

ÉERICA OLMOS BARBEIRO

“Caracterização neuroquímica das áreas relacionadas ao controle reprodutivo inervadas pela área incerto-hipotalâmica em camundongos fêmeas”

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. A versão original, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

RESUMO

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

A área incerto-hipotalâmica (IH_y) é uma região diencefálica caracterizada pela presença de dois grupamentos neuroquímicos distintos, porém entremeados, sendo um deles dopaminérgico (grupamento A13) e o outro predominantemente GABAérgico colocalizado ou não com o hormônio concentrador de melanina (MCH) e/ou o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Ainda que escassos, os estudos funcionais sobre a IH_y sugerem seu envolvimento no controle neuroendócrino de fêmeas, provavelmente atuando através do sistema peptidérgico do MCH na regulação da manutenção do ciclo estral, sob influência do estrógeno e do metabolismo energético. Estudos hodológicos em ratos mostram que a área pré-óptica medial (MPA), o núcleo periventricular anteroventral (AVPe) e o núcleo arqueado (Arc) são mais densamente inervados pela IH_y em fêmeas do que em machos, sugerindo um dimorfismo sexual das projeções da IH_y relevantes para o controle reprodutivo. Dessa forma, nosso objetivo foi mapear as projeções da IH_y em camundongos fêmeas e caracterizar neuroquimicamente as áreas relacionadas ao controle reprodutivo inervadas pela IH_y nesses animais, utilizando traçador neuronal anterógrado, através da histoquímica para o traçador e intensificação com prata e ouro, analisando essa inervação em relação ao já descrito em ratos; analisar a inervação da MPA pela IH_y através dos neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), usando imuno-histoquímica e analisar a inervação do AVPe e Arc pela IH_y, usando camundongos Kiss1-hrGFP. Como resultado, observamos que as áreas de interesse, MPA, AVPe e Arc recebem projeções com moderada intensidade da IH_y, porém, assim como em ratos, a IH_y dos camundongos fêmeas se projeta para áreas muito relacionadas com o comportamento de defesa. Além disso, nos animais Kiss1-hrGFP observamos que a inervação da IH_y contorna o território contendo células KiSS-1 do AVPe e do Arc, mas essa inervação ainda necessita maior investigação. Por fim, não foi possível analisar as projeções da IH_y para os neurônios GnRH da MPA, pois o único método que foi capaz de melhorar a visualização do anticorpo anti-GnRH foi impossibilitada pela vigência de reação cruzada com a revelação do BDA.

Palavras-chave: Hipotálamo. Hormônio concentrador de melanina. Sistema reprodutivo. Traçador anterógrado. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Barbeiro EO. Neurochemical characterization of areas related to reproductive control innervated by incerto-hypothalamic area in female mice. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2016.

The incerto-hypothalamic area (IH_y) is a diencephalic region characterized by the presence of two distinct neurochemical groups, but intermingled, one dopaminergic (A13) and the other predominantly GABAergic-located or not with melanin-concentrating hormone (MCH) and/or the transcript regulated by cocaine and amphetamine (CART). Although scarce, functional studies, suggest the involvement of the IH_y in the neuroendocrine control, probably acting through the peptidergic system MCH in regulating the maintenance of the estrous cycle, under the influence of estrogen and energy metabolism. Hodological studies in rats show that the medial preoptic area (MPA), the anteroventral periventricular nucleus (AVPe) and the arcuate nucleus (Arc) are more densely innervated by the IH_y in females than in males, suggesting a sexual dimorphism of projections of the IH_y relevant to reproductive control. Thus, our goal was to map the projections of the IH_y in female mice and characterize neurochemically areas related to reproductive control innervated by IH_y in this animals using anterograde neuronal tracer, by histochemistry for the tracer and intensified with silver and gold analyzing this innervation in relation to the previously described in rats; analyze the innervation of the MPA by IH_y through the neurons of the gonadotropin releasing hormone (GnRH), using immunohistochemistry and analyze the innervation of the AVPe and Arc by IH_y, using Kiss1-hrGFP mice. As a result, we observed that the areas of interest, MPA, AVPe and Arc receive projections of the IH_y with moderate intensity, however, as in rats, the IH_y of female mice project to areas very related to defensive behavior. Furthermore, in Kiss1-hrGFP, we observed that the innervation of the IH_y circumvents the territory containing KiSS-1 cells AVPe and Arc but this innervation still requires further investigation. Finally, it was not possible to analyze the projections of the IH_y to the GnRH neurons of the MPA, as the only method that has been able to improve the display of anti-GnRH antibody was made impossible by cross-reaction force with the revelation of the BDA.

Keywords: Hypothalamus. Melanin-concentrating hormone. Reproductive system. Anterograde tracer. Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

A área incerto-hipotalâmica (IHy) é uma região diencefálica localizada entre o hipotálamo medial e a zona incerta. O estudo da IHy foi prejudicado por muito tempo em virtude de seu limite citoarquitetônico impreciso, que levou os autores a considerar essa região como parte da zona incerta (ZI), dando origem a inferências funcionais incorretas, além de denominações confusas.

Nosso grupo tem adotado, desde 2003, a delimitação da IHy através de marcadores quimioarquitetônicos e dedicou-se a esclarecer alguns aspectos citoarquitetônicos, neuroquímicos, hodológicos e funcionais da IHy (Bueno et al., 2016; Bueno et al., 2013; Elias et al., 2008; Silva et al., 2013; Sita, Elias, Bittencourt, 2003, 2007; Sita et al., 2016) que culminaram na padronização da nomenclatura dessa região para área incerto-hipotalâmica (Sita, Elias, Bittencourt, 2007), denominação esta já incorporada por diversos pesquisadores (Bittencourt, Celis, 2008; Elias et al., 2008; Espana, Clotman, 2012; Geerling et al., 2010; Lagos et al., 2009; Lee et al., 2009; Mul et al., 2011; Nakamura et al., 2009; Torterolo, Sampogna, Chase, 2009).

Nossos dados até o momento sugerem que a área incerto-hipotalâmica participa da circuitaria relacionada ao controle do ciclo estral de ratas e pode ter um papel significativo na interface entre os sistemas energético e reprodutivo, como será exposto a seguir.

1.1 Arquitetura da IHy

A delimitação da IHy faz-se principalmente por marcadores neuroquímicos. Esses marcadores determinam dois grupamentos neuroquímicos distintos, um caracterizado pela presença de dopamina, visualizada pela presença de tirosina hidroxilase (TH) e constituindo o grupamento dopaminérgico A13 (Dahlström, Fuxe, 1964; Hökfelt et al., 1984), outro, decélulas com maior diversidade neuroquímica, em geral GABAérgicas (Oertel et al., 1982), mas também apresentando o hormônio concentrador de melanina – MCH (Bittencourt et al., 1992; Sita, Elias, Bittencourt, 2003), e/ou o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina – CART (Elias et al., 2001; Vrang et al., 1999), entremeado ao grupamento A13, com aparente contato sináptico com células dopaminérgicas, mas sem colocalização com neurônios dopaminérgicos (Oertel et al., 1982; Sita, Elias, Bittencourt, 2003).

Baseado na sobreposição parcial das células dopaminérgicas com a parte rostral da ZI, essa região foi por muito tempo considerada parte da ZI (Kawana, Watanabe, 1981; Mitrofanis,

2005; Paxinos, Watson, 1998; Swanson, 2004), recebendo 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), citadas inclusive por nosso grupo (Bittencourt, Elias, 1998; Bittencourt et al., 1992; Casatti et al., 2002; Elias, Bittencourt, 1997; Elias et al., 2008; Sita, Elias, Bittencourt, 2003). Por não ter limites citoarquitetônicos nítidos (Gahr, 1997), a IHy não pode ser definida como núcleo, sendo necessário o uso de marcadores neuroquímicos (TH, MCH, CART) para sua delimitação, mostrando 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).

Foi possível definir através de estudos de dupla hibridização *in situ*, que o RNAm do GABA, MCH e CART estão amplamente co-expressos (Elias et al., 2001; Elias et al., 2008). O significado funcional da proximidade das células dopaminérgicas e células GABA/MCH/CART não está bem definido, mas há indícios de que as células dopaminérgicas sofram uma inibição tônica GABAérgica, de modo a modular sua função na regulação da secreção hormonal (Kalia et al., 1999). Desta forma, de acordo com estudos *in vitro*, que demonstraram a redução na frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias em sinapses GABAérgicas promovida pelo MCH (Gao, van den Pol, 2001), o MCH pode agir como modulador da transmissão GABAérgica.

1.2 Hodologia da IHy

A IHy possui um padrão de projeções semelhante ao de núcleos do hipotálamo medial, projetando-se principalmente para estruturas mediais do encéfalo desde os núcleos septais até a substância cinzenta da ponte. Suas projeções são sexualmente dimórficas, notando-se que regiões neuroendócrinas relacionadas ao controle reprodutivo são mais densamente innervadas pela IHy em fêmeas do que em machos.

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 innervação mais expressiva em machos do que em fêmeas e regiões relevantes para a regulação neuroendócrina como a área pré-óptica medial (MPA), o núcleo pré-óptico medial e lateral, o núcleo pré-óptico mediano, o núcleo periventricular do hipotálamo, o núcleo periventricular anteroventral (AVPe) e o núcleo arqueado (Arc) recebem innervação ausente e/ou discreta em machos, porém evidente em fêmeas

(Bueno et al., 2016; Bueno et al., 2013; Sita, Elias, Bittencourt, 2007). Esse padrão de projeções da IHy diferencial em fêmeas, relacionado a núcleos com relevância neuroendócrina, sugere que a IHy esteja exercendo funções relacionadas ao controle reprodutivo das fêmeas, como discutido a seguir.

As aferências da IHy foram estudadas apenas em fêmeas, sendo observado que as principais aferências da IHy são a parte intermédia do núcleo septal lateral, o núcleo pré-óptico mediano e o núcleo paraventricular do tálamo (Bueno et al., 2016; Bueno et al., 2013).

1.3 As funções da IHy – o papel das células MCH

Trabalhos anteriores com lesões da IHy sugeriram que esta área estaria envolvida na regulação da liberação do hormônio luteinizante (LH). Lesões eletrolíticas e com ácido ibotênico ou com 6-hidroxidopamina bilaterais da IHy, abolem o pico ovulatório plasmático do hormônio luteinizante e induzem diestro (MacKenzie et al., 1984; MacKenzie, James, Wilson, 1988; Sanghera, Anselmo-Franci, McCann, 1991). Essa função parecia ser dependente das células dopaminérgicas do grupamento A13, pois a injeção de dopamina na IHy induz a um aumento na concentração plasmática de LH (MacKenzie et al., 1984). O papel neuroendócrino das células MCH da IHy ainda não está esclarecido.

Até o momento, na ausência de estudos funcionais, a funcionalidade da IHy pode ser inferida através de estudos hodológicos. Em ratos, a IHy possui conexões que a colocam claramente como um componente do circuito de defesa hipotalâmico medial. Essa hipótese motivou um estudo sobre o papel da IHy no comportamento de defesa. Nesse trabalho observamos que a lesão da IHy abole a resposta de defesa de ratos frente ao gato, seu predador natural (Sita et al., 2016). A atuação da IHy de fêmeas no comportamento de defesa ainda precisa ser investigada.

A maior densidade de projeções da IHy para regiões com funções neuroendócrinas em ratas, em comparação a ratos, sugere que a IHy atue no controle reprodutivo. Em ratas, a IHy projeta-se para a área pré-óptica medial que apresenta o hormônio liberador do LH (hormônio liberador de gonadotrofinas- GnRH), para o núcleo periventricular anteroventral e núcleo arqueado que apresentam kisspeptina (KiSS-1) (Bueno et al., 2016; Bueno et al., 2013; Oakley, Clifton, Steiner, 2009). Entretanto, é desconhecida a anatomia da inervação da IHy nessas regiões, de tal forma que é desconhecido se a IHy é capaz de influenciar as células que sintetizam GnRH e KiSS-1.

Uma análise das projeções da IHy também mostra que essa região não deve atuar

diretamente no controle do comportamento alimentar, como seria esperado pela presença do MCH. O MCH é classicamente considerado um peptídeo neuromodulador, orexígeno, sintetizado principalmente na área hipotalâmica lateral e IHy (Bittencourt et al., 1992; Qu et al., 1996; Rossi et al., 1997), que está envolvido em diversas outras funções, incluindo alerta, comportamento exploratório, memória espacial, homeostase energética, tônus simpático, regulação neuroendócrina, depressão, ansiedade e homeostase do sono (Bittencourt, Elias, 1998; Bittencourt et al., 1992; Elias, Bittencourt, 1997; Elias, Frigo, Bittencourt, 1997; McBride et al., 1994; Monzon, De Barioglio, 1999; Monzon et al., 1999; Murray et al., 2000a).

A atuação do MCH na regulação neuroendócrina ocorre através da inervação das células que sintetizam GnRH da MPA (Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005), além de uma clara interação entre o estradiol e o sistema MCH. Em linhas gerais, o MCH poderia modular o eixo reprodutivo, via GnRH, através de um mecanismo estrógeno-dependente (figura 1 - para uma revisão veja Naufahu, Cunliffe, Murray, 2013) que regularia a expressão do RNAm do precursor do MCH. Contudo, é intrigante que os neurônios que sintetizam MCH não apresentam receptores de estrógeno (Muschamp, Hull, 2007; Santollo, Eckel, 2013), dificultando a compreensão acerca do substrato anatômico da ação do MCH sobre o controle reprodutivo.

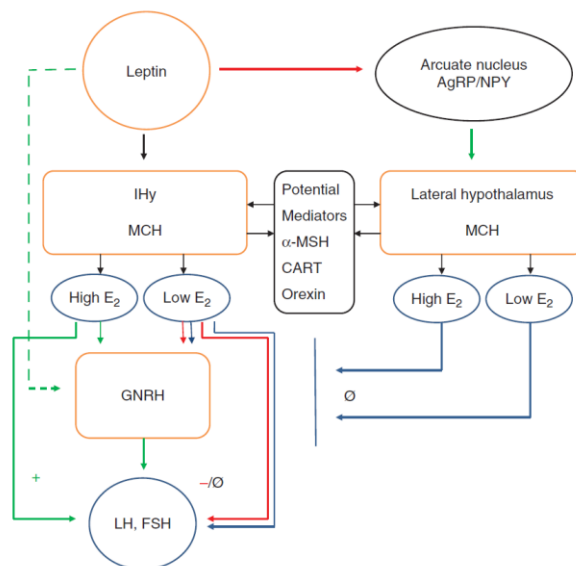


Figura 1- Efeito do MCH (hormônio concentrador de melanina) da IHy (área incerto-hipotalâmica) sobre o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas). Neurônios MCH da IHy exercem efeitos estimulatórios ou inibitórios sobre os neurônios GnRH na liberação do LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) dependendo da presença ou ausência do estrógeno (E_2). Setas vermelhas, inibitórias; setas verdes, estimulatórias; setas azuis, sem efeito; Ø, sem efeito; α -MSH, α -hormônio estimulante de melanócito; CART, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina. Fonte: Naufahu, Conliffe, Murray(2013).

A eminência mediana apresenta significativa marcação de fibras MCH (Bittencourt et

al., 1992; Knollema et al., 1992) e estudos com injeções vasculares de traçador retrógrado sugerem que as fibras MCH da IHy alcançam a eminência mediana (Cvetkovic et al., 2003; Knollema et al., 1992). Além disso, fibras imunorreativas a MCH e NEI (neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina) inervam células apresentando o GnRH na MPA, AVPe e órgão vascular da lâmina terminal (Attademo et al., 2006; Murray et al., 2006; Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005). O NEI é um peptídeo codificado pelo mesmo precursor do MCH (prepro-MCH, ppMCH) e colocalizado com o MCH (Bittencourt et al., 1992).

A injeção de MCH na MPA ou na eminência mediana (em cultura) estimula a liberação de LH em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol, as quais apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de LH (Chiocchio et al., 2001; Gonzalez, Baker, Wilson, 1997; Murray et al., 2000a). Ratas ovariectomizadas sem tratamento hormonal apresentam altos níveis plasmáticos de LH devido a um aumento compensatório dos pulsos de GnRH hipotalâmicos diante da ausência de estrógeno (Haisenleder, Dalkin, Marshall, 1994) e a injeção de MCH nesses animais provoca uma diminuição dos níveis de LH (Murray et al., 2006). Também foi observada uma diminuição nos níveis plasmáticos do LH após injeção de MCH no ventrículo lateral de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol (Tsukamura et al., 2000). É curioso o fato de que a injeção de MCH na IHy de ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol seguido de progesterona provoca uma diminuição da liberação de LH, podendo ser explicado pela presença de auto-receptores nessa região de tal forma que o MCH exógeno inibiria a atividade do MCH endógeno (Murray et al., 2006), atividade esta provavelmente exercida à distância.

Nota-se que existe uma diferença na distribuição anatômica do MCH entre ratos e fêmeas. Apenas fêmeas apresentam células produzindo MCH no núcleo laterodorsal do tegmento, independente do ciclo estral (Rondini et al., 2007) e as células da MPA sintetizam MCH apenas no período de lactação (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010), sugerindo uma função na inibição do comportamento materno e provável atuação no comportamento alimentar, já que houve maior gasto de energia com a amamentação. Na eminência mediana, a distribuição de fibras imunorreativas ao MCH (MCH-ir) varia entre machos e fêmeas, e nos diferentes estágios do ciclo estral, sendo maior no diestro e menor no estro e machos e ainda mais expressivo na fêmea no final do período de lactação (Gallardo, Chiocchio, Tramezzani, 2004; Rondini et al., 2010). O conteúdo de MCH na eminência mediana aumenta ao redor do meio dia do proestro (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). Além disso, O MCH estimula a liberação do GnRH ao ser

injetado, *in vitro*, na eminência mediana de ratas no proestro (Chiocchio et al., 2001). Porém, 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.

O número e a intensidade dosinal de células expressando o RNAm do ppMCH diminui na IHy de fêmeas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (Murray et al., 2000b). Porém, em fêmeas ovariectomizadas sem reposição de estrógeno, há um aumento no número de células imunorreativas ao NEI apenas na IHy (Attademo et al., 2006). Estudos mais recentes mostram que o número total de neurônios MCH hipotalâmicos, a expressão de ppMCH e do receptor tipo 1 do MCH (MCHR1) diminui no proestro e com a administração de estradiol em fêmeas ovariectomizadas (Santollo, Eckel, 2013). Dados recentes de nosso grupo, ainda não publicados, mostram um aumento na expressão do RNAm do ppMCH apenas na IHy durante o proestro de ratas em comparação ao diestro (Bueno et al., 2016; Bueno et al., 2013). Resultados de nosso grupo também 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 ovariectomizados ou considerando toda a população MCH, sem distinção dos grupamentos na LHA e IHy, observamos que o estradiol regula negativamente o MCH (Murray et al., 2000b; Santollo, Eckel, 2013), mas nosso grupo tem observado que 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 ovariectomizadas 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 A importância das kisspeptinas no controle reprodutivo

Os dados hodológicos e funcionais apresentados nos tópicos anteriores conduzem à hipótese de que a IHy desempenhe um papel no controle da ovulação. Por outro lado, a literatura atual tem atribuído papel preponderante às kisspeptinas no controle neuroendócrino da ovulação.

Kisspeptinas são uma série de peptídeos codificados pelo gene *Kiss1* (nomenclatura de acordo com o "Committee on standardized genetic nomenclature for mice" - Davisson, 1997), ligantes endógenos do receptor GPR54 (atualmente renomeado KiSS-1R), que desempenham um papel chave no eixo reprodutor (Navarro, Tena-Sempere, 2012; Oakley, Clifton, Steiner, 2009). Em humanos, esse gene foi primeiro identificado em 1996 (Lee et al., 1996) como um supressor metastático, e se transformou num marcador benigno para melanomas não-metastáticos. Porém o interesse em sua fisiologia aumentou em 2003 com a identificação de pacientes com formas de hipogonadismo hipogonadotrópico associadas a uma mutação do gene GPR54 (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003), que codifica o receptor de mesmo nome. O mesmo quadro se manifesta em camundongos com deleção genética do gene *Kiss1* (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007).

Neurônios KiSS-1 estão localizados no Arc e AVPe. Durante a fase folicular, o estrógeno mantém a secreção tônica de GnRH. No final da fase folicular, um aumento do estrógeno circulante provoca um pico pré-ovulatório de GnRH. Essa função é mediada pelos receptores de estrógeno tipo alfa – ER α (Wintermantel et al., 2006). Como os neurônios GnRH sintetizam receptores de estrógeno do tipo beta - ER β , mas não ER α (Herbison, Pape, 2001), os neurônios KiSS-1 do AVPe, os quais produzem ER α , influenciam os neurônios GnRH numa alça de feedback positiva (Dumalska et al., 2008; Han et al., 2005; Pielecka-Fortuna, Chu, Moenter, 2008), pois os neurônios GnRH sintetizam amplamente KiSS-1R (Clarkson, Herbison, 2006; Irwig et al., 2004), aumentando a liberação de hormônios gonadotróficos pela hipófise e disparando uma cascata que é considerada essencial para dar início à puberdade (Seminara et al., 2003) e manter a ovulação e fertilidade (Clarkson et al., 2008). Por outro lado, os esteróides influenciam os neurônios KiSS-1 do Arc, os quais atuam nos terminais GnRH da eminência mediana numa alça de feedback negativo. A expressão do *Kiss1* RNA do núcleo arqueado é alterada em função do ciclo estral e aumentada com a ovariectomia (Smith et al., 2005; Smith et al., 2006b) e animais com deleção condicional do gene *Kiss1* em neurônios do núcleo arqueado induzida por adenovírus associado (“kisspeptin-knockdown”) não tem alteração no pico de LH induzido pelo estrógeno mas apresentam ciclos estrais irregulares (Beale et al., 2014), sugerindo que a kisspeptina do núcleo arqueado esteja relacionada com manutenção do ciclo estral. A figura 2 mostra como ocorre este mecanismo no encéfalo de camundongo.

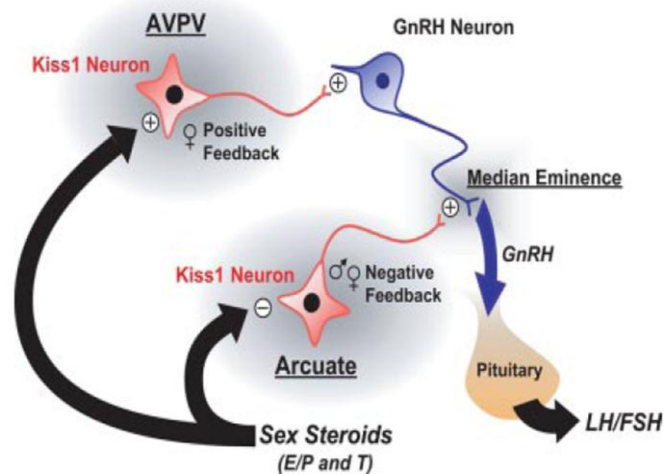


Figura 2- Representação esquemática da sinalização dos neurônios KiSS-1 no encéfalo de camundongo. A kisspeptina estimula a secreção do GnRH por efeito direto em neurônios GnRH. Os neurônios KiSS-1 do ARC estão envolvidos no feedback negativo, na regulação do GnRH/ LH por esteroides sexuais. A expressão de *Kiss1* RNAm no Arc é inibida por estradiol (E), progesterona (P) e testosterona (T). No AVPV estes mesmos hormônios induzem a expressão de *Kiss1* RNAm (feedback positivo). Fonte: Oakley, Clifton, Steiner (2009).

Por outro lado, dados recentes usando modelos genéticos sugerem que as kisspeptinas não são vias exclusivas na regulação da maturação reprodutiva e controle da ovulação. A ablação dos neurônios KiSS-1 de camundongos fêmeas em estágios precoces do desenvolvimento não impede a iniciação e maturação reprodutiva, e esses animais apresentam ciclos estrais normais na vida adulta a despeito da diminuição do tamanho de seus ovários (Mayer, Boehm, 2011).

Outro trabalho envolvendo neurônios KiSS-1 e receptores de leptina também sugere que as kisspeptinas não possuem papel exclusivo na ovulação. A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco que sinaliza como estão os estoques de energia para o eixo reprodutor. Camundongos transgênicos com deleção do gene para a leptina (*ob/ob*) ou seu receptor LepR (*db/db*) desenvolvem obesidade por hiperfagia e são inférteis por apresentarem baixos níveis de LH (Cunningham, Clifton, Steiner, 1999; Tartaglia et al., 1995; Zhang et al., 1994). Surpreendentemente, a deleção seletiva do LepR dos neurônios KiSS-1 não afeta a fertilidade, sugerindo que a kisspeptina não está relacionada ao controle reprodutivo exercido pela leptina (Donato et al., 2011). Além disso, esses autores mostraram que o núcleo pré-mamilar ventral (PMV) é o núcleo chave para a ação da leptina na reprodução, a qual atua de maneira dissociada no controle do metabolismo e da reprodução (Donato et al., 2011).

É interessante informar que lesões no PMV além de interromperem o ciclo estral, provocam diminuição da concentração plasmática de estrógeno e LH, além de diminuição da

presença de proteína Fos (secundário ao proestro) no AVPe (Donato et al., 2009) e também na IHy de fêmeas (Elias, comunicação pessoal).

Além disso, administrar leptina a animais em restrição calórica não impede a diminuição da expressão do *Kiss1*RNA no núcleo arqueado e dos níveis séricos de hormônio luteinizante, sugerindo que a hipoleptinemia não seja um sinal crítico para a inibição da expressão de *Kiss1* no núcleo arqueado e da liberação do hormônio luteinizante durante o balanço energético negativo (True et al., 2011).

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

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos até o momento, concluímos que:

- As projeções da IHy são predominantemente mediais e se distribuem para o encéfalo a partir de um trajeto periventricular, semelhante ao descrito em ratas. É notório que boa parte do trajeto das projeções se aproveita do feixe prosencefálico medial para sua distribuição.
- A IHy do camundongo fêmea projeta-se para áreas relacionadas ao controle reprodutivo: área e núcleo pré-óptico medial, o núcleo periventricular anteroventral, o núcleo periventricular, o núcleo arqueado e o núcleo ventromedial do hipotálamo.
- Não foi possível a análise da inervação das células imunorreativas a GnRH da MPA pela IHy, por problemas metodológicos.
- A IHy do camundongo fêmea inerva o AVPe e Arc, porém não observamos inervação direta das células apresentando KiSS-1.

REFERÊNCIAS¹

Alves BR, Cardoso RC, Prezotto LD, Thorson JF, Bedenbaugh M, Sharpton SM, Caraty A, Keisler DH, Tedeschi LO, Williams GL, Amstalden M. Elevated body weight gain during the juvenile period alters neuropeptide Y-gonadotropin-releasing hormone circuitry in prepubertal heifers. *Biol Reprod.* 2015;92(2):46.

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):313-324.

Beale KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, Sleeth ML, Sam AH, Greenwood HC, McGavigan AK, Dhillon WS, Mora JM, Li XF, Franks S, Bloom SR, O'Byrne KT, Murphy KG. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology.* 2014;155(3):1091-1098.

Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience.* 1982;7(1):133-159.

Bernardis LL, Bellinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res.* 1987;434(3):321-381.

Bittencourt J, Celis ME. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides.* 2008;29(8):1441-1450.

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.

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.

Blanchard DC, Li CI, Hubbard D, Markham CM, Yang M, Takahashi LK, Blanchard RJ. Dorsal preammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. *Neurosci Lett.* 2003;345(3):145-148.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Hori K. An ethoexperimental approach to the study of defense. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S, editors. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishing; 1989.

Boehm U, Zou Z, Buck LB. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell.* 2005;123(4):683-695.

¹De 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

Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, Brailoiu E, Dun NJ. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2005;481(3):314-329.

Brandt HM, Apkarian AV. Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J Neurosci Methods.* 1992;45(1-2):35-40.

Bueno DNM. Estudo das conexões da área incerto-hipotalâmica relacionadas ao controle neuroendócrino. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.

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. 2016.

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.* 2009:1-11.

Canteras NS. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;71(3):481-491.

Canteras NS. Hypothalamic goal-directed behavior-ingestive, reproductive and defensive. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L, editors. *The Mouse Nervous System.* Londres: Academic Press; 2011. p. 539-562.

Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull.* 1997;44(3):297-305.

Canteras NS, Goto M. Connections of the precommissural nucleus. *J Comp Neurol.* 1999a;408(1):23-45.

Canteras NS, Goto M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport.* 1999b;10(2):413-418.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol.* 1994;348(1):41-79.

Canteras NS, Swanson LW. The dorsal preammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10089-10093.

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.

Celis ME. Release of LH in response to alpha-MSH administration. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*. 1985;35(3):281-290.

Cezario AF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur J Neurosci*. 2008;28(5):1003-1015.

Cheong RY, Czieselsky K, Porteous R, Herbison AE. Expression of ESR1 in Glutamatergic and GABAergic Neurons Is Essential for Normal Puberty Onset, Estrogen Feedback, and Fertility in Female Mice. *J Neurosci*. 2015;35(43):14533-14543.

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.

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):8691-8697.

Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006;147(12):5817-5825.

Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*. 2007;56(4):1051-1058.

Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. *J Comp Neurol*. 2000;423(1):83-98.

Constantin S, Iremonger KJ, Herbison AE. In vivo recordings of GnRH neuron firing reveal heterogeneity and dependence upon GABAA receptor signaling. *J Neurosci*. 2013;33(22):9394-9401.

Cravo RM, Frazao R, Perello M, Osborne-Lawrence S, Williams KW, Zigman JM, Vianna C, Elias CF. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS One*. 2013;8(3):e58698.

Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J, Jr., Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazao R, Lee CE, Gautron L, Zigman JM, Elias CF. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*. 2011;173:37-56.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*. 1999;60(2):216-222.

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):31-35.

d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10714-10719.

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.

Davisson MT. Rules and guidelines for genetic nomenclature in mice: excerpted version. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Transgenic Res*. 1997;6(5):309-319.

de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *KiSS1*-derived peptide receptor *GPR54*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10972-10976.

Donato J, Jr., Cravo RM, Frazao R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, Richardson JA, Friedman J, Chua S, Jr., Coppari R, Zigman JM, Elmquist JK, Elias CF. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in *Kiss1* neurons. *J Clin Invest*. 2011;121(1):355-368.

Donato J, Jr., Silva RJ, Sita LV, Lee S, Lee C, Lacchini S, Bittencourt JC, Franci CR, Canteras NS, Elias CF. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci*. 2009;29(16):5240-5250.

Dong HW, Swanson LW. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol*. 2004;471(4):396-433.

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):8003-8013.

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):775-786.

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):255-271.

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, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2000;423(2):261-281.

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. Onecut transcription factors are required for the second phase of development of the A13 dopaminergic nucleus in the mouse. *J Comp Neurol.* 2012;520(7):1424-1441.

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett.* 2004;362(2):103-107.

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology.* 2005;82(5-6):245-255.

File SE, Gonzalez LE, Gallant R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology.* 1999;21(2):312-320.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol.* 2000;422(4):556-578.

Frazao R, Cravo RM, Donato J, Jr., Ratra DV, Clegg DJ, Elmquist JK, Zigman JM, Williams KW, Elias CF. Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor alpha. *J Neurosci.* 2013;33(7):2807-2820.

Frazao R, Dungan Lemko HM, da Silva RP, Ratra DV, Lee CE, Williams KW, Zigman JM, Elias CF. Estradiol modulates Kiss1 neuronal response to ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(6):E606-614.

Fu LY, van den Pol AN. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci.* 2010;30(30):10205-10219.

Gahr M. How should brain nuclei be delineated? Consequences for developmental mechanisms and for correlations of area size, neuron numbers and functions of brain nuclei. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):58-62.

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):152-158.

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):237-252.

Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol.* 2010;518(9):1460-1499.

Gonzalez MI, Baker BI, Wilson CA. Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. *Neuroendocrinology.* 1997;66(4):254-262.

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. 1793–1813.

Halpern M, Martinez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol.* 2003;70(3):245-318.

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):11349-11356.

Herbison AE, Moenter SM. Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus. *J Neuroendocrinol.* 2011;23(7):557-569.

Herbison AE, Pape JR. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol.* 2001;22(4):292-308.

Herkenham M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol.* 1978;177(4):589-610.

Hoffman GE, Le WW, Sita LV. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Curr Protoc Neurosci.* 2008;2:1-26.

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.

Inglefield JR, Schwarzkopf SB, Kellogg CK. Alterations in behavioral responses to stressors following excitotoxin lesions of dorsomedial hypothalamic regions. *Brain Res.* 1994;633(1-2):151-161.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology.* 2004;80(4):264-272.

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):189-197.

Kalra SP, Crowley WR. Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci.* 1984;35(11):1173-1176.

Kawana E, Watanabe K. A cytoarchitectonic study of zona incerta in the rat. *J Hirnforsch.* 1981;22(5):535-541.

Klenke U, Constantin S, Wray S. Neuropeptide Y directly inhibits neuronal activity in a subpopulation of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons via Y1 receptors. *Endocrinology.* 2010;151(6):2736-2746.

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.

Kollack-Walker S, Don C, Watson SJ, Akil H. Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat. *J Neuroendocrinol.* 1999;11(7):547-559.

Kollack-Walker S, Newman SW. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience.* 1995;66(3):721-736.

Kollack-Walker S, Watson SJ, Akil H. Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. *J Neurosci.* 1997;17(22):8842-8855.

Kurunczi A, Hoyk Z, Csakvari E, Gyenes A, Parducz A. 17beta-Estradiol-induced remodeling of GABAergic axo-somatic synapses on estrogen receptor expressing neurons in the anteroventral periventricular nucleus of adult female rats. *Neuroscience.* 2009;158(2):553-557.

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;1265:103-110.

Le WW, Berghorn KA, Rassnick S, Hoffman GE. Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. *Endocrinology.* 1999;140(1):510-519.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(23):1731-1737.

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):925-939.

Lee Y, Davis M. Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J Neurosci.* 1997;17(16):6434-6446.

Liu X, Herbison AE. Estrous cycle- and sex-dependent changes in pre- and postsynaptic GABA_B control of GnRH neuron excitability. *Endocrinology.* 2011;152(12):4856-4864.

Luckman SM, Rosenzweig I, Dickson SL. Activation of arcuate nucleus neurons by systemic administration of leptin and growth hormone-releasing peptide-6 in normal and fasted rats. *Neuroendocrinology*. 1999;70(2):93-100.

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):289-295.

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.

Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, Davies JS, Thompson NM, Aguilar E, Pinilla L, Wells T, Dieguez C, Tena-Sempere M. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*. 2006;147(5):2374-2382.

Masson P. Carcinoids (Argentaffin-cell tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa. *Am J Pathol*. 1928;4(3):181-211.

Mayer C, Boehm U. Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat Neurosci*. 2011;14(6):704-710.

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):757-759.

McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci*. 2004;24(17):4134-4144.

McKenna JT, Vertes RP. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol*. 2004;480(2):115-142.

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):523-528.

Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*. 2009;30(1):26-33.

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

Moga MM, Weis RP, Moore RY. Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1995;359(2):221-238.

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):813-817.

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):1517-1519.

Morton GJ, Mystkowski P, Matsumoto AM, Schwartz MW. Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. *Peptides*. 2004;25(4):667-674.

Motta SC, Goto M, Gouveia FV, Baldo MV, Canteras NS, Swanson LW. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4870-4875.

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.

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):217-223.

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):53-59.

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):157-167.

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):123-126.

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;(1278):66-74.

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):R141-150. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci*. 2009;29(38):11859-11866.

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):327-339.

Normandin JJ, Murphy AZ. Nucleus paragigantocellularis afferents in male and female rats: organization, gonadal steroid receptor expression, and activation during sexual behavior. *J Comp Neurol*. 2008;508(5):771-794.

Novikov LN. Labeling of central projections of primary afferents in adult rats: a comparison between biotinylated dextran amine, neurobiotin and Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Neurosci Methods*. 2001;112(2):145-154.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009;30(6):713-743.

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):463-474.

Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 2013. p. 360.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1998. p. 456.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;38(1-2):247-289.

Pfaff DW, Sakuma Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol*. 1979a;288:203-210.

Pfaff DW, Sakuma Y. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol*. 1979b;288:189-202.

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):1979-1986.

Pielecka-Fortuna J, Moenter SM. Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology*. 2010;151(1):291-300.

Pieribone VA, Aston-Jones G. The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. *Brain Res*. 1988;475(2):259-271.

Pissios P, Trombly DJ, Tzamelis I, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways. *Endocrinology*. 2003;144(8):3514-3523.

Pompolo S, Rawson JA, Clarke IJ. Projections from the arcuate/ventromedial region of the hypothalamus to the preoptic area and bed nucleus of stria terminalis in the brain of the ewe; lack of direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Brain Res*. 2001;904(1):1-12.

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):243-247.

Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*. 2000;103(1):23-37.

Risold PY, Canteras NS, Swanson LW. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*. 1994;348(1):1-40.

Risold PY, Swanson LW. Evidence for a hypothalamothalamocortical circuit mediating pheromonal influences on eye and head movements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3898-3902.

Risold PY, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Rev*. 1997;24(2-3):115-195.

Risold PY, Thompson RH, Swanson LW. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997;24(2-3):197-254.

Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, Sanchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Romero M, Aguilar E, Lopez M, Gaytan F, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology*. 2009;150(11):5016-5026.

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.

Rondini TA, de Crudis Rodrigues B, de Oliveira AP, Bittencourt JC, Elias CF. Melanin-concentrating hormone is expressed in the laterodorsal tegmental nucleus only in female rats. *Brain Res Bull*. 2007;74(1-3):21-28.

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, Ghatge MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*. 1997;138(1):351-355.

Sahu A, Crowley WR, Tatemoto K, Balasubramaniam A, Kalra SP. Effects of neuropeptide Y, NPY analog (norleucine4-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (ovx) and ovx estrogen, progesterone-treated rats. *Peptides*. 1987;8(5):921-926.

Sakuma Y, Pfaff DW. LH-RH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature*. 1980;283(5747):566-567.

Salzberg HC, Lonstein JS, Stern JM. GABA(A) receptor regulation of kyphotic nursing and female sexual behavior in the caudal ventrolateral periaqueductal gray of postpartum rats. *Neuroscience*. 2002;114(3):675-687.

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):433-438.

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;93(4-5):842-850.

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):570-579.

Saper CB. Image is everything. *J Comp Neurol*. 1999;412(3):381-382.

Schenk MP, Manning RJ, Paalman MH. Going digital: image preparation for biomedical publishing. *Anat Rec*. 1999;257(4):128-136.

Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res*. 1986;377(1):147-154.

Seminara SB, Messager 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):1614-1627.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 1989;290(2):213-242.

Shekhar A. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res*. 1993;627(1):9-16.

Shekhar A, Katner JS. Dorsomedial hypothalamic GABA regulates anxiety in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;50(2):253-258.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem*. 1997;45(3):327-343.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1997;388(4):507-525.

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. In: *Neuroscience Meeting Planner*; 2013, San Diego. San Diego, CA: Society for Neuroscience. [cited 2013 nov 13]. [Available from: <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=23eacad5-dc80-4f27-a94f-d53cc73a313d&cKey=19bebfcl-3148-427c-a4d6-0e27ddce204d&mKey=8d2a5bec-4825-4cd6-9439-b42bb151d1cf>]; 2013.

Simerly RB. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. San Diego: Academic Press; 1995. p. 353-376.

Simerly RB. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res.* 1998;92(2):195-203.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 1990;294(1):76-95.

Simerly RB, Swanson LW. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 1986;246(3):312-342.

Simerly RB, Swanson LW. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 1988;270(2):209-242.

Sita LV, Bittencourt JC. Imunoistoquímica. In: Bittencourt JC, Elias CF, editors. Métodos em Neurociência. São Paulo: Roca; 2007. p. 57-79.

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):232-237.

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.

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 2016.

Smith AW, Bosch MA, Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. The membrane estrogen receptor ligand STX rapidly enhances GABAergic signaling in NPY/AgRP neurons: role in mediating the anorexigenic effects of 17beta-estradiol. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305(5):E632-640.

Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol.* 2006a;18(4):298-303.

Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology.* 2007;148(3):1150-1157.

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology.* 2005;146(9):3686-3692.

Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci.* 2006b;26(25):6687-6694.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 1995;377(6549):530-532.

Swanson LW. The hypothalamus. In: Björklund A, Hökfelt T, Swanson LW, editors. *Handbook of chemical neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1987. vol.5. p. 1-124.

Swanson LW. *Brain maps: structure of the rat brain*. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 215.

Swanson LW, Mogenson GJ, Gerfen CR, Robinson P. Evidence for a projection from the lateral preoptic area and substantia innominata to the 'mesencephalic locomotor region' in the rat. *Brain Res*. 1984;295(1):161-178.

Sziklas V, Petrides M. Memory and the region of the mammillary bodies. *Prog Neurobiol*. 1998;54(1):55-70.

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, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-1271.

ter Horst GJ, Luiten PG. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull*. 1986;16(2):231-248.

Thomas GB, Mercer JE, Karalis T, Rao A, Cummins JT, Clarke IJ. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 1990;126(3):1361-1367.

Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW. The efferent connections of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHAL study in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr*. 1992;376(1):143-173.

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.

True C, Kirigiti MA, Kievit P, Grove KL, Smith MS. Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinizing hormone restoration during exit from negative energy balance. *J Neuroendocrinol*. 2011;23(11):1099-1112.

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):529-534.

Turi GF, Liposits Z, Moenter SM, Fekete C, Hrabovszky E. Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice. *Endocrinology*. 2003;144(11):4967-4974.

Veening JG, Coolen LM, de Jong TR, Joosten HW, de Boer SF, Koolhaas JM, Olivier B. Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-Fos and pharmacological studies. *Eur J Pharmacol.* 2005;526(1-3):226-239.

Veenman CL, Reiner A, Honig MG. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods.* 1992;41(3):239-254.

Vertes RP, Crane AM, Colom LV, Bland BH. Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol.* 1995;359(1):90-116.

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):229-237.

Walker DL, Davis M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci.* 1997;17(23):9375-9383.

Walker LC, Kitt CA, Cork LC, Struble RG, Delovade TL, Price DL. Multiple transmitter systems contribute neurites to individual senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1988;47(2):138-144.

Wiegand SJ, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology.* 1982;34(6):395-404.

Willesen MG, Kristensen P, Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 1999;70(5):306-316.

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.

Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron.* 2006;52(2):271-280.

Wouterlood FG, Jorritsma-Byham B. The anterograde neuroanatomical tracer biotinylated dextran-amine: comparison with the tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin in preparations for electron microscopy. *J Neurosci Methods.* 1993;48(1-2):75-87.

Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 1990;296(2):179-203.

Wyss JM, Sripanidkulchai K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* 1984;293(1):1-15.

Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell.* 2005;123(4):669-682.

Zhang C, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology.* 2009;150(5):2388-2394.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-432.