

JESSICA CATHARINE GOMES DUARTE

**Novas evidências de fatores moduladores de
diferentes populações neuronais MCHérgicas
relacionadas a função reprodutiva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia de Sistemas do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutora em Ciências.

São Paulo
2022

RESUMO

Duarte, JCG. **Novas evidências de fatores moduladores de diferentes populações neuronais MCHérgicas relacionadas a função reprodutiva** [Tese (Biologia de Sistemas)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2022.

O hormônio concentrador de melanina (MCH) é um peptídeo que atua como neuromodulador em diversas funções, dentre elas a função reprodutiva. Ele é encontrado em diversos núcleos encefálicos, sendo assim, o sistema MCHérgico é constituído de diversas subpopulações. Ao estudar os fatores reguladores desse sistema é necessário considerar a heterogeneidade das subpopulações e suas específicas regulações. Considerando a função reprodutiva, as principais subpopulações neuronais produtoras de MCH estão presentes na área incerto hipotalâmica (IH_y), área pré-óptica medial (MPOA) e na parte anterior no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVHa) – nestas duas últimas, apenas durante a lactação. Esta presente tese teve por objetivo demonstrar novos fatores reguladores das diferentes populações MCHérgicas em áreas encefálicas relacionadas à função reprodutiva. Desta forma, através de quatro diferentes estudos nós demonstramos que: 1) Os hormônios estrógeno e progesterona são inibidores dos neurônios MCH presentes na IH_y em ratas virgens adultas. Essa regulação se estabelece antes da maturação sexual desses animais. 2) Em ratas lactantes, observamos o mesmo padrão de inibição que os esteróides ovarianos têm sobre os neurônios MCH. Nestes animais, além da IH_y a inibição ocorre também na MPOA. Não foi observado efeito no PVHa. 3) Além do componente endócrino, nós demonstramos que a subpopulação de MCH localizada na MPOA de uma fêmea lactante é influenciada pelo tamanho de sua ninhada, sendo que fêmeas com ninhadas maiores possuem mais neurônios MCH-ir. 4) Na MPOA, além do MCH existem neurônios produtores de outro peptídeo possivelmente relacionado a função materna, a amilina. Neurônios produtores de MCH e amilina constituem diferentes populações dentro dessa área. Concluimos que diferentes fatores são moduladores da produção do MCH em diferentes áreas encefálicas. Os esteróides ovarianos são, em geral inibidores do sistema MCHérgico e a ninhada constitui um fator estimulatório da sua produção na MPOA.

Palavras-chave: Hormônio concentrador de melanina, Área incerto-hipotalâmica, área pré-óptica medial, hipotálamo, neuropeptídeo.

ABSTRACT

Duarte, JCG. **New evidence of modulators in different MCH neuronal populations related to the reproductive function** [PhD Thesis (Life System Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2022

The melanin-concentrating hormone (MCH) is a peptide that acts as a neuromodulator in several roles, among them the reproductive function. The MCH can be found in distinct brain areas, this way, the MCHergic system is formed by diverse subpopulations. When studying the putative regulators of this system, it is necessary to consider the heterogeneity of the subpopulations and their specific regulations. Considering the reproductive function, the main neuronal population that produces MCH are the incerto-hypothalamic area (IH_y), the medial preoptic area (MPOA) and the anterior part of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH_a) – on the MPOA and PVH_a only during lactation. In this thesis, our aim was to demonstrate new regulator factors of the different MCHergic populations in brain areas related to reproductive function. So, in four studies we demonstrate that: 1) The estrogen and progesterone hormones are inhibitors of the MCH neurons in the IH_y in virgins' adult rats. This regulation is established before sexual maturation. 2) In lactating rats, we observed the same inhibition pattern of the steroid hormones over the MCH neurons. In these animals, besides the IH_y, the inhibition also occurs in the MPOA. No effect was observed in the PVH_a. 3) In addition to the endocrine regulation, we showed that the MCH in the MPOA in the lactating rat is also influenced by the litter size. Females with bigger litter sizes have more MCH-ir neurons. 4) In the MPOA, besides the MCH-producer neurons, there are neurons that synthesize another peptide related to the maternal function: the amylin. MCH- and amylin-producer neurons are different subpopulations in this area. We conclude that different factors are modulators of the MCH production in several brain areas. The ovarian steroids are, in general, inhibitors of the MCH system and the litter size is stimulatory of MCH in the MPOA.

Keywords: Melanin-concentrating hormone, Incerto-hypothalamic; Medial preoptic area. Neuropeptide.

CAPÍTULO 1

Introdução

Este capítulo tratará de informações gerais atualmente conhecidas sobre o neuromodulador Hormônio Concentrador de Melanina (MCH) relevantes para a tese proposta neste trabalho.

O MCH e suas funções gerais

O MCH foi inicialmente descrito após ser isolado da hipófise de peixes teleósteos, onde evoluiu de forma adaptativa ao *habitat*, exercendo a função de controle da pigmentação da pele do animal, por antagonizar as ações do Hormônio Estimulante de Melanócitos (MSH) (KAWAUCHI et al., 1983; MIZUSAWA et al., 2012). Estudos comparativos revelaram muitas outras funções desse peptídeo nos diversos grupos biológicos, principalmente em mamíferos, como ingestão alimentar e regulação homeostática (DELLA-ZUANA et al., 2002; KAWANO et al., 2002; QU et al., 1996), influência no ciclo vigília-sono (FERREIRA; BITTENCOURT; ADAMANTIDIS, 2017; TSUNEMATSU et al., 2014; VERRET et al., 2003), aprendizado e memória (MONZON et al., 1999; SHERWOOD et al., 2012), modulação da atenção (WHEELER et al., 2014), regulação sensorial de pistas olfatórias (ADAMS et al., 2011), integração da resposta ao stress e ansiedade (BOROWSKY et al., 2002), além da integração do balanço energético e função reprodutiva (NAUFAHU; CUNLIFFE; MURRAY, 2013; WILLIAMSON-HUGHES; GROVE; SMITH, 2005; WU et al., 2009). Assim, o MCH funciona como um neuromodulador em diversas funções (NAHON et al., 1993; PISSIOS; BRADLEY; MARATOS-FLIER, 2006); acrescido ao fato de ser um peptídeo expresso predominantemente no hipotálamo com funções de modulação endócrina, autonômica e comportamental, fundamental à homeostase do indivíduo. Esta variedade de funções fisiológicas se deve às amplas projeções de fibras imunorreativas ao MCH a diversas

regiões do sistema nervoso central (SNC) (BITTENCOURT, 2011; BITTENCOURT et al., 1992).

Em mamíferos o MCH se revela como um peptídeo ortólogo do encontrado em teleósteos, apresentando-se como uma estrutura cíclica com 19 aminoácidos, proveniente de um precursor, o pré-pró-hormônio concentrador de melanina, que codifica outras duas cadeias peptídicas, o neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina (NEI) com atividade biológica já comprovada, (BITTENCOURT; CELIS, 2008) e o neuropeptídeo glicina-ácido glutâmico (NGE) até o momento sem muitas descrições de sua atividade biológica (DINIZ et al., 2019; NAHON et al., 1989; VAUGHAN et al., 1989). A localização dos neurônios produtores de MCH está bem determinada e compreende principalmente as regiões da área hipotalâmica lateral (AHL), área incerto hipotalâmica (IH_y), zona incerta dorsolateral, além do tubérculo olfatório e formação reticular pontina, com extensas projeções para todas as regiões encefálicas, com exceção dos núcleos motores do tronco encefálico e do cerebelo (BITTENCOURT et al., 1992).

Em relação aos receptores de MCH, é sabida a existência de dois tipos: MCHR1 e MCHR2 (HILL et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2001; SAITO et al., 1999). O MCHR1 é expresso amplamente no SNC de mamíferos e também em outros vertebrados (LOGAN et al., 2003; TAN et al., 2002). Já o MCHR2, embora não encontrado em ratos e camundongos, provavelmente por uma perda evolutiva do gene codificante, apresenta uma distribuição semelhante à do MCHR1 em cachorros, furões e macaco, onde esse receptor foi estudado (HILL et al., 2001; TAN et al., 2002).

A relação do MCH com o balanço energético e a função reprodutiva

Já está bem documentada a função do MCH como um hormônio orexígeno (GOMORI et al., 2003; HERVÉ; FELLMANN, 1997; QU et al., 1996) e com uma participação na regulação entre o balanço energético e a função reprodutiva. Como exemplo, temos a relação no MCH com parâmetros do metabolismo energético, onde o MCH atua fazendo uma comunicação entre os níveis de leptina e neurônios produtores do fator de liberação de hormônios gonadotróficos (GnRH) (THONG; GRAHAM, 1999; WILLIAMSON-HUGHES; GROVE; SMITH, 2005).

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco que atua sinalizando o hipotálamo, através do núcleo arqueado (ARC), sobre os níveis energéticos do organismo. No ARC estão presentes duas subpopulações neuronais, uma responsável pela produção dos peptídeos anorexígenos: o Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina (CART) e a Pró-opiomelanocortina (POMC), e outra responsável pelos peptídeos orexígenos: o Neuropeptídeo Y (NPY) e a Proteína Relacionada ao *Agouti* (AgRP). Quando ocorre a perda de peso, sobretudo tecido adiposo branco, ou seja, um estado de balanço energético negativo, com consequente redução sérica de leptina, ocorre a sinalização da mesma no ARC, deixando de estimular a subpopulação de neurônios anorexígenos, e deixando de inibir eficientemente os neurônios orexígenos, com isso temos o estímulo à fome e redução do metabolismo basal (BOURET; SIMERLY, 2004). Vale lembrar, que essas duas subpopulações neuronais possuem projeções para os neurônios MCHérgicos da AHL e IHy (SAWCHENKO, 1998; SCHWARTZ et al., 2000). Assim, neurônios MCHérgicos parecem ser muito sensíveis aos sinais periféricos de balanço energético.

Estudos apontam que fibras imunorreativas ao MCH se projetam para cerca de 85 a 90% dos neurônios GnRH nas áreas pré-óptica medial (MPOA) e hipotalâmica anterior

em rato, e cerca de 50 a 55% dos receptores MCHR1 são expressos em neurônios GnRH. Estes achados apresentam provas de uma possível via neural direta pela qual o MCH pode desempenhar um papel importante na regulação da função neuronal do GnRH (WILLIAMSON-HUGHES; GROVE; SMITH, 2005). Além disso, é proposto que o MCH atue como um neuromodulador no controle da liberação de hormônios pré-ovulatórios (GONZALEZ; BAKER; WILSON, 1997; SMITH; GROVE, 2002). Experimentos *in vitro* demonstraram um aumento dos níveis dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) após incubação com MCH. Essa estimulação parece ser condicionada a altas concentrações de estrógeno (CHIOCCHIO et al., 2001). Estudos demonstraram também que esse peptídeo estimula a liberação de LH quando administrado na MPOA (GONZALEZ; BAKER; WILSON, 1997). Assim, o MCH pode então ser uma via de estimulação da liberação de GnRH pelo estrógeno, através de um *feedback* positivo produzindo os picos ovulatórios, uma vez que a expressão de MCH parece ser influenciada pelo estrógeno (VIALE; KERDELHUÉ; NAHON, 1999).

Além dos estudos evidenciando a relação do MCH com hormônios pré-ovulatórios, já se sabe da sua relação com os esteroides ovarianos. É proposta a existência de uma regulação do estradiol sobre o MCH (MESSINA et al., 2006; MYSTKOWSKI et al., 2000). Murray e colaboradores (2000) sugerem que um dos mecanismos de regulação do precursor do MCH seja através do estrógeno na área incerto-hipotalâmica, uma vez que a aplicação de estrógeno em ratas fêmeas não ovariectomizadas diminui a quantidade de MCH na IHy. Além disso, a administração de estrógeno diminui a quantidade de proteína MCH e de seu receptor no hipotálamo (SANTOLLO; ECKEL, 2013). Todavia, fato interessante é que os neurônios hipotalâmicos produtores de MCH não possuem receptores para estrógeno sugerindo assim uma via indireta de regulação do MCH pelo estrógeno (SANTOLLO; ECKEL, 2013).

O MCH na lactação e a interrupção do ciclo reprodutivo

Knollema e colaboradores (1992) demonstraram que neurônios imunorreativos ao MCH aparecem na MPOA e na parte anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVHa), além do núcleo periventricular anterior somente nas fases finais do período de lactação. As fibras imunorreativas ao MCH trafegam na lâmina interna da eminência mediana (EMi) e chegam a hipófise posterior, as mesmas regiões pelas quais trafegam as projeções ocitocinérgicas (BITTENCOURT et al., 1992), dados endossados por Chiocchio et al (2001). As fibras imunorreativas ao MCH (MCH-ir) e Ocitocina (OXY-ir) transitam pela EMi em uma proximidade tal, que permite inferir uma potencial relação funcional entre os dois sistemas peptidérgicos (COSTA et al., 2019). Além disso, há uma densidade maior de fibras MCH-ir na EMi durante o período da lactação, sugerindo alguma relação entre MCH e ocitocina durante a lactação (COSTA et al., 2019). Esses dados sustentam a associação do MCH com a função neuroendócrina relacionada também ao comportamento maternal (BENEDETTO et al., 2014).

A MPOA é uma área sexualmente dimórfica bem como o sistema MCH (GORSKI et al., 1980; MOGI et al., 2005; RONDINI et al., 2007; SIMERLY; SWANSON; GORSKI, 1984). Ela está localizada na região rostral do hipotálamo e é considerada um sítio importante envolvido no comportamento maternal (NUMAN, 1974; NUMAN; ROSENBLATT; KOMISARUK, 1977).

Além do mais, como mencionado anteriormente, em ratas lactantes há novos locais de síntese de MCH. Durante a lactação as fêmeas apresentam MCH na MPOA e nos núcleos periventricular e no PVHa, com maior expressão nos estágios finais da lactação, sugerindo uma função desse hormônio no controle do final da lactação (KNOLLEMA et al., 1992).

Outra alteração observada nesse estado fisiológico é a interrupção do ciclo estral devido ao bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-ovário pela inibição dopaminérgica sobre a secreção de GnRH na MPOA (LIU; HERBISON, 2013; NUMAN; STOLZENBERG, 2009). Porém não apenas o sistema dopaminérgico, mas também o MCH, parece estar envolvido na inativação do eixo (RONDINI et al., 2010). Sabe-se que durante a lactação o mRNA MCH está aumentado na MPOA e no PVHa (RONDINI et al., 2010).

Rondini e colaboradores (2010) propuseram que os neurônios MCH/GABA na MPOA devem agir diretamente em neurônios produtores de GnRH, inibindo a secreção de LH durante a lactação, e assim interrompendo o ciclo reprodutivo. Isso condicionado aos baixos níveis de estrógenos, que torna a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário aumentada ao efeito do feedback negativo (TSUKAMURA et al., 2000).

Por outro lado, em ratas não lactantes, o MCH deve atuar como estimulador da liberação de GnRH na eminência mediana, em ratas no proestro, ou seja, quando os níveis de estrogênios são altos (CHIOCCHIO et al., 2001). A IHy também parece participar do circuito que regula secreção do LH, uma vez que lesão nessa área diminui níveis de GnRH e níveis de LH no plasma, induzindo constante diestro (MACKENZIE; JAMES; WILSON, 1988; SANGHERA; ANSELMO-FRANCI; MCCANN, 1991).

Assim, temos que: o MCH produzido no diencéfalo é modulado por sinais periféricos sinalizadores do estado energético e por sua vez, influencia outras populações neuronais relacionadas à regulação reprodutiva. Ele interage com todo o eixo hipotálamo-hipófise-ovário, sendo influenciado pelos neurônios hipotalâmicos produtores de GnRH, atuando no controle dos hormônios pré-ovulatórios hipofisários LH e FSH e sendo influenciado pelo esteróide ovariano estrógeno. Dessa forma, o MCH é um modulador da função reprodutiva através da regulação endócrina. Adicionalmente, ele está

relacionado a essa função por participar de sinalização neural da expressão do comportamento materno, uma vez que ele passa a ser expresso em sítios neurais diretamente relacionados a essa função durante a lactação.

Isso posto, esta presente tese apresenta novas evidências da regulação de diferentes populações neuronais produtoras de MCH e a relação desse peptídeo com a função reprodutiva.

CAPÍTULO 2

A relação teórica entre os artigos

O capítulo anterior demonstrou que o MCH é produzido em diversos núcleos encefálicos, sendo assim, o sistema MCHérgico é constituído de diversas subpopulações. Como destacado por Bittencourt (2022) é imprescindível considerar a heterogeneidade das subpopulações. Assim, entendemos ser necessário identificar as particularidades de regulação de cada população neuronal MCHérgica.

A seguir apresentaremos de forma sintética os resultados obtidos no decorrer da elaboração desta tese, onde investigamos diferentes fatores moduladores do sistema MCHérgico. Nos capítulos sequenciais exploraremos com mais detalhes cada um dos aspectos mencionados brevemente neste capítulo. Considerando que o nosso objetivo foi trazer novas evidências acerca da caracterização de diferentes populações MCHérgicas relacionadas à função reprodutiva, nós desenvolvemos os seguintes trabalhos:

Demonstramos que esteróides ovarianos, estrógeno e progesterona, são inibidores dos neurônios MCH presentes na IHy e nas concentrações séricas desse peptídeo em ratas virgens. Mostramos também que a ação inibitória da progesterona depende do estrógeno. Além disso, demonstramos que esse efeito regulatório se estabelece antes da completa maturação sexual dessas fêmeas. Esses resultados serão apresentados no capítulo 3 através de um artigo submetido para apreciação dos pares.

No capítulo 4 nós mostramos outro artigo submetido para publicação que mostra como o estrógeno também inibe o MCH em ratas lactantes, e nesse caso, a regulação acontece na IHy e na MPOA, sem, entretanto, ter um efeito no PVHa. Nestes animais, novamente a concentração sérica do MCH também é influenciada pelo estrógeno, assim como em ratas virgens.

Para além do componente endócrino, nós demonstramos que a subpopulação de MCH localizada na MPOA de uma fêmea lactante é influenciada pelo tamanho de sua

ninhada, isto é, a quantidade de filhotes durante a fase de lactação. Esse trabalho já publicado em forma de artigo científico será apresentado no capítulo 5.

Em seguida, no capítulo 6 nós mostraremos através de um artigo científico submetido para publicação e em fase de análise que, na MPOA, além do MCH, existe a produção de outro peptídeo relacionado a função materna – a amilina. Demonstramos também que os neurônios produtores de MCH são uma população diferente dos neurônios produtores de amilina.

Por fim, no capítulo 7, encerraremos com a apresentação das conclusões dos artigos apresentados. A relação entre esses artigos está sintetizada na figura 1.

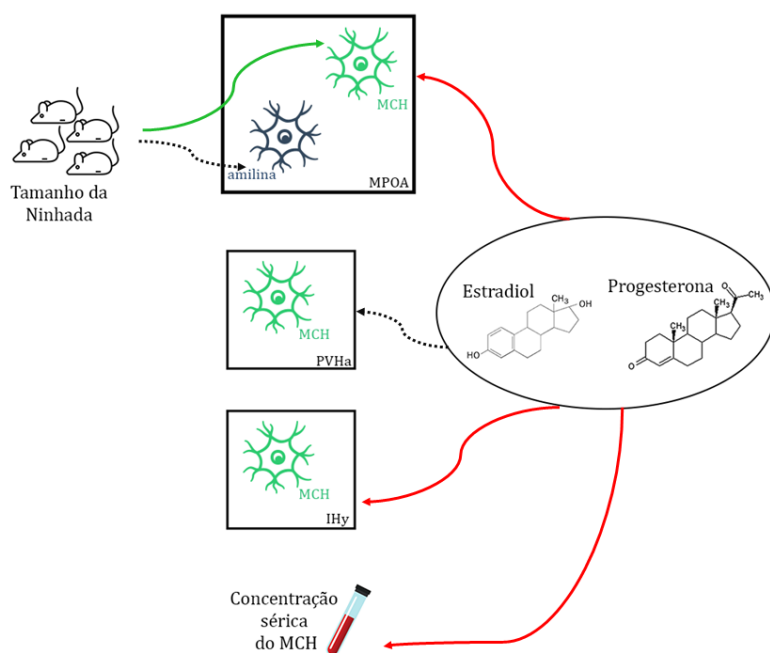


Figura 1: Representação esquemática dos novos fatores moduladores do sistema MCHérgico demonstrados nesta tese. A seta verde indica estimulação; as setas vermelhas indicam inibição; as setas pretas tracejadas indicam ausência de efeito. MPOA: área pré-óptica medial; PVHa: parte anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo; IHy: área incerto-hipotalâmica.

CAPÍTULO 7

Conclusão

Nesta tese, através dos trabalhos previamente apresentados, nós concluímos que:

Em ratas virgens:

- Os neurônios MCH da IHy são inibidos pelos esteróides ovarianos: a injeção de estradiol em animais ovariectomizados reduz o número de neurônios imunorreativos ao MCH na IHy e também a concentração sérica desse peptídeo. O papel da progesterona depende de uma pré-ativação do estradiol, e assim, o seu bloqueio farmacológico resulta em aumento do número de neurônios imunorreativos ao MCH na IHy, bem como em sua concentração sérica.
- A regulação do estradiol e da progesterona sobre o sistema MCH se estabelece antes da maturação sexual, uma vez que a remoção destes pela ovariectomia no período peripuberal altera significativamente a quantidade de neurônios imunorreativos ao MCH na IHy na idade adulta e também os valores de concentração encontrados no sangue.

Em ratas lactantes:

- O efeito inibitório do estradiol observado em fêmeas virgens se mantém em lactantes. Nestas, a ovariectomia resulta em aumento, enquanto a injeção de estradiol sozinho ou seguido pela injeção de progesterona reduz o número de neurônios imunorreativos ao MCH na IHy e na MPOA. O mesmo padrão de aumento e diminuição é encontrado nas concentrações séricas desse peptídeo.
- Outro regulador dos neurônios MCH na MPOA é o tamanho da ninhada, ou seja, a quantidade de filhotes de uma fêmea durante o período de lactação. Fêmeas com ninhadas maiores apresentam maior quantidade de neurônios imunorreativos ao MCH na MPOA, enquanto uma ninhada pequena resulta em um menor número

desses neurônios. Essa modulação se estabelece após o parto, uma vez que uma redução do tamanho da ninhada, por manipulação experimental, no primeiro dia após o parto é suficiente para reduzir também a quantidade destes neurônios na MPOA.

- Assim como o MCH, a amilina tem a sua produção aumentada durante o final da lactação na MPOA, mas diferente do MCH, não há correlação entre o tamanho da ninhada e a quantidade destes neurônios imunorreativos. Além do mais, não foi encontrada colocalização significativa da imunorreatividade desses peptídeos, indicando que eles constituem diferentes subpopulações neuronais dentro da MPOA.

Referências

- ADAMS, A. C. et al. Ablation of the hypothalamic neuropeptide melanin concentrating hormone is associated with behavioral abnormalities that reflect impaired olfactory integration. **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 1, 2011.
- ALVISI, R. D. et al. Suckling-induced Fos activation and melanin-concentrating hormone immunoreactivity during late lactation. **Life Sciences**, v. 148, 2016.
- AMIYA, N. et al. Effects of tank color on melanin-concentrating hormone levels in the brain, pituitary gland, and plasma of the barfin flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay. **General and Comparative Endocrinology**, v. 143, n. 3, 2005.
- ASTWOOD, E. B. CHANGES IN THE WEIGHT AND WATER CONTENT OF THE UTERUS OF THE NORMAL ADULT RAT. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 126, n. 1, 1939.
- BAKOWSKA, J. C.; MORRELL, J. I. The distribution of mRNA for the short form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. **Molecular Brain Research**, v. 116, n. 1–2, 2003.
- BARBOSA-VARGAS, E.; PFAUS, J. G.; WOODSIDE, B. Sexual behavior in lactating rats: Role of estrogen-induced progesterone receptors. **Hormones and Behavior**, v. 56, n. 2, 2009.
- BASURTO, E. et al. Electrolytic lesions to the anterior hypothalamus-preoptic area disrupt maternal nest-building in intact and ovariectomized, steroid-treated rabbits. **Hormones and Behavior**, v. 102, 2018.
- BENEDETTO, L. et al. Melanin-concentrating hormone in the medial preoptic area reduces active components of maternal behavior in rats. **Peptides**, v. 58, 2014.
- BERTOLINI, A.; GESSA, G. L. **Behavioral effects of ACTH and MSH peptides** *Journal of Endocrinological Investigation: Official Journal of the Italian Society of Endocrinology*, 1981.
- BITTENCOURT, J. C. et al. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: An immuno- and hybridization histochemical characterization. **Journal of Comparative Neurology**, v. 319, n. 2, 1992.
- BITTENCOURT, J. C. **Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain** *General and Comparative Endocrinology*, 2011.
- BITTENCOURT, J. C. Anatomical and functional heterogeneity of ‘hypothalamic’ peptidergic neuron populations. **Nature Reviews Endocrinology**, 2022.
- BITTENCOURT, J.; CELIS, M. E. **Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI)** *Peptides*, 2008.
- BOROWSKY, B. et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nature Medicine**, v. 8, n. 8, 2002.
- BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. **Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits** *Endocrinology*, 2004.
- BRADLEY, R. L. et al. Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. **Diabetes**, v. 49, n. 7, 2000.
- BROCK, O.; BAUM, M. J.; BAKKER, J. The development of female sexual behavior requires prepubertal estradiol. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 15, 2011.
- BUENO, D. **Study of connections of incerto-hypothalamic área related neuroendocrine**

control. [s.l: s.n.].

CABA, M. et al. Immunocytochemical detection of progesterone receptor in the female rabbit forebrain: Distribution and regulation by oestradiol and progesterone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 9, 2003.

CARNIER, J. et al. The role of orexigenic and anorexigenic factors in an interdisciplinary weight loss therapy for obese adolescents with symptoms of eating disorders. **International Journal of Clinical Practice**, v. 64, n. 6, 2010.

CHIOCCHIO, S. R. et al. 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. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, 2001.

COSTA, H. C. et al. Characterisation and origins of melanin-concentrating hormone immunoreactive fibres of the posterior lobe of the pituitary and median eminence during lactation in the Long-Evans rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 9, 2019.

CVETKOVIC, V. et al. Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons supplying both cortical and neuroendocrine projections. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, 2003.

DELLA-ZUANA, O. et al. Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. **International Journal of Obesity**, v. 26, n. 10, 2002.

DINIZ, G. B. et al. The distribution of neuronal primary cilia immunoreactive to melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) in the murine prosencephalon. **bioRxiv**, p. 755967, 1 jan. 2019.

DINIZ, G. B.; BITTENCOURT, J. C. The melanin-concentrating hormone as an integrative peptide driving motivated behaviors. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 11, 2017.

FERREIRA, J. G. P. et al. Litter size determines the number of melanin-concentrating hormone neurons in the medial preoptic area of Sprague Dawley lactating dams. **Physiology and Behavior**, v. 181, 2017.

FERREIRA, J. G. P.; BITTENCOURT, J. C.; ADAMANTIDIS, A. **Melanin-concentrating hormone and sleep** **Current Opinion in Neurobiology**, 2017.

FUKUSHIMA, A. et al. Pup removal suppresses estrogen-induced surges of LH secretion and activation of GnRH neurons in lactating rats. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 1, 2006.

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

GAVRILA, A. et al. Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and α -melanocyte-stimulating hormone levels in relation to body composition: Alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 2, 2005.

GIORDANO, A. L. et al. Cytosol and nuclear estrogen receptor binding in the preoptic area and hypothalamus of female rats during pregnancy and ovariectomized, nulliparous rats after steroid priming: Correlation with maternal behavior. **Hormones and Behavior**, v. 24, n. 2, 1990.

GOMORI, A. et al. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice.

American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, v. 284, n. 3 47-3, 2003.

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

GORSKI, R. A. et al. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 193, n. 2, 1980.

GRIEB, Z. A.; TIERNEY, S. M.; LONSTEIN, J. S. Postpartum inhibition of ovarian steroid action increases aspects of maternal caregiving and reduces medial preoptic area progesterone receptor expression in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 96, 2017.

HERVÉ, C.; FELLMANN, D. Changes in rat melanin-concentrating hormone and dynorphin messenger ribonucleic acids induced by food deprivation. **Neuropeptides**, v. 31, n. 3, 1997.

HERVIEU, G. **Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: Food intake and stress** *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2003.

HILL, J. et al. Molecular Cloning and Functional Characterization of MCH2, a Novel Human MCH Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, 2001.

KAWANO, H. et al. **Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding.** *Anatomical science international / Japanese Association of Anatomists*, 2002.

KAWAUCHI, H. et al. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. **Nature**, v. 305, n. 5932, 1983.

KISS, J. Z. Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 20, n. 6, 1988.

KNOLLEMA, S. et al. Novel Hypothalamic and Preoptic Sites of Prepro-Melanin-Concentrating Hormone Messenger Ribonucleic Acid and Peptide Expression in Lactating Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 4, n. 6, 1992.

KOKAY, I. C.; GRATAN, D. R.; MURRAY, J. F. Prolactin maintains transient melanin-concentrating hormone expression in the medial preoptic area during established lactation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 32, n. 2, 2020.

KOSS, W. A. et al. Gonadectomy before puberty increases the number of neurons and glia in the medial prefrontal cortex of female, but not male, rats. **Developmental Psychobiology**, v. 57, n. 3, 2015.

LEE, L. R. et al. Effects of progesterone on pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion and LH subunit messenger ribonucleic acid during lactation in the rat. **Endocrinology**, v. 124, n. 5, 1989.

LIU, X.; HERBISON, A. E. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, 2013.

LOGAN, D. W. et al. The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. **Genomics**, v. 81, n. 2, 2003.

LYON, V. E.; BAKER, B. I. The Effect of Photoperiod on Plasma Levels of Melanin-Concentrating Hormone in the Trout. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 5, n. 5, 1993.

MACKENZIE, F. J.; JAMES, M. D.; WILSON, C. A. Changes in dopamine activity in the zona incerta (ZI) over the rat oestrous cycle and the effect of lesions of the ZI on cyclicity: further

evidence that the incerto-hypothalamic tract has a stimulatory role in the control of LH release. **Brain Research**, v. 444, n. 1, 1988.

MACNEIL, D. J. **The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis** **Frontiers in Endocrinology**, 2013.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4 A, 2002.

MESSINA, M. M. et al. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. **Physiology and Behavior**, v. 88, n. 4–5, 2006.

MICEVYCH, P.; SINCHAK, K. **Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain** **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2008.

MIZUSAWA, K. et al. Identification of mRNAs coding for mammalian-type melanin-concentrating hormone and its receptors in the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 1, 2012.

MOGI, K. et al. Sex difference in the response of melanin-concentrating hormone neurons in the lateral hypothalamic area to glucose, as revealed by the expression of phosphorylated cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, 2005.

MONTI, J. M.; TORTEROLO, P.; LAGOS, P. **Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior** **Sleep Medicine Reviews**, 2013.

MONZON, M. E. et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. **Peptides**, v. 20, n. 12, 1999.

MURRAY, J. F. et al. The influence of gonadal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 1, 2000.

MYSTKOWSKI, P. et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone and estrogen-induced weight loss. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 22, 2000.

NAHON, J. -L et al. Structure and Regulation of the Melanin-Concentrating Hormone Gene. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 680, n. 1, 1993.

NAHON, J. L. et al. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. **Endocrinology**, v. 125, n. 4, 1989.

NAUFAHU, J.; CUNLIFFE, A. D.; MURRAY, J. F. **The roles of melanin-concentrating hormone in energy balance and reproductive function: Are they connected** **Reproduction**, 2013.

NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 87, n. 4, 1974.

NUMAN, M. et al. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. **Brain Research**, v. 830, n. 2, 1999.

NUMAN, M.; ROSENBLATT, J. S.; KOMISARUK, B. R. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 91, n. 1, 1977.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. **Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats** **Frontiers in**

Neuroendocrinology, 2009.

OAKLEY, A. E.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. **Kisspeptin signaling in the brain***Endocrine Reviews*, 2009.

PAXINOS, G.; CHARLES WATSON. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition**. [s.l.: s.n.]. v. 170

PISSIOS, P.; BRADLEY, R. L.; MARATOS-FLIER, E. **Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions***Endocrine Reviews*, 2006.

QU, D. et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v. 380, n. 6571, 1996.

RODRIGUEZ, M. et al. Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. **Molecular Pharmacology**, v. 60, n. 4, 2001.

RONDINI, T. A. et al. Melanin-concentrating hormone is expressed in the laterodorsal tegmental nucleus only in female rats. **Brain Research Bulletin**, v. 74, n. 1–3, 2007.

RONDINI, T. A. et al. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 39, n. 1, 2010.

RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; INGRAM, C. D. **Brain preparations for maternity - Adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview**. Progress in Brain Research. **Anais...**2001

SAITO, Y. et al. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. **Nature**, v. 400, n. 6741, 1999.

SANGHERA, M. K. et al. Incertohypothalamic A13 dopamine neurons: Effect of gonadal steroids on tyrosine hydroxylase: (With 1 color plate). **Neuroendocrinology**, v. 53, n. 3, 1991.

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

SANTOLLO, J.; ECKEL, L. A. Oestradiol Decreases Melanin-Concentrating Hormone (MCH) and MCH Receptor Expression in the Hypothalamus of Female Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 25, n. 6, p. 570–579, 1 jun. 2013.

SAWCHENKO, P. E. **Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: The anatomists weigh in***Journal of Comparative Neurology*, 1998.

SCHMIDT, F. M. et al. Dynamics of melanin-concentrating hormone (MCH) serum levels in major depressive disorder during antidepressant treatment. **Journal of Affective Disorders**, v. 180, 2015.

SCHWARTZ, M. W. et al. **Central nervous system control of food intake***Nature*, 2000.

SCHWARTZ, S. M.; BLAUSTEIN, J. D.; WADE, G. N. Inhibition of estrous behavior by progesterone in rats: Role of neural estrogen and progestin receptors. **Endocrinology**, v. 105, n. 5, 1979.

SHERWOOD, A. et al. The role of melanin-concentrating hormone in conditioned reward learning. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 8, 2012.

- SILVA, L. E. C. M. et al. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, 2010.
- SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W.; GORSKI, R. A. Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 225, n. 2, 1984.
- SISK, C. L. **Development: Pubertal Hormones Meet the Adolescent Brain** *Current Biology*, 2017.
- SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. **Brain Research**, v. 970, n. 1–2, 2003.
- SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience**, v. 148, n. 4, 2007.
- SMITH, D. G. et al. Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, 2006.
- SMITH, M. S. Hypothalamic-Pituitary Responsiveness during Lactation in the Rat: Estrogen-Induced Luteinizing Hormone Surges. **Endocrinology**, v. 102, n. 1, 1978.
- SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: Lactation as a model. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 3, 2002.
- SMITH, M. S.; NEILL, J. D. Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 2, 1977.
- SMITH, M. S.; TRUE, C.; GROVE, K. L. **The neuroendocrine basis of lactation-induced suppression of GnRH: Role of kisspeptin and leptin** *Brain Research*, 2010.
- STRICKER-KRONGRAD, A.; DIMITROV, T.; BECK, B. Central and peripheral dysregulation of melanin-concentrating hormone in obese Zucker rats. **Molecular Brain Research**, v. 92, n. 1–2, 2001.
- SWANSON, L. W. The hypothalamus. In: BJÖRKLUND AS, L.W., HÖKFELT, T. (Ed.). . **Handbook of chemical neuroanatomy**. [s.l.] Elsevier, 1987. p. 1–124.
- SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. J. M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **Journal of Comparative Neurology**, v. 194, n. 3, 1980.
- SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. **Neuroendocrinology**, v. 31, n. 6, 1980.
- TAKASE, K. et al. Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 6, 2009.
- TAN, C. P. et al. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: Species-specific gene expression. **Genomics**, v. 79, n. 6, 2002.

- TAYA, K.; GREENWALD, G. S. Mechanisms of suppression of ovarian follicular development during lactation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 5, 1982.
- TEIXEIRA, P. D. S. et al. Regulation and neurochemical identity of melanin-concentrating hormone neurones in the preoptic area of lactating mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 32, n. 2, 2020.
- TELLERIA, C. M.; DEIS, R. P. Effect of RU486 on ovarian progesterone production at pro-oestrus and during pregnancy: A possible dual regulation of the biosynthesis of progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, n. 2, 1994.
- TELLERIA, C. M.; DEIS, R. P. Reproductive function in rats after mifepristone-induced termination of pregnancy. **Contraception**, v. 53, n. 3, 1996.
- THODY, A. J.; WILSON, C. A.; EVERARD, D. α -Melanocyte stimulating hormone stimulates sexual behaviour in the female rat. **Psychopharmacology**, v. 74, n. 2, 1981.
- THONG, F. S. L.; GRAHAM, T. E. **Leptin and reproduction: Is it a critical link between adipose tissue, nutrition, and reproduction?** *Canadian Journal of Applied Physiology*, 1999.
- TOU, J. C. et al. The effect of ovariectomy combined with hindlimb unloading and reloading on the long bones of mature Sprague-Dawley rats. **Menopause**, v. 15, n. 3, 2008.
- TSUKAMURA, H. et al. Intracerebroventricular administration of melanin-concentrating hormone suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the female rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 6, 2000.
- TSUNEMATSU, T. et al. Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 20, 2014.
- UILENBROEK, J. T. J.; WOUTERSEN, P. J. A.; KARELS, B. Inhibition of induction of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat corpora lutea in vitro by the progesterone antagonist RU486. **Life Sciences**, v. 50, n. 16, 1992.
- VANZULLI, S. et al. p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogesterin-induced tumor regression of experimental mouse mammary ductal carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, 2002.
- VAUGHAN, J. M. et al. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. **Endocrinology**, v. 125, n. 3, 1989.
- VERRET, L. et al. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. **BMC Neuroscience**, v. 4, 2003.
- VIALE, A.; KERDELHUÉ, B.; NAHON, J. L. 17β -Estradiol regulation of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-E-I contents in cynomolgus monkeys: A preliminary study. **Peptides**, v. 20, n. 5, 1999.
- WHEELER, D. S. et al. Role of lateral hypothalamus in two aspects of attention in associative learning. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 2, 2014.
- WIEST, W. G.; KIDWELL, W. R.; BALOGH, K. Progesterone catabolism in the rat ovary: a regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy. **Endocrinology**, v. 82, n. 4, 1968.
- WILLIAMSON-HUGHES, P. S.; GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Melanin concentrating hormone (MCH): A novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. **Brain Research**, v. 1041, n. 2, 2005.

WILSON, C. A.; JAMES, M. D.; LEIGH, A. J. Role of gamma-aminobutyric acid in the zona incerta in the control of luteinizing hormone release and ovulation. **Neuroendocrinology**, v. 52, n. 4, 1990.

WU, M. et al. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 40, 2009.

XU, X. B.; HE, B.; WANG, J. D. Menstrual-like changes in mice are provoked through the pharmacologic withdrawal of progesterone using mifepristone following induction of decidualization. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, 2007.