), mas essa característica do Sistema MCH foi negligenciada por muito tempo. Mais tarde, foi descrito que esses neurônios são inervados por neuropeptídeos provenientes de células do núcleo arqueado que controlam a homeostase energética (Rondini et al., 2010) e que no 19º dia de lactação, ocorre um aumento do MCH correlacionado à diminuição da ocitocina na hipófise posterior, sugerindo que o MCH participe do controle relacionado ao término do período da lactação (Costa, 2013).

Mais do que apenas uma função na lactação, Naufahu e colaboradores (2013), em uma revisão, apontam que o MCH atua de maneira ampla na regulação neuroendócrina através da regulação direta ou indireta das células GnRH da MPA, além de interagir com o estradiol. O substrato anatômico dessa atuação ainda precisa ser esclarecido, visto que os neurônios que expressam MCH não apresentam receptores de estrógeno (Muschamp, Hull, 2007; Santollo, Eckel, 2013).

Células apresentando GnRH na MPA, AVPe e órgão vascular da lâmina terminal são inervadas por fibras imunorreativas a MCH e ao NEI (Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005; Attademo et al., 2006; Murray et al., 2006). Além disso, o MCH inerva de maneira significativa a eminência mediana (Bittencourt et al., 1992). Injeções vasculares de traçador retrógrado resultam em células MCH retrogradamente marcadas tanto na área hipotalâmica lateral como na IHy suportando a hipótese de que essas regiões se projetam para a eminência mediana (Knollema et al., 1992; Cvetkovic et al., 2003). A distribuição das fibras imunorreativas a MCH na eminência mediana varia entre machos e fêmeas nos diferentes estágios do ciclo estral, sendo maior no diestro e ainda mais expressivo na fêmea lactante no final da lactação (Gallardo, Chiochio, Tramezzani, 2004; Rondini et al., 2010; Costa, 2013). No proestro, o conteúdo do

MCH na eminência mediana aumenta ao redor do meio dia (coincidindo com o aumento de GnRH na eminência mediana) e diminui à tarde precedendo a liberação de GnRH e o pico pré-ovulatório de LH no sangue (Gallardo, Chiocchio, Tramezzani, 2004). O MCH também estimula a liberação do GnRH ao ser injetado, *in vitro*, na eminência mediana de ratas no proestro (Chiocchio et al., 2001). Já a injeção de MCH na MPA ou na eminência mediana estimula a liberação de LH em ratas ooforectomizadas tratadas com estradiol, as quais apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de LH (Gonzalez, Baker, Wilson, 1997; Murray et al., 2000a). Ratas ooforectomizadas sem tratamento hormonal apresentam altos níveis plasmáticos de LH devido a um aumento compensatório dos pulsos de GnRH hipotalâmicos diante da ausência de estrógeno (Haisenleder, Dalkin, Marshall, 1994) e a injeção de MCH nesses animais provoca uma diminuição dos níveis de LH (Murray et al., 2006). Também foi observada uma diminuição nos níveis plasmáticos do LH após injeção de MCH no ventrículo lateral de ratas ooforectomizadas tratadas com estradiol (Tsukamura et al., 2000).

Fêmeas ooforectomizadas tratadas com estrógeno apresentam uma diminuição no número e na intensidade do sinal de células expressando o RNAm do ppMCH somente na IHy (Murray et al., 2000b). Por outro lado, fêmeas ooforectomizadas sem reposição de estrógeno, que apresentam aumento compensatório de LH, apresentam um aumento no número de células imunorreativas ao NEI apenas na IHy (Attademo et al., 2006). Estudos prévios falharam em demonstrar uma variação na expressão do RNAm do ppMCH ao longo do ciclo estral da rata intacta (Knollema et al., 1992; Murray et al., 2000b), entretanto, a ausência de dosagens hormonais séricas comprovando a fase do ciclo estral nesses trabalhos dificulta sua análise. Dados recentes de nosso grupo comprovaram que há aumento na expressão do RNAm do ppMCH, apenas na IHy, durante o proestro de ratas em comparação ao diestro (Bueno et al., 2013; Bueno et al., 2017). Além disso, o número total de neurônios MCH hipotalâmicos, a expressão de ppMCH e também do receptor de MCH R1 diminuem no proestro e com a administração de estradiol em fêmeas ooforectomizadas (Santollo, Eckel, 2013). Resultados de nosso grupo mostram que ratas em anestro secundário à restrição alimentar crônica apresentam uma diminuição da expressão do ppMCH na IHy, mas não na área hipotalâmica lateral (Silva et al., 2013).

Dessa forma, em modelos de animais ooforectomizados ou considerando o hipotálamo inteiro, observamos que o estradiol inibe a síntese de MCH (Murray et al., 2000b; Santollo, Eckel, 2013), mas nosso grupo tem observado que, em animais intactos, as células MCH da IHy atuam de maneira paradoxal à descrita na literatura, em especial em situações de balanço energético negativo. Outros autores já haviam relatado que o efeito orexigênico do MCH é

atenuado pelo estradiol exógeno (fêmeas ooforectomizadas tratadas com estradiol) ou endógeno (estro em comparação ao diestro) sugerindo que o MCH influencie as diferenças no comportamento alimentar relacionadas ao ciclo estral (Messina et al., 2006; Santollo, Eckel, 2007).

1.4 MCH e o controle do ciclo estral

O controle do ciclo reprodutivo em mamíferos, o ciclo estral dos roedores, é determinado por diversos fatores. As kisspeptinas (peptídeos codificados pelo gene *Kiss1*) desempenham um papel chave na puberdade e na ovulação (para uma revisão, veja Oakley, Clifton, Steiner, 2009; Navarro, Tena-Sempere, 2012). Os neurônios *KiSS-1* do núcleo periventricular anteroventral influenciam os neurônios GnRH numa alça de feedback positiva (Han et al., 2005; Dumalska et al., 2008; Pielecka-Fortuna, Chu, Moenter, 2008), aumentando a liberação de hormônios gonadotróficos pela hipófise e disparando uma cascata que dá início à puberdade (Seminara et al., 2003) e mantém a ovulação a cada ciclo (Clarkson et al., 2008). A secreção pulsátil do GnRH estimula a produção do LH e do FSH (hormônio folículo estimulante) pela hipófise e, por sua vez, estimulam os ovários a produzirem estrógeno e progesterona. Por outro lado, os esteroides influenciam os neurônios *KiSS-1* do núcleo arqueado, os quais atuam nos terminais GnRH da eminência mediana numa alça de feedback negativo, a qual está mais relacionada à manutenção do ciclo estral.

Alterações tanto nas secreções do GnRH, quanto de LH e FSH afetam a ovulação e/ou a regularidade do ciclo reprodutivo. Estresse fisiológico, metabólico ou nutricional pode afetar a integridade desse eixo reprodutor. Dietas restritivas acompanhadas ou não de exercícios físicos intensos são uma das causas comuns de alterações na regularidade do ciclo menstrual de mulheres atletas, incluindo o estabelecimento de períodos de amenorreia (Cumming, Wheeler, Harber, 1994; Warren et al., 1999; Andrico et al., 2002). Nessa desordem, a diminuição da gordura corporal ocasionada pela dieta associada ou não ao exercício interfere na secreção do GnRH (Loucks, Verdun, Heath, 1998; Warren et al., 1999) através da diminuição dos níveis de leptina circulante. A leptina é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo branco que informa a parte central do sistema nervoso do status energético do indivíduo, através de suas projeções para o núcleo arqueado, inibindo os neurônios imunorreativos ao neuropeptídeo Y (NPY) e ao peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), que são orexígenos, e estimulando os neurônios imunorreativos a POMC (pró-opiomelanocortina) e ao CART, que são anoréticos (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1999). Por sua vez, estes neurônios inervam

as células imunorreativas ao MCH e a orexina (ORX), de modo a controlar o comportamento alimentar. Além disso, a leptina pode agir diretamente estimulando a secreção de gonadotrofinas na hipófise ou indiretamente através de neurônios hipotalâmicos (Barash et al., 1996; Yu et al., 1997). Neurônios que sintetizam MCH também se projetam para as células GnRH, as quais apresentam receptores de MCH (MCHR1, Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005).

Como mencionado acima, nosso grupo observou que há aumento na expressão do RNAm do ppMCH, apenas na IHy, durante o proestro de ratas em comparação ao diestro (Bueno et al., 2017) e que ratas em anestro secundário à restrição alimentar crônica associada ou não ao treinamento aeróbio intenso apresentam uma diminuição da expressão do ppMCH também apenas na IHy (Silva et al., 2013). A hipótese inicial deste trabalho é que as células MCH da IHy contribuam para a regulação da manutenção do ciclo estral, especialmente em estados de balanço energético negativo.

2 CONCLUSÕES

- O modelo proposto foi efetivo em induzir anestro em camundongos fêmeas após, em média, quatro dias através de alimentação com 70% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle.
- Os camundongos fêmeas com anestro induzido pela restrição alimentar retomam a ciclicidade, em média, após 6 dias em alimentação *ad libitum*;
- A ciclicidade estral é dependente da manutenção do peso corporal. A perda de peso secundária à restrição alimentar induz o quadro de anestro;
- O tecido ovariano dos animais restritos por 12 dias apresenta maior quantidade de folículos em desenvolvimento (antrais), quando comparados aos restritos por 4 dias. Após realimentação, os animais previamente restritos retornam aos níveis basais, equiparando-se aos controles;
- Os animais restritos apresentam uma diminuição da área uterina. Após a realimentação e retorno da ciclicidade, a área uterina se equipara ao controle;
- Nossos resultados relacionados às alterações na expressão do RNAm do ppMCH na IHy de animais em anestro induzido por restrição alimentar são inconclusivos.

REFERÊNCIAS*

Alachkar A, Alhassen L, Wang Z, Wang L, Onouye K, Sanathara N, Civelli O. Inactivation of the melanin concentrating hormone system impairs maternal behavior. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016;26(11):1826-35.

Andrico S, Gambera A, Specchia C, Pellegrini C, Falsetti L, Sartori E. Leptin in functional hypothalamic amenorrhoea. *Hum Reprod.* 2002;17(8):2043-8.

Attademo AM, Rondini TA, Rodrigues BC, Bittencourt JC, Celis ME, Elias CF. Neuropeptide Glutamic Acid-Isoleucine May Induce Luteinizing Hormone Secretion via Multiple Pathways. *Neuroendocrinology.* 2006;83(5-6):313-24.

Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 1996;137(7):3144-7.

Barbeiro EO. Caracterização neuroquímica das áreas relacionadas ao controle reprodutivo invadidas pela área incerto-hipotalâmica em camundongos fêmeas. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016. 113 p

Ben-Zaken I, Haim A, Zubidat AE. Long-day photoperiod interacts with vasopressin and food restriction to modulate reproductive status and vasopressin receptor expression of male golden spiny mice. *J Exp Biol.* 2013;216(Pt 18):3495-503.

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;58:20-5.

Bittencourt J, Celis ME. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides.* 2008;29(8):1441-50.

Bittencourt JC, Elias CF. Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracers. *Brain Res.* 1998;805(1-2):1-19.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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):218-45.

Bloch B. Biotinylated probes for in situ hybridization histochemistry: use for mRNA detection. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(12):1751-4.

Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med.* 2002;8(8):825-30.

Branch SY, Goertz RB, Sharpe AL, Pierce J, Roy S, Ko D, Paladini CA, Beckstead MJ. Food restriction increases glutamate receptor-mediated burst firing of dopamine neurons. *J Neurosci.* 2013;33(34):13861-72.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol.* 1998;402(4):460-74.

Bueno DNM, Silva RJ, Silva JM, Barbeiro EO, Samoes V, Silva JB, Bittencourt JC, Sita LV. Anatomical substrate for the neuroendocrine role of the incerto-hypothalamic area. Em fase de submissão. 2017.

Bueno DNM, Silva RJ, Silva JM, Bittencourt JC, Sita LV. Anatomical substrate for the neuroendocrine role of the incerto-hypothalamic area. In: *Neuroscience Meeting Planner*; 2013, San Diego. San Diego, CA: Society for Neuroscience. [cited 2013 nov 10]. [Available from: <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=a08f5b22-9140-4f84-9c9d-eea295b75d17&cKey=229d2f54-0f04-42c5-9912-666e877c84c8&mKey=%7b8D2A5BEC-4825-4CD6-9439-B42BB151D1CF%7d>]; 2013.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One.* 2012;7(4):e35538.

Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2009;Appendix 4:Appendix 4I.

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.

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):1466-72.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci.* 2008;28(35):8691-7.

Conductier G, Brau F, Viola A, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, Chapot R, Lucas L, Rovere C, Maitre P, Hosseiny S, Petit-Paitel A, Adamantidis A, Lakaye B, Risold PY, Prevot 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.

Costa HC. Caracterização da origem das fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina na lâmina interna da eminência mediana e na hipófise posterior durante a lactação em ratas Long Evans (*Rattus norvegicus*). Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013. 81 p

Cumming DC, Wheeler GD, Harber VJ. Physical activity, nutrition, and reproduction. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;709:55-76.

Cvetkovic V, Brischoux F, Griffond B, Bernard G, Jacquemard C, Fellmann D, Risold PY. Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons supplying both cortical and neuroendocrine projections. *Neuroscience.* 2003;116(1):31-5.

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

Dimarco NM, Dart L, Sanborn CB. Modified activity-stress paradigm in an animal model of the female athlete triad. *J Appl Physiol (1985).* 2007;103(5):1469-78.

Diniz GB. Anatomical characterization of the melanin-concentrating hormone [MCH] peptidergic system in the murine central nervous system: a morphological, neurochemical and comparative study. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; em andamento.

Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, Oliveira HC. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br J Nutr.* 2014;111(6):979-86.

Dos Santos ZA, Da Silva RJ, Bacurau RF, Tirapegui J, Ribeiro SM. Effect of food restriction and intense physical training on estrous cyclicity and plasma leptin concentrations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2011;57(1):1-8.

Dumalska I, Wu M, Morozova E, Liu R, van den Pol A, Alreja M. Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*. 2008;28(32):8003-13.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*. 1999;23(4):775-86.

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(2):255-71.

Elias CF, Frigo L, Bittencourt JC. Origins of melanin-concentrating hormone immunoreactive projections to the motor cortex and pedunculo-pontine nucleus. *Soc Neurosci Abstr*. 1997;23(2):1484.

Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol*. 2001;432(1):1-19.

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.

Espana A, Clotman F. One cut transcription factors are required for the second phase of development of the A13 dopaminergic nucleus in the mouse. *J Comp Neurol*. 2012;520(7):1424-41.

Freeman ME. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. St. Louis: Academic Press; 2006. p. 2327-88.

Gallardo MG, Chiochio SR, Tramezzani JH. Changes of melanin-concentrating hormone related to LHRH release in the median eminence of rats. *Brain Res*. 2004;1030(1):152-8.

Gao XB, van den Pol AN. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol*. 2001;533(Pt 1):237-52.

Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol.* 2010;518(9):1460-99.

Gelegen C, Chandarana K, Choudhury AI, Al-Qassab H, Evans IM, Irvine EE, Hyde CB, Claret M, Andreelli F, Sloan SE, Leiter AB, Withers DJ, Batterham RL. Regulation of hindbrain Pyy expression by acute food deprivation, prolonged caloric restriction, and weight loss surgery in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(5):E659-68.

Giller K, Huebbe P, Doering F, Pallauf K, Rimbach G. Major urinary protein 5, a scent communication protein, is regulated by dietary restriction and subsequent re-feeding in mice. *Proc Biol Sci.* 2013;280(1757):20130101.

Gonzalez MI, Baker BI, Wilson CA. Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. *Neuroendocrinology.* 1997;66(4):254-62.

Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Regulation of gonadotropin gene expression. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press; 1994. p. 1793–813.

Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod.* 2004;71(1):66-72.

Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 2005;25(49):11349-56.

Hökfelt T, Martensson R, Björklund A, Kleinau S, Goldstein M. Distributional maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In: Björklund A, Hökfelt T, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Amsterdam: Elsevier; 1984. p. 277-379.

Kalia V, Fenske C, Hole DR, Wilson CA. Effect of gonadal steroids and gamma-aminobutyric acid on LH release and dopamine expression and activity in the zona incerta in rats. *J Reprod Fertil.* 1999;117(1):189-97.

Kawana E, Watanabe K. A cytoarchitectonic study of zona incerta in the rat. *J Hirnforsch.* 1981;22(5):535-41.

Khraiweh H, Lopez-Dominguez JA, Lopez-Lluch G, Navas P, de Cabo R, Ramsey JJ, Villalba JM, Gonzalez-Reyes JA. Alterations of ultrastructural and fission/fusion markers in hepatocyte mitochondria from mice following calorie restriction with different dietary fats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68(9):1023-34.

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):709-17.

Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 2009;1265:103-10.

Lee S, Lee CE, Elias CF, Elmquist JK. Expression of the diabetes-associated gene TCF7L2 in adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 2009;517(6):925-39.

Lents CA, White FJ, Ciccioli NH, Floyd-White LN, Rubio I, Keisler DH, Spicer LJ, Wettemann RP. Metabolic status, gonadotropin secretion, and ovarian function during acute nutrient restriction of beef heifers. *J Anim Sci.* 2013;91(9):4146-57.

Li L, Fu YC, Xu JJ, Lin XH, Chen XC, Zhang XM, Luo LL. Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of mammalian target of rapamycin signaling. *Reprod Sci.* 2015;22(1):60-7.

Loucks AB, Verdun M, Heath EM. Low energy availability, not stress of exercise, alters LH pulsatility in exercising women. *J Appl Physiol (1985).* 1998;84(1):37-46.

MacKenzie FJ, Hunter AJ, Daly C, Wilson CA. Evidence that the dopaminergic incerto-hypothalamic tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotrophin release. *Neuroendocrinology.* 1984;39(4):289-95.

MacKenzie FJ, James MD, Wilson CA. Changes in dopamine activity in the zona incerta (ZI) over the rat oestrous cycle and the effect of lesions of the ZI on cyclicity: further evidence that the incerto-hypothalamic tract has a stimulatory role in the control of LH release. *Brain Res.* 1988;444(1):75-83.

Mackey DR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. *Biol Reprod.* 1999;61(6):1601-7.

McBride RB, Beckwith BE, Swenson RR, Sawyer TK, Hadley ME, Matsunaga TO, Hruby VJ. The actions of melanin-concentrating hormone (MCH) on passive avoidance in rats: a preliminary study. *Peptides.* 1994;15(4):757-9.

Mercer AJ, Stuart RC, Attard CA, Otero-Corchon V, Nillni EA, Low MJ. Temporal changes in nutritional state affect hypothalamic POMC peptide levels independently of leptin in adult male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(8):E904-15.

Messina MM, Boersma G, Overton JM, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. *Physiol Behav.* 2006;88(4-5):523-8.

Mitrofanis J. Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience.* 2005;130(1):1-15.

Monzon ME, De Barioglio SR. Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol Behav.* 1999;67(5):813-7.

Monzon ME, de Souza MM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Barros DM, de Barioglio SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides.* 1999;20(12):1517-9.

Mul JD, la Fleur SE, Toonen PW, Afrasiab-Middelmann A, Binnekade R, Schetters D, Verheij MM, Sears RM, Homberg JR, Schoffelmeer AN, Adan RA, Dileone RJ, De Vries TJ, Cuppen E. Chronic loss of melanin-concentrating hormone affects motivational aspects of feeding in the rat. *PLoS One.* 2011;6(5):e19600.

Mul JD, O'Duibhir E, Shrestha YB, Koppen A, Vargovic P, Toonen PW, Zarebidaki E, Kvetnansky R, Kalkhoven E, Cuppen E, Bartness TJ. Mch-deficiency in rats is associated with normal adipocyte differentiation and lower sympathetic adipose drive. *PLoS One.* 2013;8(3):e60214.

Murray JF, Adan RA, Walker R, Baker BI, Thody AJ, Nijenhuis WA, Yukitake J, Wilson CA. Melanin-concentrating hormone, melanocortin receptors and regulation of luteinizing hormone release. *J Neuroendocrinol.* 2000a;12(3):217-23.

Murray JF, Baker BI, Levy A, Wilson CA. The influence of gonadal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats. *J Neuroendocrinol.* 2000b;12(1):53-9.

Murray JF, Hahn JD, Kennedy AR, Small CJ, Bloom SR, Haskell-Luevano C, Coen CW, Wilson CA. Evidence for a stimulatory action of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release involving MCH1 and melanocortin-5 receptors. *J Neuroendocrinol.* 2006;18(3):157-67.

Muschamp JW, Hull EM. Melanin concentrating hormone and estrogen receptor-alpha are coextensive but not coexpressed in cells of male rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 2007;427(3):123-6.

Nakamura S, Tsumori T, Yokota S, Oka T, Yasui Y. Amygdaloid axons innervate melanin-concentrating hormone- and orexin-containing neurons in the mouse lateral hypothalamus. *Brain Res.* 2009.

Naufahu J, Cunliffe AD, Murray JF. The roles of melanin-concentrating hormone in energy balance and reproductive function: Are they connected? *Reproduction*. 2013;146(5):R141-50.

Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(1):40-53.

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27(2):327-39.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009;30(6):713-43.

Oertel WH, Tappaz ML, Berod A, Mugnaini E. Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res Bull*. 1982;9(1-6):463-74.

Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 2013.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.

Pereira-da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, Carneiro EM, Velloso LA. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology*. 2003;144(11):4831-40.

Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*. 2008;149(4):1979-86.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 1996;380(6571):243-7.

Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In: Richards JS, editor. *Knobl and Neill's Physiology of Reproduction*. St. Louis: Academic Press; 2006. p. 383-423.

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.

Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology.* 1997;138(1):351-5.

Sanghera MK, Anselmo-Franci J, McCann SM. Effect of medial zona incerta lesions on the ovulatory surge of gonadotrophins and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology.* 1991;54(5):433-8.

Santollo J, Eckel LA. The orexigenic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) is influenced by sex and stage of the estrous cycle. *Physiol Behav.* 2007.

Santollo J, Eckel LA. Oestradiol decreases melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH receptor expression in the hypothalamus of female rats. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(6):570-9.

Saper CB. Image is everything. *J Comp Neurol.* 1999;412(3):381-2.

Schenk MP, Manning RJ, Paalman MH. Going digital: image preparation for biomedical publishing. *Anat Rec.* 1999;257(4):128-36.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1614-27.

Silva RJ, Silva JM, Sita LV, Bittencourt JC. Effects of intense physical training and food restriction on the action of leptin mediated by melanin-concentrating hormone in the reproductive axis in female rats. Program No. 758.01. 2013. Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2013. Online.; 2013.

Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. *Brain Res.* 2003;970(1-2):232-7.

Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. *Neuroscience.* 2007;148(4):949-69.

Sita LV, Gonçalves LFZ, Martinez RCR, Carvalho-Netto EF, Bittencourt JC, Canteras NS. Does the incerto-hypothalamic area have a role in unconditioned defensive behavior? Em fase de submissão. 2017.

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(1):219-26.

Swanson LW. *Brain maps: structure of the rat brain*. Amsterdam: Elsevier; 2004.

Syrjanen S, Partanen P, Mantyjarvi R, Syrjanen K. Sensitivity of in situ hybridization techniques using biotin- and ³⁵S-labeled human papillomavirus (HPV) DNA probes. *J Virol Methods*. 1988;19(3-4):225-38.

Tortorolo P, Sampogna S, Chase MH. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res*. 2009;1268:76-87.

Tsukamura H, Thompson RC, Tsukahara S, Ohkura S, Maekawa F, Moriyama R, Niwa Y, Foster DL, Maeda K. Intracerebroventricular administration of melanin-concentrating hormone suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the female rat. *J Neuroendocrinol*. 2000;12(6):529-34.

Turturro A, Duffy P, Hass B, Kodell R, Hart R. Survival characteristics and age-adjusted disease incidences in C57BL/6 mice fed a commonly used cereal-based diet modulated by dietary restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002;57(11):B379-89.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci*. 2003;4(1):19.

Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci*. 1999;19(10):RC5.

Wagner CK, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ. Efferent projections from the region of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. *Brain Res*. 1995;677(2):229-37.

Warren MP, Voussoughian F, Geer EB, Hyle EP, Adberg CL, Ramos RH. Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):873-7.

Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol.* 2008;36(3):375-84.

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):117-24.

Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):1023-8.

Zeleznik AJ, Pohl CR. Control of follicular development, corpus luteum function, the maternal recognition of pregnancy, and the neuroendocrine regulation of the menstrual cycle in higher primates. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* Academic Press; 2006. p. 2449-510.