JÉSSICA CATHARINE GOMES DUARTE

"A presença do hormônio concentrador de melanina no ovário no ciclo reprodutivo de ratas *Sprague-Dawley*"

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.

São Paulo
2017

JÉSSICA CATHARINE GOMES DUARTE

A presença do hormônio concentrador de melanina no ovário no ciclo reprodutivo de ratas *Sprague-Dawley*.

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

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

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

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gomes Duarte, Jéssica Catharine
A presença do hormônio concentrador de melanina no ovário no ciclo reprodutivo de ratas Sprague-Dawley / Jéssica Catharine Gomes Duarte; orientador Jackson Cioni Bittencourt. -- São Paulo, 2017.
91 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. MCH. 2. Western blotting. 3. Imuno-histoquímica. 4. MCH sérico. 5. Neurohormônio. I. Cioni Bittencourt, Jackson , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jéssica Catharine Gomes Duarte

Titulo da Dissertação: A presença do hormônio concentrador de melanina no ovário no ciclo reprodutivo de ratas *Sprague-Dawley*

Orientador: Jackson Cioni Bittencourt

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Ao meu avô, Custódio Roque Duarte, por ser um exemplo de vida dedicada ao trabalho, com muito amor e compromisso.

AGRADECIMENTOS

Há tanta gratidão em mim. E há tanto a agradecer...

Aquele que me deu a vida e me fez ser como sou. A Ele devo minha vida, meus propósitos, minhas realizações e aspirações. A Ele devo tudo o que sou e o que tenho. A Deus, minha maior e melhor gratidão.

Aos meu pais, Gerson e Alcinéia e minhas irmãs Jequélie e Jennifer. Só em tentar expressar minha gratidão faltam palavras e sei que nunca vou conseguir externar tudo o que sinto por eles. Por hora, um MUITO OBRIGADA pode ser um resumo muito aquém do que eu realmente gostaria de dizer. Eu os amo mais do que imaginam. Obrigada por acreditarem tanto em mim, confiança essa que jamais serei capaz de responder à altura.

À minha tia Ruthe, a quem tenho muita estima e carinho e que foi fundamental para que eu fosse atrás de minhas realizações. Obrigada por acompanhar meu crescimento e se alegrar com minhas conquistas.

Ao Pedro e Alice, por sempre me lembrarem o lado bom da vida e mesmo tão pequenos me amarem com tanta doçura. E à Larissa e Danilo pela amizade, confiança e por entenderem minhas ausências.

Ao meu orientador Jackson Cioni Bittencourt por ter sido desde o primeiro email, o primeiro contato, sempre e sem exceção, tão solícito e paciente. E, apesar das inúmeras tarefas e funções, estar sempre disponível. Sua orientação foi fundamental para o meu aprimoramento científico (que aliás ainda tem muito o que melhorar). Obrigada por acreditar em mim e me dar oportunidade de crescer. Sei da responsabilidade e espero corresponder às expectativas de ser aluna de um cientista tão competente.

Aos atuais e ex colegas de LNQ e agregados:

Daniella Battagello, por compartilhar comigo as “Aventuras de estudar tecidos periféricos”, e por ser sempre tão disponível e carinhosa;

Denise Gobbo e Lais Pereira pelas companhias nos almoços, pelo carinho, e *insights* na bancada;

Erica Barbeiro e Ga Kim, pelas gargalhadas do dia a dia que ajudam a rotina a ficar mais leve;

Giovanne Baroni, por sua maneira tão estranha em demonstrar carinho e preocupação. Obrigada por ser um apoio tão importante no desenvolvimento e finalização do meu trabalho. Obrigada principalmente pela ajuda na estatística. E obrigada por confiar a mim tanto trabalho durante a rotina do laboratório e na Jornada de Anatomia.

Jéssica Beteto, por tanto trabalho junto, tantas idas e vindas, monitorias e ajuda mútua, por ser paciente, me ajudar em tantas coisas, principalmente nessa reta final.

Jozélia Ferreira pela parceria. Poucos têm o privilégio de poder dividir bancada com uma pessoa tão agradável, mas eu tive. Obrigada por tanta ajuda, tanta conversa e tantos compartilhamentos. Obrigada pelo apoio e pelos socorros do dia a dia. Você foi fundamental nesses meses de desenvolvimento da pesquisa do mestrado.

Lívia Clemente, por ser tão prestativa e ter sempre uma solução para os problemas no momento certo e transmitir tanta calma em suas palavras;

Renata Juliana, pelas conversas, risadas, troca de experiências da vida e dificuldades compartilhadas.

Agradeço também à Jully Martins, Paulo Cândido, Jade Ortega, Márcia Kronka e Jônatas Oliveira.

A professora Dra. Luciane Valéria Sita, pela contribuição em meu aprimoramento acadêmico, quando me permitiu participar do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino por 2 semestres consecutivos e por ter me permitido ministrar uma aula teórica. Agradeço aos alunos do curso de Farmácia e da Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia Ocupacional pela interação. À Lu agradeço também pela contribuição em diversos momentos da rotina laboratorial e pelo carinho que ela demonstra.

À Joelcimar Martins e Renata Juliana por terem facilitando o meu início, me ajudando a padronizar protocolos, adaptar as técnicas, programar os experimentos. Cada ajuda foi fundamental para que eu, agora, tivesse um pouco mais de autonomia.

À Ana Cláudia, Constance e Jequélie, minha família em São Paulo. A dificuldade da vinda para essa selva de pedras foi imensamente menor por causa de vocês. Obrigada por terem sido meu abrigo desde o início e por, de forma tão gentil, terem me ajudado de 'portas abertas'. Agradeço 14 x 51 vezes! Sem esquecer, é claro, da versão estendida: Luan, Brunow e Cacá. Obrigada pela amizade e amor.

Ao Matheus, por me ajudar a manter a lucidez em meio a loucura e ser um escape nos momentos difíceis.

Aos familiares no Espírito Santo, Minas Gerais, por todo o Brasil e no mundo.

Aos amigos deixados no Espirito Santo.

À professora Dra. Estela Maris de Andrade Forell Bevilacqua, pelos ensinamentos, cobranças e disponibilidade em ajudar. Obrigada também por abrir as portas do laboratório de forma tão gentil. Agradeço também a Aline, Sara, Caroline, Gabriela, Karen, Rose, Elaine, Carla e demais membros do Laboratório de Estudos da Interação Materno-fetal e da Biologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB/USP. Obrigada, pela ajuda nas técnicas de RT-PCR e imuno-histoquímica pela fosfatase alcalina e pela convivência no laboratório.

À professora Dra. Maria Teresa Machini e o técnico Dr. Cléber Liria do Laboratório de Química de Peptídeos do Instituto de Química/USP por gentilmente me permitirem o usar do speed-vac na preparação de amostras para dosagem sérica hormonal.

Ao professor Dr. José Cipolla Neto por ter permitido que eu desenvolvesse a técnica de *western blotting* em seu laboratório; e a pós doutoranda Dra. Daniella do Carmo

Buonfiglio pela disponibilidade e por ter me ajudado tanto e tão gentilmente, mais até do que eu esperava.

Aos pós graduandos e professores do Departamento de Anatomia e Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas/USP, pelos encontros nos corredores, pelos eventos, pela troca de experiências e pequenas e grandes ajudas.

Ao Rudá Albuquerque, pela parceria na representação discente. Sem dúvida foram meses de trabalho que contribuíram para um amadurecimento e maior conhecimento de questões administrativas e burocráticas do mundo da pós graduação.

À professora Dra. Elen Haruka Miyabara, presidente da Comissão Coordenadora da Pós Graduação durante a minha representação discente, pela paciência e suporte em diversos momentos.

A todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais e do Departamento de Anatomia pelas diversas ajudas e por serem um suporte ao desenvolvimento do meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela apoio financeiro à pesquisa concedidos ao meu programa de pós graduação bem como ao meu laboratório de pesquisa. Em especial, à CAPES pela bolsa concedida no período do mestrado.

À Professora Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, por ter me acompanhado desde o início até o fim do mestrado, presente na minha banca de ingresso no programa, qualificação e agora de defesa. Pela competência em sempre fazer considerações e sugestões muito proveitosas.

À professora Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves e professor Dr. Newton Sabino Canteras por acreditarem em mim, me permitindo ingressar no Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionias e pelas palavras de apoio durante a realização do mestrado.

À comissão julgadora do exame de qualificação, professoras doutoras Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua e Maria Ines Borella pela avaliação e valiosas contribuições para a conclusão do meu trabalho.

À comissão julgadora do exame de defesa, os professores doutores José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, Fernanda Ortis e Claudimara Ferini Pacicco Lotfi pela disposição em ler, avaliar e contribuir com o meu trabalho.

Aprendi muito e descobri que ainda tenho muito para aprender.
Que ao pouco conhecimento de hoje, muito se acrescente.
E que o que eu farei com ele provoque diferença onde for necessário.

RESUMO

Duarte JCG. A presença do hormônio concentrador de melanina no ovário no ciclo reprodutivo de ratas *Sprague-Dawley* [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

A reprodução é fundamental para a manutenção de uma espécie. Em mamíferos ela apresenta um período de gestação seguido pela lactação. Ratas apresentam um padrão de secreção hormonal cíclico acompanhado de um período de ovulação chamado ciclo estral que compreende as fases: diestro, proestro, estro e metaestro. O ciclo estral, gestação e lactação são eventos regulados pelo padrão hormonal da fêmea, sendo os esteroides ovarianos - estrógeno e progesterona, os principais agentes dessas alterações. Além do mais, esses hormônios apresentam importante influência sobre o hipotálamo através do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. No hipotálamo, centro regulador de uma variedade de comportamentos inclusive o reprodutivo, são produzidos diversos peptídeos moduladores, dentre eles o hormônio concentrador de melanina [MCH]. Já foi observada a presença do MCH também em tecidos periféricos, incluindo os testículos - as glândulas produtoras dos hormônios sexuais masculinos. Por isso buscamos sua presença nas glândulas produtoras dos hormônios sexuais femininos, isso é, em ovários. Para tanto, utilizamos ratas da linhagem *Sprague-Dawley* para investigar a presença do MCH nas fases do ciclo estral, em ratas gestantes e lactantes, além de ratos machos para controle. Para a determinação da presença do peptídeo foram utilizados os métodos de imuno-histoquímica e *western blotting*, para a detecção do RNAm utilizamos a hibridização *in situ* e RT-PCR. Além disso, para determinação de níveis séricos hormonais de progesterona, prolactina e MCH, realizamos o ensaio imunoenzimático. Nossos experimentos resultaram em marcação com sondas radioativas, indicando a presença do RNAm do ppMCH no tecido ovariano, confirmado e quantificado pela RT-PCR, além de imunorreatividade ao anticorpo anti-rMCH em ovário de ratas em todas as fases do ciclo reprodutivo, e esta se mostra presente no corpo lúteo e na medula ovariana, resultado quantificado pela técnica de *western blotting*. Além do mais, observamos que os níveis séricos de MCH sofrem alteração durante o ciclo estral, sendo significantemente menores no metaestro, mas constantes durante a gestação e lactação.

Palavras- chave: MCH. *Western blotting*. Imuno-histoquímica. MCH sérico. Neurohormônio.

ABSTRACT

Duarte JCG. The presence of melanin-concentrating hormone in the reproductive cycle in Sprague-Dawley rats ovary. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

Reproduction is fundamental for the maintenance of a specie. In mammals, it has a gestation period followed by lactation. Rats present a pattern of cyclic hormonal secretion accompanied by a period of ovulation called the estrous cycle which comprises the phases: diestrus, proestrus, estrus and metestrus. The estrous cycle, gestation and lactation are events regulated by the hormonal pattern of the female, being the ovarian steroids - estrogen and progesterone, the main agents of these alterations. Moreover, these hormones have important influence on the hypothalamus through the hypothalamus-pituitary-ovary axis. In the hypothalamus, the regulatory center of a variety of behaviors, several peptides modulating these functions are produced, among them the melanin-concentrating hormone [MCH]. In addition to the brain tissue, its presence in several peripheral tissues, including the testes, the male sexual hormones producing glands, has already been observed. Therefore, we aimed to determine the MCH in the female sexual hormones producing glands, that is, the ovaries. We used Sprague-Dawley rats to investigate the presence of MCH in ovary in the estrous cycle phase, as well as during gestation and lactation periods. In order to determine the presence of the peptide, immunohistochemistry and western blotting methods were used. To detect the prepro MCH mRNA, we used in situ hybridization and RT-PCR, and immunoenzymatic assay to determine serum levels of progesterone, prolactin and MCH. Our findings demonstrated the presence of ppMCH mRNA in ovarian tissue, confirmed and quantified by RT-PCR. The immunohistochemistry protocol revealed the MCH peptide in the ovary of rats at all stages of the reproductive cycle, and it is localized in the corpus luteum and ovarian marrow, confirmed and quantified by the western blotting technique. Furthermore, we observed that serum MCH levels vary during the estrous cycle, being lower in metestrus and do not vary during gestation or lactation.

Keywords: MCH. Western blotting. Immunohistochemistry, Serum MCH. Neurohormone.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

ARC - núcleo arqueado

AVPV - núcleo anteroventral periventricular

CL - corpo lúteo

CRH - hormônio liberador de corticotropina

FSH - hormônio folículo estimulante

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofina

HPG - hipotálamo-hipófise-gônada

LH - hormônio luteinizante

MCH - hormônio concentrador de melanina

MPOA - área preoptica medial

MSH - hormônio estimulante de melanócitos

Pmch - gene codificante do precursor do hormônio concentrador de melanina

ppMCH - peptídeo precursor do hormônio concentrador de melanina

PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo

rMCH - anticorpo anti-MCH de rato

TIDA - sistema dopaminérgico túbero-infundibular

VMH - núcleo ventromedial do hipotálamo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstração gráfica dos níveis plasmáticos de prolactina, progesterona e estradiol-17β durante as fases do ciclo estral de rata.....21

Figura 2 - Demonstração gráfica do efeito da estimulação da porção cervical da vagina sobre a secreção de LH, Prolactina, Estradiol e Progesterona.....24

Figura 3 - Demonstração das fases do ciclo estral pela técnica do lavado vaginal 35

Figura 4 – Análise histoquímica do ovário.....46

Figura 5 - Hibridização *in situ* para o RNAm do *Pmch* em ovário de rata.....46

Figura 6 – Nível gênico do *Pmch* no ovário analisado pela técnica de RT-PCR 48

Figura 7 – Imunorreatividade ao anticorpo anti -rMCH na reação de imuno-histoquímica pelo método da peroxidase 50

Figura 8 - Comparação entre os métodos de fixação do ovário após reação de imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina anti-rMCH 52

Figura 9 - Titulação do anticorpo anti-rMCH em ovário fixado pelo método de *methacarn*..... 52

Figura 10 - Imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina: Imunorreatividade ao anticorpo anti- rMCH em células de ovário de rata nas diferentes fases do ciclo estral.....54

Figura 11 - Imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina: Imunorreatividade ao anticorpo anti-rMCH em células de ovário de rata na gestação, 5º e 12º dias da lactação.....55

Figura 12 - Imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina: Imunorreatividade ao anticorpo anti-rMCH em células de ovário de rata no 19º dia de lactação, 26º dia com desmame e 26º dia sem desmame.....56

Figura 13 - Controles da reação de imuno-histoquímica.....58

Figura 14 - Locais de marcação de imunorreatividade em ovário.....60

Figura 15 – Nível protéico do MCH no ovário analisado pela técnica do *western blotting*.....*62*

Figura 16 – Quantificação dos níveis circulantes de progesterona.....64

Figura 17 - Quantificação dos níveis circulantes de prolactina.....66

Figura 18 - Quantificação dos níveis circulantes de MCH: ciclo estral e ovariectomia..... 70

Figura 19 - Quantificação dos níveis circulantes de MCH: gestação e lactação e ovariectomia 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para amplificação do transcrito reverso a partir do RNAm do *Pmch* e do GAPDH 41

Tabela 2 - Registros da presença do MCH em gônadas: estruturas derivadas dos cordões gonadais e suas respectivas localizações.....61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 O ciclo reprodutivo 18
1.1.1Ciclo estral 18
1.1.2 Gestação 19
1.1.3 Lactação 19
1.2 A regulação hormonal do ciclo reprodutivo 20
1.2.1 Ciclo estral 20
1.2.1.1 Estradiol e Progesterona 20
1.2.1.2 Prolactina e Ocitocina 21
1.2.2 Acasalamento e gestação 22
1.2.3 Lactação 24
1.3 Influência dos hormônios ovarianos no hipotálamo (Eixo HPG) 25
1.4 Hipotálamo: modulação endócrina, autonômica e comportamental 26
1. 5 O Hormônio concentrador de melanina 27
1.5.1 MCH na lactação 27
1.5.2 MCH em tecidos periféricos 28
2 JUSTIFICATIVA 30
3 OBJETIVOS 32
3.1 Objetivo geral 32
3.2 Objetivos específicos 32
4 METODOLOGIA 34
4.1 Animais 34
4.2 Determinação do Ciclo Estral 34
4.3 Grupos Experimentais 35
4.4 Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos 36
4.5 Cortes Histológicos e Coloração por Hematoxilina e Eosina 37
4.6 Hibridização in situ 38
4.7 Imuno-histoquímica 38
4.7.1 Método da peroxidase 38
4.7.2 Método da fosfatase alcalina 39
4.8 Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT- PCR) 40

4.9 Western blotting 41
4.10 Ensaio imunoenzimático 42
4.11 Análise estatística 42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Análise histoquímica 45
5.2 Análise do transcrito (RNAm) do Pmch no ovário 45
5.2.1 Hibridização in situ 45
5.2.2 Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) 47
5.3 Análise do peptídeo MCH no ovário 49
5.3.1 Imuno-histoquímica 49
5.3.1.1 Imuno-histoquímica pelo método da peroxidase 49
5.3.1.2 Teste do fixador 51
5.3.1.3 Titulação do anticorpo MCH em tecido ovariano 51
5.3.1.4 Imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina 53
5.3.2 Western blotting 61
5.4 Ensaio Imunoenzimático 63
5.4.1 Progesterona 63
5.4.2 Prolactina 65
5.4.3 Hormônio concentrador de melanina 67
6 CONCLUSÃO 76
7 REFERÊNCIAS* 77
ANEXOS 88

INTRODUÇÃO

"Vem, vamos embora que esperar não é saber
Quem sabe faz a hora, não espera acontecer"
(Geraldo Vandré)

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ciclo reprodutivo

A sobrevivência de um organismo depende de processos biológicos que visam manter a sua homeostasia interna e que permitam a continuação da espécie. A reprodução é fundamental para a manutenção da espécie e por isso seus mecanismos são altamente conservados nos grupos biológicos. Em mamíferos ela apresenta diversos mecanismos que resultam na expressão de um comportamento sexual além do cuidado parental, característico desse grupo biológico.

O ciclo reprodutivo de mamíferos em geral consiste nos períodos de gestação e lactação. Diversas alterações fisiológicas são necessárias no corpo da fêmea de forma a permitir uma adaptação à nova demanda - o suprimento dos filhotes, além da sua própria manutenção (Russell, Douglas, Ingram, 2001). Ao estudar as características observadas em cada fase reprodutiva se faz necessária uma abordagem do ciclo estral, importante para se compreender as alterações apresentadas que são principalmente controladas pelo padrão hormonal.

1.1.1 Ciclo estral

O ciclo estral compreende um período de alterações cíclicas em fêmeas de mamíferos. Essas alterações podem ser fisiológicas, anatômicas e comportamentais, mediadas pelo padrão de secreção hormonal. No ciclo estral existe um período de ovulação acompanhado de secreção hormonal sincronizada e cíclica. Dessa forma, alterações nesse padrão de ovulação causam alteração na secreção de gonadotrofinas (Butcher, Collins, Fugo, 1975). Long e Evans (1922) descreveram extensa e detalhadamente essas alterações sendo este um dos principais trabalhos base para os estudos de reprodução de animais de laboratório. Assim, pode-se dividir didaticamente o ciclo estral de ratas em quatro fases: metaestro [o mesmo que diestro I], diestro [ou diestro II], proestro e estro. Em média, ratas apresentam um ciclo estral de 4 a 5 dias de duração, no qual o estro é a fase onde os níveis circulantes de estradiol são mais altos e é também

o período em que a fêmea se encontra mais receptiva para acasalamento (Long, Evans, 1922; Goldman, Murr, Cooper, 2007)

1.1.2 Gestação

Após a fecundação são observadas alterações que permitem a continuidade da gestação até o momento do nascimento dos filhotes. Por exemplo, assim que a gestação é estabelecida ocorrem mecanismos de prevenção de uma nova fertilização. É estabelecido um mecanismo que permite o aumento dos níveis de prolactina: a estimulação da porção cervical da vagina durante o acasalamento provoca a ativação do núcleo medial da amigdala que age via área préoptica na supressão dos neurônios do sistema dopaminérgico túbero-infundibular [TIDA] no núcleo arqueado [ARC], principal sistema inibitório da secreção de prolactina (Tetel, Getzinger, Blaustein, 1993; Russell, Douglas, Ingram, 2001). A prolactina, por sua vez, inibe a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina [GnRH] pela ativação de secreção da progesterona pelo corpo lúteo (Voogt et al., 2001). Além disso, a placenta secreta lactogênios que possuem efeito de *feedback* negativo no pulso da secreção de GnRH (Erskine, 1995; Russell, Douglas, Ingram, 2001).

Outras alterações também podem ser observadas no corpo da fêmea gestante, como o aumento do fluido corporal e do tecido adiposo, contribuindo para o aumento do peso corporal e a redução da responsividade ao estresse pela modificação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Russell, Douglas, Ingram, 2001).

1.1.3 Lactação

A lactação é um modelo fisiológico ideal para estudar profundas modificações nas funções hipotalâmicas (Smith, True, Grove, 2010). Essas alterações são diversas e resultam no aumento dos níveis séricos de ocitocina e prolactina (Higuchi et al., 1986; Grattan, 2001), produção e ejeção do leite (Crowley, 2015), redução da resposta ao estresse (Brunton, Russell, 2008) e indução do comportamento maternal (Bridges, 2015). Durante a lactação há também uma interrupção do ciclo estral através da inibição dopaminérgica sobre a secreção do GnRH na aérea preoptica medial [MPOA], causando

assim um bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Numan, Stolzenberg, 2009; Liu, Herbison, 2013). Além disso, por ser um estado de balanço energético negativo, a lactação leva a inibição da função reprodutiva devido a interrupção da ciclicidade ovariana (Fox, Smith, 1984; Tsukamura, Maeda, 2001). Durante o período de lactação podemos observar também a expressão do comportamento maternal e este requer primariamente a ação de estrógeno e progesterona. Um dos principais sítios reguladores desse comportamento, a MPOA, apresenta um aumento na densidade de receptores desses hormônios no fim da gestação (Giordano et al., 1990; Numan et al., 1999; Russell, Douglas, Ingram, 2001).

1.2 A regulação hormonal do ciclo reprodutivo

1.2.1 Ciclo estral

As alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais observadas em ratas durante todo o ciclo reprodutivo são reguladas por alterações hormonais. Como mencionado, o estro é a fase do ciclo estral onde a fêmea se encontra mais receptiva para o acasalamento. Powers (1970) demonstra que essa receptividade requer não apenas estradiol, bem como necessita de um aumento nos níveis de progesterona. Os níveis hormonais de estrógeno e progesterona são regulados pela secreção de GnRH através do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Harris, 1955).

1.2.1.1 Estradiol e Progesterona

Durante o ciclo estral a concentração de estradiol é baixa na fase de diestro, alcançando um pico na manhã do proestro. Durante o estro não há grandes alterações, porém, já no metaestro começa a ter um aumento do estradiol (Yoshinaga, Hawkins, Stocker, 1969; Shaikh, 1971) [Figura 1]. Em relação a progesterona, durante o ciclo estral observa-se a presença de dois picos de secreção: o primeiro devido a secreção do corpo lúteo, começando na manhã do metaestro, atingindo pico no diestro e imediatamente retornando a níveis basais. O outro é o pico pré-ovulatório já na tarde do proestro, retornando ao basal no início do estro (Ichikawa et al., 1974; Butcher, Collins, Fugo, 1975) [Figura 1].

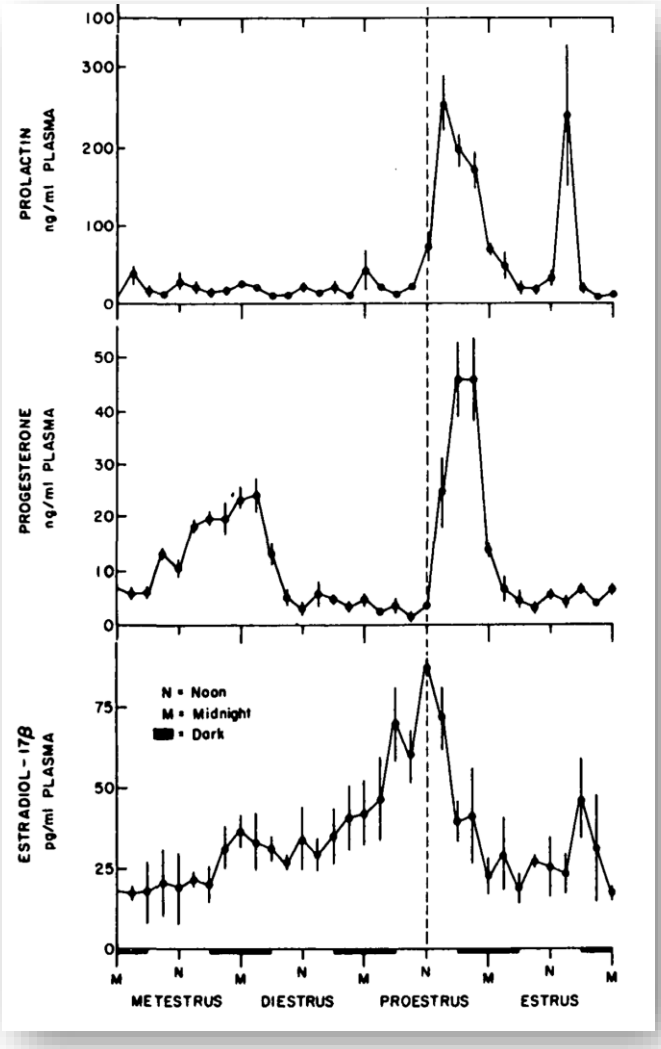

Figura 1 - Demonstração gráfica dos níveis plasmáticos de prolactina, progesterona e estradiol-17β durante as fases do ciclo estral de rata, para fins de ilustração do ítem 1.2.1.1. Valores de prolactina e progesterona em ng/ml e estradiol-17β em pg/ml. Extraído de (Butcher, Collins, Fugo, 1974).

1.2.1.2 Prolactina e Ocitocina

Em relação aos hormônios não ovarianos citados observa-se um padrão de secreção regulado pelos níveis de estrógenos. O TIDA é uma importante inibição da secreção de prolactina durante o ciclo estral (Gudelsky, 1981; Ben-Jonathan, Arbogast, Hyde, 1989; DeMaria, Livingstone, Freeman, 1998). Assim, o estrógeno induz hiperprolactinemia por dois mecanismos distintos: pela desinibição desta ação dopaminérgica e pela estimulação diretas dos lactototrofos, as células produtoras de

prolactina na hipófise anterior (Takahashi, Okazaki, Kawashima, 1984; Reymond, Porter, 1985). A prolactina apresenta uma secreção pulsátil nas fases do ciclo estral. Os picos não são devido a um aumento da frequência, mas sim da amplitude desses pulsos de secreção e essa alteração na amplitude é devido ao pico de estrógenos (Lafuente, Marco, Esquifino, 1993). Dessa forma, a prolactina apresenta um aumento nos níveis circulantes no fim do diestro, alcançando um pico na tarde no proestro e retornando ao nível basal na manhã do estro (Butcher, Collins, Fugo, 1975; Lafuente, Marco, Esquifino, 1993).

Assim como a prolactina, a ocitocina também é modulada pelo estrógeno central e perifericamente. Os principais núcleos produtores de ocitocina, o paraventricular do hipotálamo [PVH] e o supraóptico, apresentam receptores para estradiol (Sar, Stumpf, 1980; Rhodes, Morrell, Pfaff, 1982), além disso a atividade do PVH é maior durante o proestro e estro, devido a estimulação pelo estrógeno (Negoro, Visessuwan, Holland, 1973; Akaishi, Sakuma, 1985). Sabe-se também que a administração de estrógeno estimula a liberação periférica de ocitocina (Yamaguchi, Akaishi, Negoro, 1979), enquanto a ovariectomia reduz de forma significativa a quantidade total do RNAm da ocitocina no encéfalo de ratas (Miller et al., 1989). Assim sendo, é possível concluir que a concentração plasmática de ocitocina também apresenta variação durante o ciclo estral, sendo mais baixa no diestro, aumentando progressivamente no proestro, com níveis mais altos na tarde do proestro e reduzindo novamente a partir da tarde do estro (Sarkar, Gibbs, 1984; Caligioni, Franci, 2002).

Portanto, é possível observar que as variações nos níveis hormonais acima citados [progesterona, prolactina e ocitocina] são direta ou indiretamente regulados pelos níveis de estrogênios.

1.2.2 Acasalamento e gestação

Sabe-se que os esteroides gonadais são necessários para criar um estado de excitação sexual. Essa estimulação pode ser direta pela a ativação de substratos excitatórios; ou indireta, através da inibição de sistemas inibitórios da excitação sexual (Georgiadis, Kringelbach, Pfaus, 2012). Exemplificando, o núcleo ventromedial do hipotálamo [VMH] é uma região crítica para o comportamento sexual (Oomura et al., 1988; Petrulis, 2013). Sua ação de intermediário entre a transmissão de estímulos

sensoriais até os motoneurônios requer a presença de hormônios esteroides, agindo diretamente na promoção do comportamento sexual (Musatov et al., 2006; Griffin, Flanagan-Cato, 2011) . Por outro lado, estrógeno e progesterona podem agir indiretamente no VMH através da inibição de sistemas inibitórios da excitação sexual: estudos com infusões de glutamato ou mesmo do agonista de seu receptor no VMH, causam inibição das fases apetitiva e consumatória do comportamento sexual. Essa inibição porém é revertida em ratas ovariectomizadas quando tratadas com esteroides, comparadas às ratas sem suplementação hormonal (Georgescu et al., 2009).

As alterações neuroendócrinas que ocorrem após o acasalamento estão relacionadas com a secreção de esteroides ovarianos. Sabe-se que elevados níveis de prolactina são necessários para secreção luteal de progesterona durante a gestação. Assim, o acasalamento, através da estimulação da porção cervical da vagina, promove essa liberação de prolactina, que por sua vez resulta em uma ação prolongada da secreção de progesterona, que é necessária para a implantação do blastocisto e para o desenvolvimento do endométrio uterino (Erskine, 1995) [Figura 2]. Dessa forma, a estimulação da porção cervical da vagina desencadeia dois picos diários de secreção de prolactina, sendo que esse efeito dura até o 10º dia de gestação. Isso serve para prolongar a função do corpo lúteo, além de interromper a ciclicidade estral. Esses picos de prolactina desencadeados pelo acasalamento mantém os níveis de progesterona necessários até por volta do 11º dia. A partir daí esses níveis são mantidos pela ação placentária sobre o corpo lúteo (Soares et al., 1991; Erskine, 1995).

Em relação ao estrógeno, sabe-se que durante a gestação, exceto próximo ao parto, seus níveis permanecem mais baixos do que os observados durante o ciclo estral (Shaikh, 1971). Contudo, um aumento é detectado no 4º dia de gestação, possivelmente relacionado a implantação embrionária (Yoshinaga, Hawkins, Stocker, 1969; Shaikh, 1971). Entre os dias 13 e 14 da gestação ocorre um novo pico de estrógeno, juntamente com um aumento na secreção de progesterona, possivelmente pelo aumento na secreção de prolactina devido a ação luteotrófica da placenta e uma secreção hipofisária do hormônio luteinizante [LH] (Schwartz, Talley, 1968; Yoshinaga, Hawkins, Stocker, 1969). A partir daí a secreção de estrógeno tem um significante aumento a partir do 22º dia de gestação, próximo ao parto, atingindo nesse período valores semelhantes aos encontrados no pico pré-ovulatório (Yoshinaga, Hawkins, Stocker, 1969).

1.2.3 Lactação

Durante a lactação há uma intensa inibição nos neurônios produtores de GnRH. Essa inibição, juntamente com o aumento da secreção de prolactina e a manutenção do corpo lúteo, levam a uma ausência de ovulação (Smith, Neill, 1977).

É proposto que no início da lactação a inibição da liberação de GnRH é atribuída principalmente ao estímulo da sucção (Smith, 1978). Durante a segunda metade essa supressão é devido a ação da prolactina, suprimindo a atividade de neurônios *kiss* (Araujo-Lopes et al., 2014; Brown, Herbison, Grattan, 2014). A regulação da prolactina, por sua vez, ocorre de forma a manter os níveis necessários durante a lactação. Essa regulação se dá a partir de uma resposta adaptativa do hipotálamo: ocorre uma diminuição da sensibilidade ao efeito do *feedback* negativo exercido pela prolactina sob a inibição dopaminérgica do TIDA no ARC, resultando em um aumento nos níveis deste hormônio, que é também induzido pela sucção (Valdez et al., 2007).

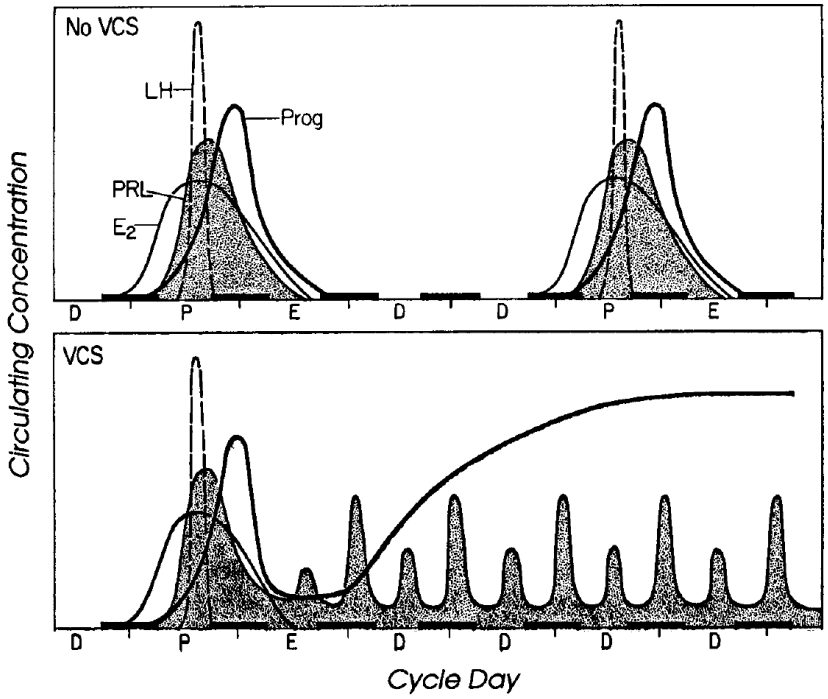

Figura 2 - Demonstração gráfica do efeito da estimulação da porção cervical da vagina (VCS) sobre a secreção de LH, Prolactina, Estradiol e Progesterona, para fins de ilustração do item 1.2.2. Legenda: No VCS: padrão hormonal apresentado durante o ciclo estral de ratas sem acasalamento. VCS: padrão hormonal até o quinto dia pós acasalamento. Área sombreada indica os níveis de prolactina. Retirado de Erskine et al. (1995).

Além do mais, durante a lactação há uma diminuição da responsividade hipotalâmica e hipofisária ao *feedback* positivo de estrógeno, mantendo baixos os níveis de secreção de LH (Smith, 1978; Fukushima et al., 2006).

Por fim, outro fator que contribui para a interrupção da ciclicidade ovariana é a secreção de progesterona pelo corpo lúteo (Smith, Neill, 1977), uma vez que durante a lactação o hipotálamo é o principal sítio de ação da progesterona, suprimindo a secreção pulsátil de LH (Lee et al., 1989).

1.3 Influência dos hormônios ovarianos no hipotálamo (Eixo HPG)

Os hormônios ovarianos, sobretudo o estrógeno, possuem importante controle sobre o hipotálamo. Um exemplo desse efeito é o eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada [HPG], classicamente descrito por Harris (1955). Atualmente já se sabe que o ciclo ovariano é caracterizado por secreção basal de LH e do hormônio folículo estimulante [FSH] onde a cada 4 ou 5 dias, em ratos, apresenta um aumento de liberação dessas gonadotropinas, promovendo a ovulação (Plant, 2015). O estradiol secretado pelos folículos em desenvolvimento exerce um efeito de *feedback* negativo em nível hipofisário e hipotalâmico durante essa fase folicular, sendo que esse efeito de *feedback* no hipotálamo se dá via receptores do tipo alfa de estrógeno em neurônios que apresentam kisspeptinas, neurocinina B e dinorfina, peptídeos moduladores da secreção de gonadotropina no ARC (Levine, 1997; Lehman, Coolen, Goodman, 2010; Yeo, Herbison, 2014; Plant, 2015). Dessa forma, esse efeito de *feedback* negativo parece ser modulador da amplitude dos pulsos de liberação de GnRH (Plant, 2015). Esse *feedback* negativo é tempo e dose-dependente (Couzinet, Schaison, 1993). Dessa forma, no fim da fase folicular, ocorre um *feedback* positivo de estrógeno no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), outra região hipotalâmica com neurônios produtores de kisspeptina, promovendo assim um aumento no nível sérico de LH necessário para que ocorra a ovulação (Goodman, 1978; Filicori, 1999; Oakley, Clifton, Steiner, 2009). Além desse, outro fator controla fisiologicamente o pico pré-ovulatório de LH: os sinais diários sobre o núcleo supraquiasmático, com informações circadianas. A dependência

desses dois fatores [neural e endócrino], para o pico de LH permite que o comportamento sexual e a ovulação ocorram em uma mesma janela temporal (Levine, 1997).

1.4 Hipotálamo: modulação endócrina, autonômica e comportamental

O hipotálamo tem uma importante função na regulação de padrões relativos à sobrevivência, sendo responsável pela modulação endócrina, autonômica e comportamental em diversos aspectos (Swanson, 1987). Em relação a função reprodutiva sabe-se que o hipotálamo é um importante centro regulador dos comportamentos sexual e maternal (por exemplo, na MPOA e VMH) e da secreção de hormônios sexuais (ARC e AVPV) (Harris, 1955; Swanson, 1987).

Ainda sobre o hipotálamo, sabe-se que são produzidos diversos peptídeos moduladores da função reprodutiva. As kisspeptinas, produzidas nos núcleos ARC e AVPV são estimulantes dos neurônios produtores de GnRH (Oakley, Clifton, Steiner, 2009). O ARC também produz a pró-opiomelanocortina, cujo peptídeo derivado, o hormônio estimulante de melanócitos [MSH] estimula o comportamento sexual (Bertolini, Gessa, 1981; Thody, Wilson, Everard, 1981). Além desses, o hormônio adrenocorticotrófico [ACTH] é um exemplo de hormônio extra ovariano que também é capaz de modular o comportamento sexual (Donovan, 1978; Gray, Gorzalka, 1980). A liberação de ACTH é estimulada pelo hipotálamo através da liberação do hormônio liberador de corticotropina [CRH] no PVH (Herman et al., 2003; Brunton, Russell, 2008).

Outro peptídeo hipotalâmico relacionado a função reprodutiva é o hormônio concentrador de melanina [MCH]. É proposto que o mesmo atue como intermediário na regulação entre o balanço energético e a função reprodutiva, fazendo uma comunicação entre os níveis de leptina e neurônios produtores de GnRH (Thong, Graham, 1999; Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005). Além do mais, o MCH deve atuar como um neuromodulador no controle da liberação de hormônios pré-ovulatórios (Gonzalez, Baker, Wilson, 1997). Experimentos *in vitro* demonstraram um aumento dos níveis dos hormônios LH e FSH após incubação com MCH (Chiocchio et al., 2001). Essa estimulação parece ser condicionada a altas concentrações de estrógenos (Chiocchio et al., 2001; Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005). Estudos demonstraram também que

esse peptídeo estimula a liberação de LH quando administrado na MPOA (Gonzalez, Baker, Wilson, 1997).

1. 5 O Hormônio concentrador de melanina

O MCH é um nonadecapeptídeo [em mamíferos] cíclico cujos neurônios produtores estão localizados principalmente nas regiões do hipotálamo lateral, zona incerta, além do tubérculo olfatório e formação reticular pontina paramediana, com extensas projeções para todas as regiões encefálicas, com exceção dos núcleos motores do tronco encefálico e do cerebelo (Bittencourt et al., 1992).

Em mamíferos o MCH se revela como um peptídeo ortólogo do encontrado em teleósteos. Este é proveniente de um precursor, o pré-pró-hormônio concentrador de melanina (ppMCH), que codifica outras duas cadeias peptídicas, o **N**europeptídeo ácido glutâmico - **E** -, isoleucina – **I** [NEI – com atividade biológica já comprovada, vide (Bittencourt, Celis, 2008)] e o **N**europeptídeo glicina - **G** -, ácido glutâmico – **E** [NGE – até o momento sem muitas descrições de sua atividade biológica] (Nahon et al., 1989) .

Classicamente descrito como um peptídeo com função no controle da pigmentação de peixes teleósteos, em antagonismo com o α-MSH (Kawauchi et al., 1983; Mizusawa et al., 2012), atualmente já se conhece diversas funções atribuídas ao MCH, como ingestão alimentar e regulação homeostática (Qu et al., 1996; Flier, Maratos-Flier, 1998), influência no ciclo vigília-sono (Verret et al., 2003; Tsunematsu et al., 2014), 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 (Baker, Bird, Buckingham, 1985; Borowsky et al., 2002), além da integração do balanço energético e função reprodutiva (Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005; Naufahu, Cunliffe, Murray, 2013). Assim, o MCH funciona como um neuromodulador em diversas funções (Nahon et al., 1993).

1.5.1 MCH na lactação

Além das funções previamente descritas, é sabido que o MCH está relacionado ao comportamento maternal. Durante a lactação o MCH apresenta dois novos sítios de

expressão: a MPOA, conhecidamente relacionada ao comportamento maternal, e a região anterior do PVH (Knollema et al., 1992; Numan, 2006; Rondini et al., 2010). Dados do nosso grupo vão além, e demonstram que o pico dessa expressão se dá no fim do período de lactação (Rondini et al., 2010). Esses estudos colocam o MCH como um peptídeo possivelmente relacionado ao controle do término da lactação. Outro estudo do nosso grupo demonstrou que durante esse mesmo estado fisiológico, fibras MCHérgicas se projetam para a lâmina interna da eminência mediana em aproximação com fibras ocitocinérgicas e com potencial relação funcional (Costa, 2013).

1.5.2 MCH em tecidos periféricos

Diversos neuropeptídeos presentes no sistema nervoso central são também encontrados em órgãos periféricos (Waite, Geib, King, 2014). A partir de um estudo realizado em 1993, foi observado a expressão do MCH em outros tecidos além do encéfalo. Essa expressão periférica foi verificada então em tecido cardíaco, no trato gastrointestinal e também em glândulas produtoras dos hormônios sexuais masculinos, os testículos (Nahon et al., 1993; Hervieu, Nahon, 1995). Em testículos, o MCH se localizar especificamente nas células de Sertoli (Hervieu, Nahon, 1995). Essas células somáticas presentes no epitélio dos tubos seminíferos são importantes na espermatogênese por formarem uma barreira hemato-testicular, além de darem sustentação e nutrição às células germinativas (Jiang et al., 2014).

A transcrição do gene Pmch, isto é, o gene codificante do peptídeo MCH é menor em tecidos periféricos, de forma que a quantidade deste RNAm representa apenas 1-2% da expressão no encéfalo (Hervieu, Nahon, 1995). Sabe-se que o RNAm do Pmch expresso em tecidos periféricos apresenta um tamanho distinto em relação ao encontrado no hipotálamo (Nahon et al., 1993). Nesse mesmo trabalho, esse grupo demonstrou que o tamanho do RNAm varia se comparado entre os tecidos, isso devido possivelmente a mudanças na cauda poli A. Esse mesmo grupo propôs que a quantidade de RNAm encontrada seja variável de acordo com o estado fisiológico do animal (Nahon et al., 1993).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Trabalhos prévios demonstram a presença da proteína MCH e da expressão do RNAm do Pmch não apenas no SNC, bem como em tecidos periféricos, destacando-se aqui os testículos - as glândulas produtoras dos hormônios sexuais masculinos. Isso nos levou a buscar a presença do MCH também na gônada produtora dos hormônios sexuais femininos, isto é, o ovário, e estudar a sua colocalização entre os tipos celulares ovarianos.

Por outro lado, já se sabe que devido a associação com fibras ocitocinérgicas na eminência mediana, o MCH pode atuar como um modulador da função reprodutiva e do comportamento maternal. Esses dados em conjunto justificam a investigação da expressão do transcrito do MCH e imunorreatividade ao MCH em tecido periférico relacionado à reprodução sob diferentes condições fisiológicas: durante cada fase do ciclo estral, em ratas gestantes e lactantes.

Além disso, o estudo da interrelação entre o MCH e outros hormônios, como a prolactina e a progesterona, através da quantificação sérica poderá melhorar o entendimento de sua participação no fenômeno biológico da reprodução.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o hormônio concentrador de melanina no ovário de ratas *Sprague-Dawley* [*Rattus norvegicus*] em diferentes fases do ciclo reprodutivo.

3.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar o MCH no ovário de ratas nas fases do ciclo estral: proestro, estro, metaestro e diestro.

b) Caracterizar o MCH no ovário de ratas durante o período da gestação e em diferentes momentos da lactação.

c) Medir os níveis séricos dos hormônios progesterona, prolactina e MCH de ratas nas diferentes fases do ciclo estral, ovariectomizadas, gestantes e lactantes através de ensaio imunoenzimático.

METODOLOGIA

"Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a ciência
Se eu não tiver amor, nada serei"
(Paulo – I Coríntios 13: 2)

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizadas 78 fêmeas [6 para cada grupo] e 13 machos [3 para controle e 10 para acasalamento] da linhagem *Sprague-Dawley*, com idade inicial de dois meses, pesando 200 – 350 g, todos em fase reprodutiva. Estes foram criados no Biotério do Departamento de Anatomia e mantidos em ambiente controlado, a temperatura ambiente de 22 ± 2 ºC, ciclo claro/escuro (12/12 horas), sendo as luzes acesas às 7 horas, e apagadas às 19 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram mantidos 5 animais por gaiola, exceto gestantes e lactantes, que foram mantidas em gaiolas individuais com seus respectivos filhotes.

Os protocolos utilizados estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA (CONCEA, 2016). Ademais, este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA – ICB/USP), com protocolo registrado sob o nº 31, nas fls 30, do livro 3 para uso de experimentação animal em 18/06/2015.

4.2 Determinação do Ciclo Estral

O ciclo estral das ratas foi determinado utilizando a técnica de lavado vaginal através da injeção e coleta de solução salina [0,9% de NaCl] com uma pipeta descartável, depositada em lâminas. O material coletado foi então analisado ao microscópio de luz com aumento de 10X e a fase do ciclo foi determinada de acordo com a proporção dos três tipos de células: epiteliais, cornificadas e leucócitos (Marcondes, Bianchi, Tanno, 2002). Assim temos as definições de cada fase: 1] diestro, onde observa-se uma predominância de leucócitos; 2] proestro, onde há abundância de células epiteliais nucleadas, muitas vezes formando aglomerados; 3] estro, onde predominam células anucleadas cornificadas e, 4] metaestro, onde há uma proporção semelhante dos três tipos

celulares [Figura 3]. Apenas os animais que apresentaram dois ciclos estrais regulares no período de 15 dias de determinação foram utilizados.

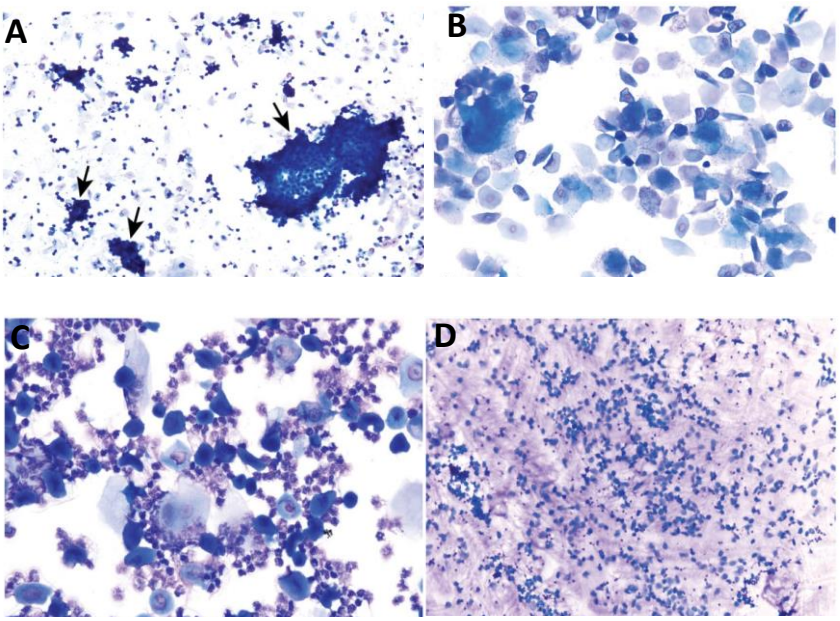

Figura 3 - Demonstração das fases do ciclo estral pela técnica do lavado vaginal. Fotomicrografias em campo claro de lâminas coradas pelo método de azul de toluidina para fins de ilustração do item 4.2. [A] proestro com células epiteliais formando cachos identificados pelas setas, [B] estro, com células anucleadas; [C] metaestro com a presença dos três tipos celulares, [D] diestro, com predomínio de leucócitos. Modificado de (Cora, Kooistra, Travlos, 2015)

4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente separados em grupos, descritos a seguir:

A. Grupo controle: ratos machos

B. Grupos Ciclo estral: fêmeas virgens em idade reprodutiva eutanasiadas em cada fase do ciclo estral

B.1 Grupo proestro

B.2 Grupo estro

B.3 Grupo metaestro

B.4 Grupo diestro

C. Grupo gestação: fêmeas eutanasiadas no 10° dia de gestação

D. Grupos Lactação: fêmeas eutanasiadas em diferentes momentos do período de lactação

D.1. Grupo 5º dia de lactação: eutanasiadas no início do período de lactação

D.2. Grupo 12º dia de lactação: eutanasiadas no meio do período de lactação

D.3. Grupo 19º dia de lactação: eutanasiadas no final do período de lactação

D.4.Grupo 26º dia de lactação com desmame: eutanasiadas no período posterior à lactação, separadas dos filhotes no 21º de lactação

D.5.Grupo 26º dia de lactação sem desmame: eutanasiadas no período posterior à lactação, mantidas com os filhotes até o dia do sacrifício.

E. Grupo ovariectomia: fêmeas ovariectomizadas e eutanasiadas em diferentes períodos

E.1: 4º dia pós ovariectomia: fêmeas ovariectomizadas no diestro e eutanasiadas 4 dias após a cirurgia

E.2: 8º dia pós ovariectomia: fêmeas ovariectomizadas no diestro e eutanasiadas 8 dias após a cirurgia

E.3: 12º dia pós ovariectomia: fêmeas ovariectomizadas no diestro e eutanasiadas 12 dias após a cirurgia

4.4 Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos

Os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta de sangue, ovários e testículos. Para a obtenção do plasma, o sangue foi coletado em tubos contendo 100 µl de EDTA [O,5 M] + 10 µl de coquetel inibidor de protease [Sigma®]/mL de sangue. Após a coleta, o sangue foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos antes de ser centrifugado a 10.000 g e 5 ºC, durante 10 minutos, sendo essa centrifugação realizada duas vezes. O plasma foi então separado e armazenado a temperatura de -80 ºC até o momento da dosagem hormonal. As coletas de sangue foram realizadas de forma padronizada as 13 horas.

Após a decapitação e coleta do sangue, os ovários e testículos também foram coletados. A forma de armazenamento se deu de acordo com a técnica a ser utilizada em cada caso. Os tecidos utilizados na reação de imuno-histoquímica e na coloração de hematoxilina e eosina [H&E] após a coleta foram fixados em duas soluções diferentes para testar a melhor fixação para o tecido em questão: solução de *methacarn* [1mL, 60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético] ou formaldeído 4% em PBS [1mL].

Para a técnica de RT- PCR, os ovários coletados foram armazenamos em solução de TRIzol® [Invitrogen, Carlsbad, CA, USA], à temperatura de -80 ºC. Para a técnica de *western blotting* foram coletados e armazenados à temperatura de -80 ºC, bem como para a hibridização *in situ* cujo armazenamento foi em solução de *Optimal Congelation Temperature* [*Tissue-Tek*® Sakura Finitek USA, Inc., Torrance, California, USA], mantido a -80 ºC.

4.5 Cortes Histológicos e Coloração por Hematoxilina e Eosina

Os ovários, após serem processados e incluídos em parafina, foram cortados em microtómo de parafina [Micrótomo Spencer 820, American Optical Corporation, Buffalo, NY, EUA] e os cortes obtidos na espessura de 5μm foram montados em lâminas de vidro.

A coloração por hematoxilina e eosina foi realizada para análise estrutural do tecido. Após o corte e montagem em lâminas, estes foram colocados em estufa a 36 ºC. Em seguida foram realizadas lavagens em álcool 100% [2 vezes de 5 minutos], em álcool 95% [2 vezes de 5 minutos] e em álcool 85% e 70% [1 vez de 5 minutos, cada], respectivamente. Posteriormente as lâminas foram lavadas por aproximadamente 3 minutos em água corrente para retirada do excesso de álcool, sendo em seguida mergulhadas em hematoxilina de Harris [5 minutos], retirando o excesso com água corrente e então mergulhadas em eosina de Putt por 3 minutos, retirando novamente o excesso com água corrente. O passo seguinte foi a desidratação dos cortes, passando as lâminas em álcool 95% [2 vezes de 2 minutos], em álcool 100% [2 vezes de 2 minutos], em álcool/xilol 50% [1 vez de 2 minutos], em xilol I, II e III [1 vez de 2 minutos, cada]. As lâminas foram então cobertas com lamínulas usando DPX como meio de montagem. Posteriormente, os cortes histológicos foram observados em campo claro com o auxílio de um microscópio Leica DMR. As fotomicrografias foram adquiridas com uma câmera digital SPOT RT® [Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EUA], adaptada ao microscópio. O programa Adobe Photoshop 13.0 foi utilizado para combinar as fotomicrografias em pranchas. Apenas nitidez, contraste e luminosidade foram ajustados.

4.6 Hibridização *in situ*

Essa técnica detecta sequências de RNAm no tecido, pela hibridização *in situ* com sondas marcadas com radioisótopo ^{35}S. Ela foi utilizada com a finalidade de identificação do RNAm do Pmch e foi realizada com cuidado para que todas as soluções fossem livres de RNase e preparadas a partir de água tratada com dietilpirocarbonato [DEPC] e autoclavadas. As sondas foram geradas a partir de um plasmídeo linearizado, por meio de digestão enzimática, e da transcrição *in vitro* utilizando ^{35}S -UTP e uma enzima específica para o plasmídeo. As sondas foram purificadas em colunas de resina, após a digestão com DNAase e então diluídas em solução de hibridização.

Previamente à hibridização, os cortes foram montados em lâminas e pré-tratados com proteinase K e anidrido acético. Após essa etapa, cada lâmina recebeu a solução contendo a sonda [~100 μL] e uma lamínula flexível para sua cobertura, onde permaneceram incubadas a 56 ºC por aproximadamente 14 horas. No dia seguinte, as lamínulas foram removidas por meio de banho em tampão de 2 X cloreto de sódio/citrato de sódio [SSC], quando, então, a série foi incubada em solução com 0,002% de RNAase A em 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em concentração decrescente de SSC, desidratadas e colocadas em filme autoradiográfico pelo período de aproximadamente 24 horas. Após avaliação da efetividade da sonda, através da revelação do filme, passamos à fase de cobrir as lâminas com emulsão fotográfica líquida para a detecção do sinal. Após 15 a 20 dias na emulsão fotográfica, os cortes foram revelados e fixados com as respectivas soluções, desidratados em soluções crescentes de álcoois e deslipidificados com xilol e as lâminas cobertas com lamínulas e meio de montagem DPX.

4.7 Imuno-histoquímica

4.7.1 Método da peroxidase

Essa técnica foi realizada com a finalidade de identificação *in situ* das células que apresentam a proteína MCH no tecido ovariano. O princípio dessa técnica é baseado na interação do antígeno [nesse caso, a proteína MCH] e o anticorpo específico. Para isso, os cortes de ovário já montados em lâminas, foram lavados em solução tampão potássio

fosfato de sódio 0,02 M [KPBS]. Em seguida, para a exposição do antígeno, foi feita a recuperação antigênica com as lâminas mergulhadas em tampão citrato de sódio [pH = 6] por 5 minutos em microondas, e então lavadas em água oxigenada [3%]. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário, anti-rMCH [anticorpo primário policlonal anti-MCH, feito em coelho, PBL#234, rMCH, Dra. Joan Vaughan, The Salk Institute] na concentração 1:1000, em estufa, à 37 ºC por 1 hora e em seguida mantidos a 4 ºC durante aproximadamente 18 horas. A seguir, a incubação com o anticorpo secundário [anticorpo secundário biotinilado anti-coelho feito em cabra - Vector® BA-1000] foi realizada à temperatura de 37 ºC por 1 hora seguida da exposição ao complexo Avidina-Biotina [1:333, Vector®], amplificador do sinal por 1hora a temperatura ambiente. A reação foi feita utilizando o cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina - DAB [0,02 mg/µl] e peróxido de hidrogênio [0,3%].

4.7.2 Método da fosfatase alcalina

De maneira semelhante ao descrito para o método da peroxidase, nesta técnica os cortes de ovários já montados em lâminas foram submetidos a uma etapa de recuperação antigênica com as lâminas mergulhadas em tampão de citrato de sódio e ácido cítrico [pH = 6] e levadas ao micro-ondas por duas vezes de cinco minutos cada. Após essa etapa foram realizadas duas lavagens em tampão Tris Salina 0,02 M, pH = 7,4 + triton a 3% [TBST]. Para bloqueio da fosfatase alcalina endógena foram realizadas duas lavagens de 10 minutos cada em solução de ácido acético a 8%, seguidas de outras duas lavagens de 5 minutos em TBST.

Posteriormente os tecidos foram incubados em solução de BSA a 3% com glicina 0,3% e tween 0,1% em TBS por uma hora, seguida de uma incubação por aproximadamente 18 horas de anticorpo primário anti-rMCH [anticorpo primário policlonal anti-MCH, feito em coelho, PBL#234, rMCH, Dra. Joan Vaughan, The Salk Institute] na concentração de 1:1000 em TBST, a 4 ºC. Após o que, a incubação com o anticorpo secundário [anticorpo secundário biotinilado anti-coelho feito em cabra - Vector® BA-1000] foi feita em TBST, na concentração 1:250 a temperatura ambiente por 1hora seguida pela exposição ao complexo Avidina-Biotina [1:50, Vector®], amplificador do sinal. A revelação foi feita utilizando SIGMAFAST™ Fast Red

TR/Naphthol AS-MX Tablets em tampão Tris [Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA]. Os tecidos foram mantidos em contato com essa solução com a reação sendo interrompida após 3 minutos pela lavagem em água destilada. Logo após o fim dessa reação de imuno-histoquímica os cortes foram submetidos a coloração por hematoxilina de Meyer por 2 minutos e rápido mergulho em solução de corante amarelo em água destilada, para facilitar a identificação da estrutura do tecido, bem como da marcação obtida. As lâminas foram mantidas por 1hora em estufa a 36 °C para secagem e cobertas com lamínulas utilizando tampão glicerol em PBS [9:1] como meio de montagem.

4.8 Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT- PCR)

Essa técnica foi realizada com a finalidade da confirmação da presença do RNAm do Pmch no ovário. Para a extração do RNA do tecido foi utilizado o reagente Trizol® (500 µL por tubo), seguindo um protocolo padrão de homogeneização com politron, centrifugação com clorofórmio a 12.000 g por 15 minutos a temperatura de 4 ºC. Após a retirada do sobrenadante e adição de isopropanol foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições. Por fim, a solução foi colocada para secar e o pellet ressuspendido em água DEPC antes da quantificação.

A etapa seguinte foi a de corrida do RNA em gel de de agarose para avaliação da sua integridade. Essa etapa foi então seguida pelo tratamento com DNAse, construção da biblioteca de cDNA e amplificação da sequência de interesse pela reação em cadeia da polimerase. Os primers necessários para a reação foram desenhados a partir da sequência gênica do Pmch, extraído do banco de dados NCBI - GenBank. As sequências dos primers sense e antisense estão descritas na tabela 1. O produto de PCR gerado a partir desses primers apresenta um tamanho de 379 pares de base (pb). Desenhamos também primers para o gene constitutivo GAPDH para utilizar como controle em nossa reação. As sequências estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para amplificação do transcrito reverso a partir do RNAm do *Pmch* e do GAPDH

	PRIMER	SEQUÊNCIA	BASES
SENSE	MCH	CACAGGAAAAGAGGGAAATTGG	22
ANTISENSE		AGGTATCAGACTTGCCAACAG	21
SENSE	GAPDH	GGTCGGTGTGAACGGATTT	19
ANTISENSE		TGGAAGATGGTGATGGGTTTC	21

Após a corrida das amostras em gel de agarose [1%] por 20 minutos, foram feitas fotografias para posterior análise da densitometria das bandas utilizando o programa ImageJ. Os valores de densidade integrada obtidos foram normatizados pelos valores obtidos na quantificação do gene constitutivo GAPDH. O resultado obtido da diferença entre GAPDH e MCH foi utilizado na análise estatística.

4.9 Western blotting

Para a técnica de *western blotting* seguimos o protocolo descrito a seguir. Os ovários foram homogeneizados usando tampão RIPA (Sigma®) enriquecido com coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Sigma®). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 14.000 RPM. O sobrenadante foi então separado e dosado quanto ao conteúdo protéico usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific). Após quantificação, 50 μg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida (12% SDS-PAGE) e, em seguida, foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência e os ciclos de lavagens, foi feito o bloqueio durante 1 hora com 5% de BSA. Posteriormente as membranas foram incubadas overnight à 4 ºC com os seguintes anticorpos primários: anti-MCH e anti-beta actina em 1% de BSA diluído em TBS-T (25 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20). Após 3 ciclos de lavagens de 10 minutos cada, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IRDye 800CW ou IRDye

680CW (1:10,000, Li-COR) durante 45 minutos, diluído em TBS-T e lavadas em 3 ciclos de 10 minutos.

As proteínas foram visualizadas e analisadas utilizando o sistema Odyssey (Li-COR). As expressões proteicas foram normalizadas de acordo com a beta actina.

4.10 Ensaio imunoenzimático

Para a realização da quantificação de hormônios no plasma obtido dos animais foi utilizada a técnica de ensaio imunoenzimático através da utilização dos seguintes kits comerciais: Melanin Concentrating Hormone Fluorescent Immunoassay Kit, [Phoenix Pharmaceuticals® (FEK-070-47)], Progesterone Elisa [Biovendor® (RCD020R)] e Prolactin Elisa [Calbiotech® (PR063F-100)].

Somente as amostras para a dosagem do MCH foram previamente centrifugadas a vácuo em speed-vac por 8 horas, seguido por outro período de mais 8 horas. Esse procedimento fora realizado visando obter melhores resultados, como sugerido no kit comercial utilizado.

Assim, em todas as dosagens, uma alíquota das amostras foi incubada em uma placa coberta com anticorpos, e após lavagens em solução tamponada uma solução contendo os hormônios quantificados conjugados a biotina foi adicionada a cada um dos poços. Após um novo período de incubação, os poços foram novamente lavados e então incubados em solução do cromógeno TMB [1,2,4-trimetilbenzeno]. A intensidade de reação do cromógeno foi então avaliada em um leitor de placas [BioTek Synergy 2] e através de uma curva padrão foi feita a interpolação para obtenção dos valores de hormônios em cada uma das amostras.

4.11 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos a métodos estatísticos para análise de significância. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de Grubbs para verificação de outliers, e em seguida os grupos amostrais foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade e ao teste de Bartlett para verificação da homocedasticidade. No caso de amostras normais utilizamos o método de ANOVA para verificação de diferenças significantes entre as médias dos grupos. No caso de amostras

que não passaram pelos testes de Kolmogorov-Smirnov utilizamos o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar se há diferença entatística significante entre os grupos. Em todos os casos foi utilizado $p<0.05$ como limite de significância. As análises foram acompanhadas do teste de Dunn para múltiplas comparações entre os grupos experimentais. Todas as análises foram feitas utilizando o software de estatística Prism 5 (GraphPad).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

"I may never find all the answers.
I may never understand why.
I may never prove what I know to be true.
But I know that I still have to try"
(Dream Theater)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise histoquímica

A coloração histológica permitiu a observação da citoarquitetura do tecido ovariano, bem como a diferenciação de estruturas específicas do tecido. Esse resultado serviu de auxílio durante a identificação do tipo celular reativo à reação de imuno-histoquímica [Figura 4].

Assim, observamos no ovário duas regiões: o córtex, onde estão distribuídos os folículos em vários estágios do desenvolvimento e os corpos lúteos, que são folículos pós oocitação; e a medula, região que contém tecido conjuntivo frouxo, além de vasos sanguíneos e nervos.

5.2 Análise do transcrito (RNAm) do Pmch no ovário

5.2.1 Hibridização in situ

O método de hibridização *in situ* revelou a expressão do RNAm do Pmch no ovário de ratas. Os cortes de ovário apresentaram marcação característica com a sonda radioativa, evidenciada pela deposição dos grânulos de prata [Figura 5].

Esse resultado nos indica que há uma produção local do transcrito do gene codificante do MCH [Pmch] no ovário, porém ainda não sabemos o que modula localmente essa transcrição gênica.

Viale, Kerdelhue e Nahon (1999) sugerem uma possível modulação da transcrição gênica do Pmch pelo estradiol, uma vez que os níveis de imunorreatividade ao MCH hipotalâmico aumenta após 72 horas de reposição de estrógeno em macacas ovariectomizadas, coincidindo com o pico de LH. Dessa forma, o MCH pode estar envolvido na regulação do hormônio pré-ovulatório – LH.

A regulação local de produção de MCH no ovário é objetivo de estudos futuros.

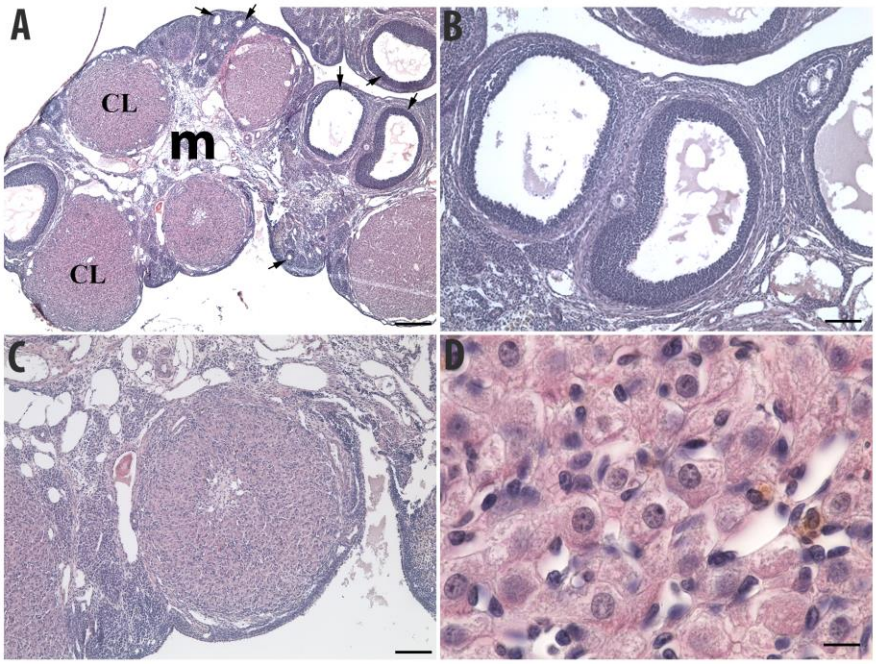

Figura 4 - Análise histoquímica do ovário. Fotomicrografias de campo claro do ovário de rata no 19º dia de lactação em corte transversal submetido à coloração por hematoxilina e eosina.
A, visão geral da estrutura do ovário; B, folículos ovarianos evidenciados; C, corpo lúteo evidenciado; D, estrutura das células do corpo lúteo.
Legenda: CL, corpo lúteo; setas, indicando folículos em vários estágios de desenvolvimento: estruturas presentes no córtex ovariano; m, medula ovariana.
Barra = 250μm em A; 100μm em B e C; 10μm em D.

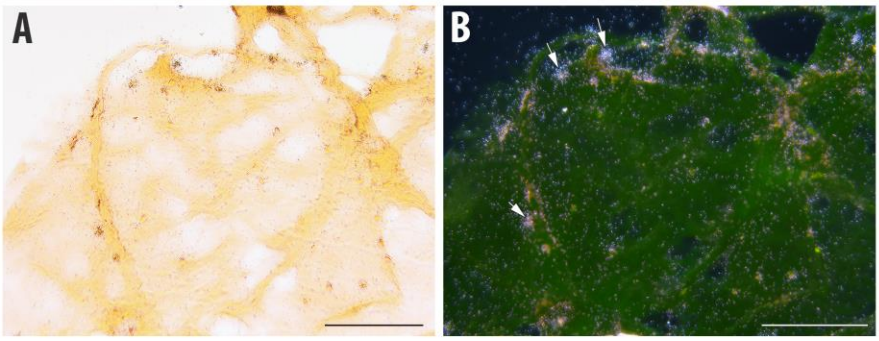

Figura 5 - Hibridização *in situ* para o RNAm do Pmch em ovário de rata em diestro.
A, fotomicrografia em campo claro mostrando pontos de referência citoarquitetônicos no tecido; B, fotomicrografia em campo escuro evidenciando o depósito dos grânulos de prata. Detalhe da marcação evidenciado [setas].
Barra: 100 μm.

5.2.2 Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Visando corroborar os achados prévios obtidos pela hibridização *in situ* e com a intenção de obter um resultado semi quantitativo acerca da transcrição gênica do Pmch no ovário, realizamos a técnica da PCR pela transcrição reversa.

Nossos dados indicam que há de fato expressão do RNAm do Pmch no tecido ovariano, porém essa expressão não varia com as fases do ciclo reprodutivo analisadas. Os valores médios obtidos de cada grupo não puderam ter sua normalidade comprovada através do teste de Kolmogorov-Smirnov em função do limitado espaço amostral, de forma que após serem submetidos ao teste de Kruskal-Wallis não observamos diferenças estatisticamente significantes, tanto para o grupo de ciclo estral ($p = 0.14$) quanto para o grupo de gestação e lactação ($p = 0.27$). Os resultados podem ser observados graficamente na Figura 6. Dessa forma, não existe variação estatisticamente significante na expressão do RNAm do Pmch durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo.

Sendo assim, a produção do MCH parece sofrer uma regulação constante ao longo dessas fases, porém o fator determinante desta regulação é ainda desconhecido.

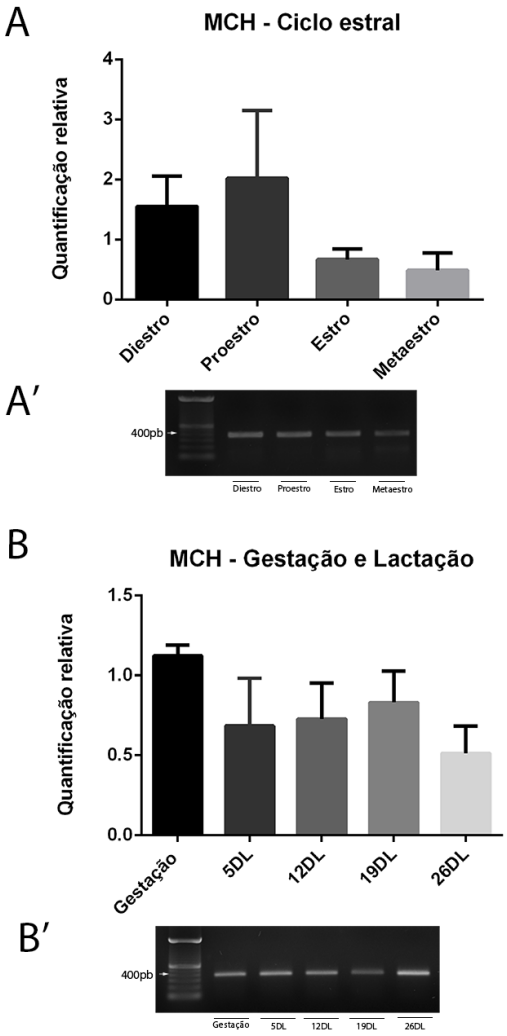

Figura 6 - Nível gênico do Pmch no ovário analisado pela técnica de RT-PCR. A) Quantificação relativa da densitometria da banda relativa ao RNAm do Pmch em gel de agarose dos ovários de ratas nas fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro, metaestro). Barra: desvio padrão da média. A') Gel representativo das amostras com as bandas correspondentes ao transcrito reverso amplificado pela PCR. B) Quantificação relativa da densitometria da banda relativa ao RNAm do Pmch em gel de agarose nos ovários de ratas nas fases de gestação e em diferentes momentos da lactação. 5DL, 5º dia da lactação; 12DL, 12º dia da lactação; 19DL, 19º dia da lactação; 26 DL, 26º dia da lactação. Barra: desvio padrão da média. B') Gel representativo das amostras com as bandas correspondentes ao transcrito reverso amplificado pela PCR. Número amostral = 3 por grupo.

5.3 Análise do peptídeo MCH no ovário

5.3.1 Imuno-histoquímica

Com a finalidade da identificação *in situ* das células produtoras do peptídeo MCH no ovário, submetemos os cortes desse tecido ao método de imuno-histoquímica, que demonstrou a presença de células imunorreativas.

5.3.1.1 Imuno-histoquímica pelo método da peroxidase

Houve a padronização da imuno-histoquímica pelo método da peroxidase para o MCH em ovário. Como controle positivo da reação foram utilizados cortes de testículo, que como esperado, apresentaram marcação, validando a técnica [Figura 7]. Uma vez confirmada a reação do controle positivo, submetemos cortes de ovário ao método da imuno-histoquímica, que revelou a presença de células imunorreativas ao anticorpo do MCH em tecido ovariano. [Figura 7]. Contudo, observamos que este método de coleta e fixação do tecido não permitiu a obtenção de cortes com excelente qualidade histológica, prejudicando a posterior análise de sua estrutura e, de certa forma, dificultando a identificação do tipo celular reativo ao anticorpo utilizado. Para solucionar esse problema buscamos uma nova forma de processamento.

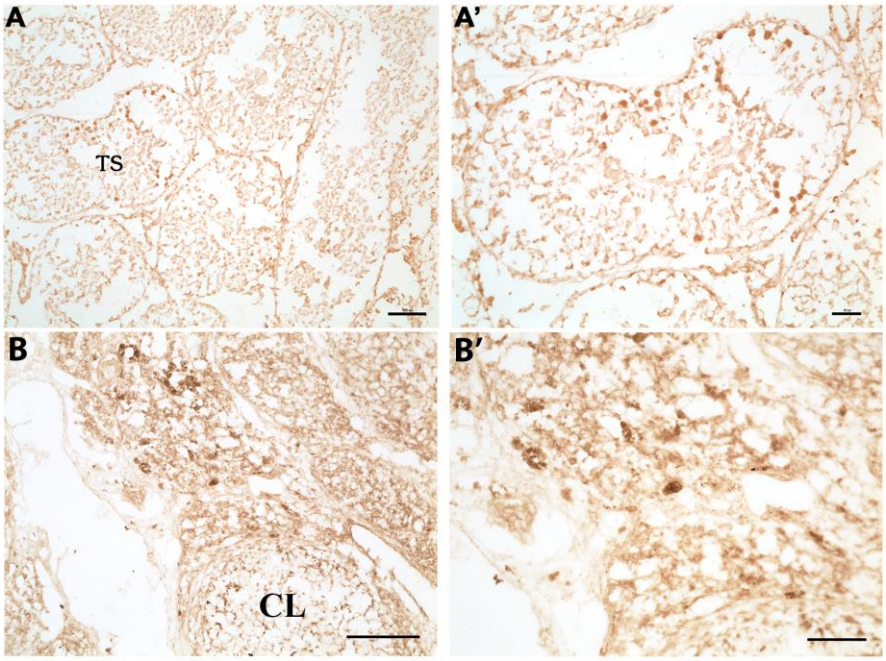

Figura 7 - Imunorreatividade ao anticorpo anti- rMCH na reação de imuno-histoquímica pelo método da peroxidase. Fotomicrografias em campo claro de tecidos submetidos a imuno-histoquímica pelo método da peroxidase. A, corte transversal de testículo de rato; A', detalhe da marcação das células do corte anterior evidenciada em maior aumento; B, corte transversal de ovário de ratas em diestro; B', detalhe da marcação das células do corte anterior evidenciada em maior aumento. Legenda: TS, túbulo seminífero; CL, corpo lúteo. Barra: 100μm em A e B; 40μm em A´e B´.

5.3.1.2 Teste do fixador

Duas novas fixações foram testadas de forma a obter tecido íntegro, com boa morfologia e com boa marcação: a) formaldeído 4% em PBS, ou b) solução de *methacarn* [60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético]. De acordo com nossos objetivos, foi com o segundo método de fixação [*mathacarn*] que obtivemos nossos melhores resultados [Figura 8].

5.3.1.3 Titulação do anticorpo MCH em tecido ovariano

Os ovários fixados em *methacarn* foram submetidos a um teste de titulação para padronização da melhor concentração do anticorpo. As seguintes concentrações foram testadas: [1:300], [1:1.000], [1:3.000] e [1:30.000]. Como resultado, observamos que na imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina a melhor concentração do anticorpo anti-MCH em tecido ovariano foi de 1:1.000 [Figura 9].

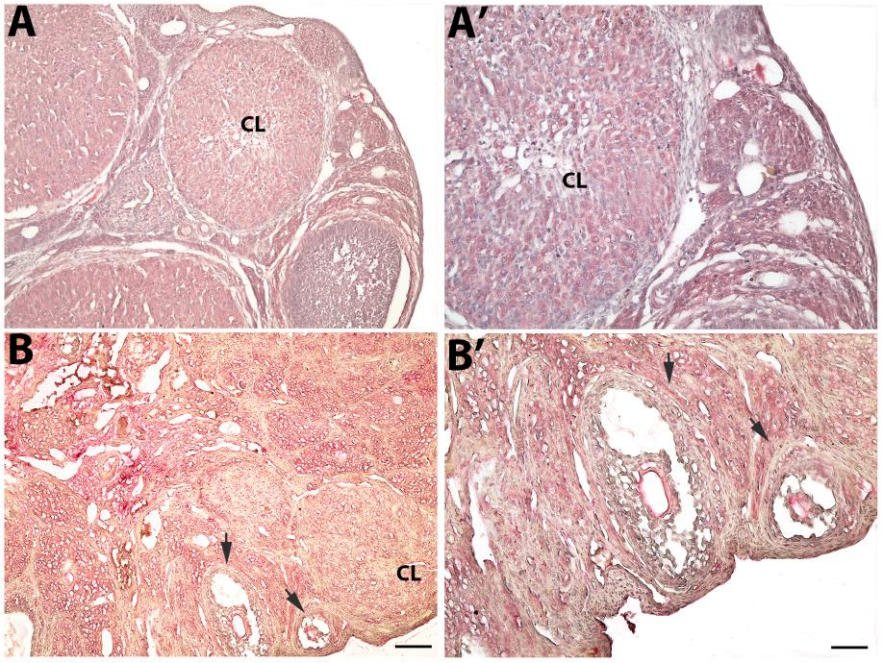

Figura 8 - Comparação entre os métodos de fixação do ovário após reação de imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina anti-rMCH. Fotomicrografias em campo claro. A,A', ovário fixado pelo método de methacarn; B,B', ovário fixado em formalina 10% em PBS. Legenda: CL, corpo lúteo; setas: folículos. Barra: 100μm em A e B; 50μm em B e B´.

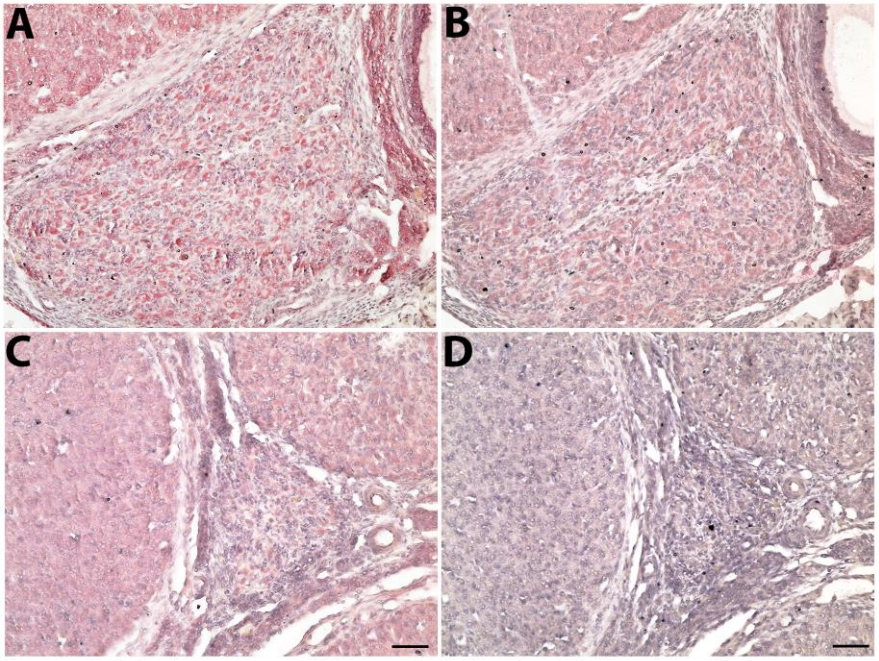

Figura 9 - Titulação do anticorpo anti-rMCH em ovário fixado pelo método de methacarn. Fotomicrografias em campo claro demonstrando a reatividade celular em diferentes concentrações.
A, [1:300]; B, [1:1.000]; C, [1:3.000]; D, [1:30.000]. Barra: 50μm.

5.3.1.4 Imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina

Houve a padronização dessa técnica para o MCH em tecido ovariano. Verificamos a presença de imunorreatividade em todos os grupos experimentais: em ovários coletados em todas as fases do ciclo estral [Figura 10], e de ratas no período de gestação e lactação [Figuras 11 e 12].

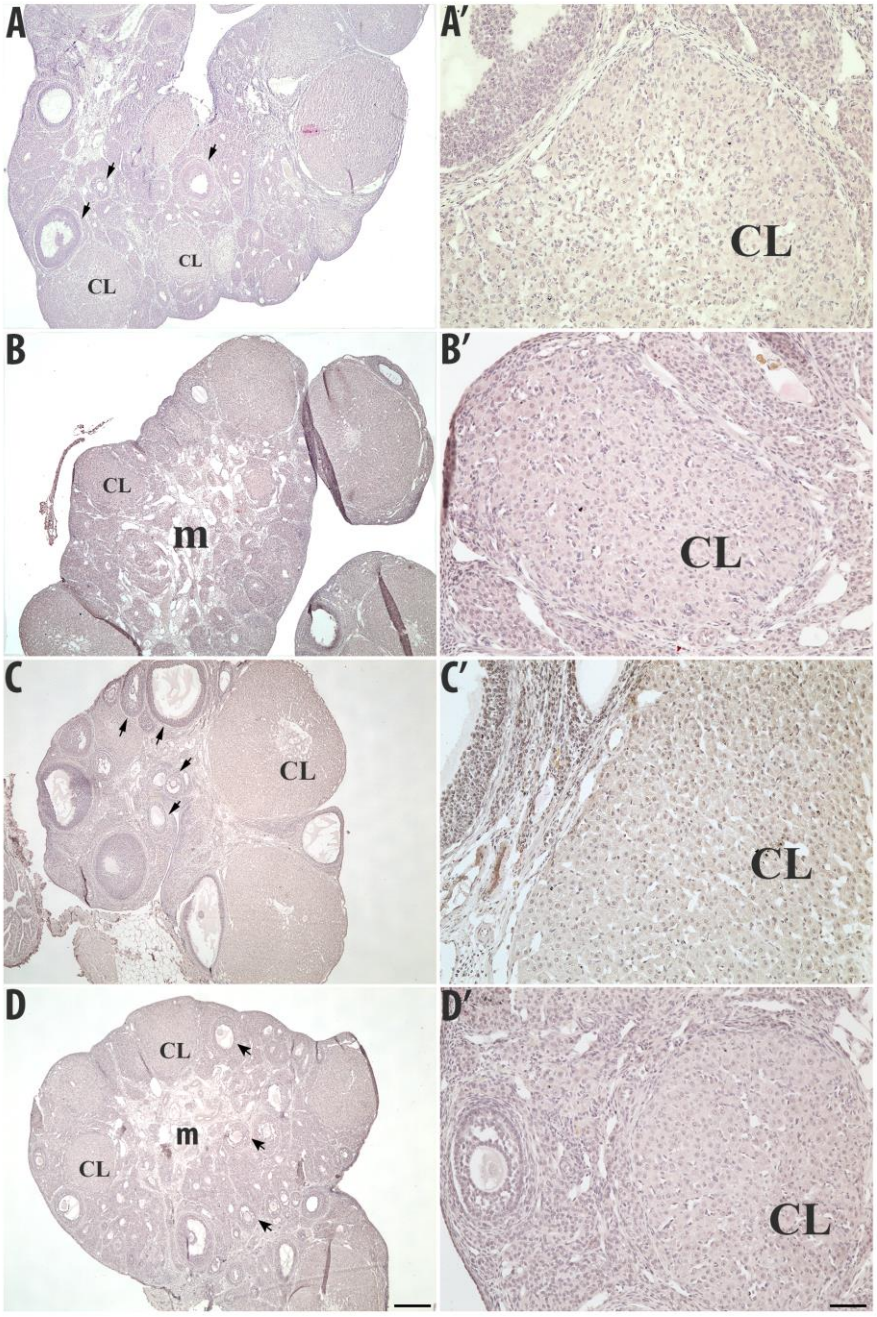

Figura 10- Imunorreatividade ao anticorpo anti- rMCH em células de ovário de rata nas diferentes fases do ciclo estral. Fotomicrografias de campo claro: A, A', Diestro; B, B', Proestro; C, C', Estro; D, D', Metaestro. Legenda: CL, corpo lúteo; seta, folículo; m, medula. Barra: 50μm em A, B, C e D; 40μm em A´, B´, C´e D´.

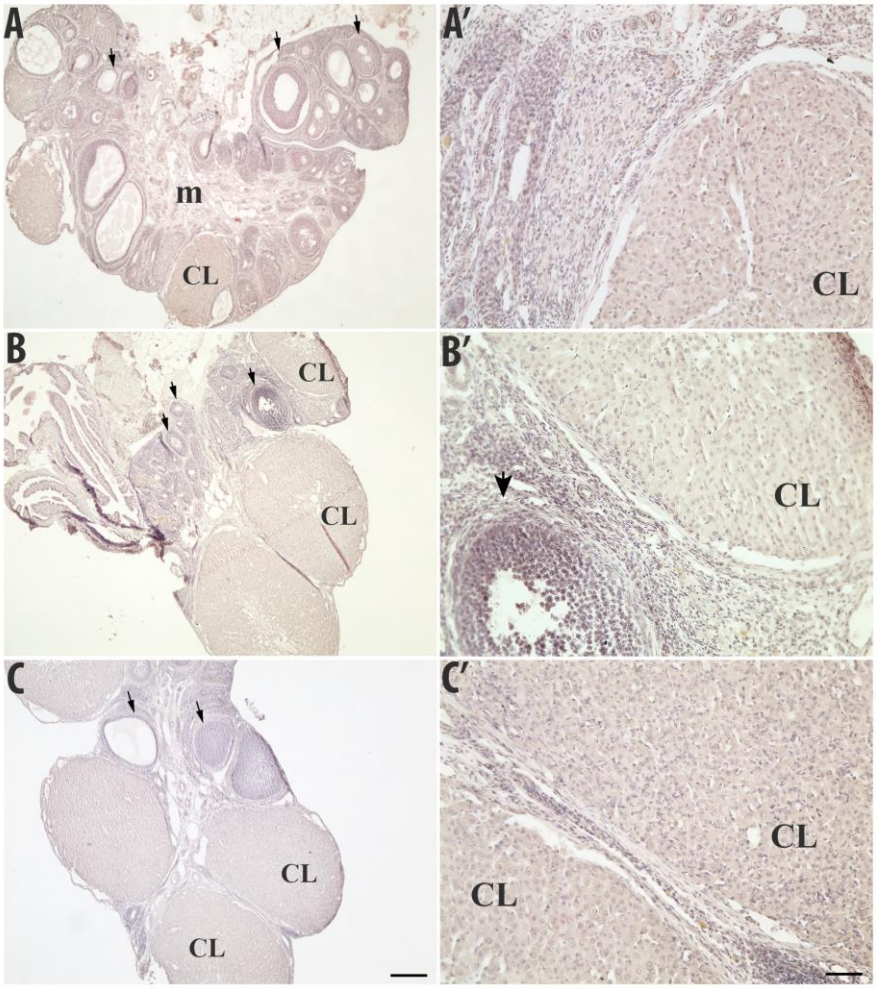

Figura 11 - Imunorreatividade ao anticorpo anti-rMCH em células de ovário de rata na gestação, 5º e 12º dias da lactação. Fotomicrografias de campo claro.
A, A', 10º dia de gestação; B, B', 5º dia de lactação; C, C', 12º dia de gestação.
Legenda: CL, corpo lúteo; seta, folículo; m, medula; Barra: 50μm em A, B e C; 40μm em A', B' e C'.

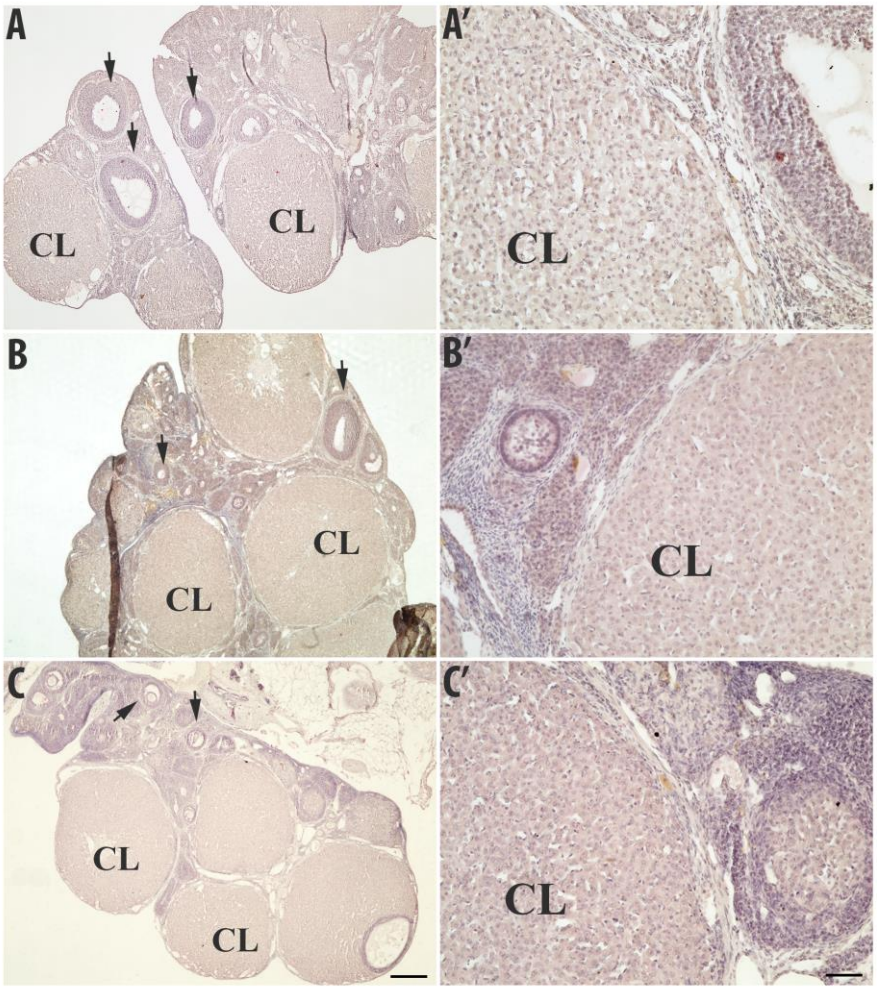

Figura 12 - Imunorreatividade ao anticorpo anti-rMCH em células de ovário de rata no19º dia e 26º dia com desmame e 26º dia de lactação sem desmame. Fotomicrografias de campo claro. A, A', 19º dia de gestação; B, B', 26º dia de lactação com desmame; C, C', 26º dia de lactação sem desmame.
Legenda: CL, corpo lúteo; seta, folículo. Barra: Barra: 50μm em A, B e C; 40μm em A', B' e C'.

a) Controle positivo da reação

Cortes de testículo de ratos foram utilizados para as reações de controle positivo para o MCH. A reação foi capaz de revelar padrão consistente de imunomarcação para MCH nesse tecido [Figura 13].

b) Controle negativo da reação pela omissão do anticorpo primário

Como controle negativo realizamos o mesmo protocolo em ovário, apenas omitindo a incubação em anticorpo primário, sendo utilizada somente solução tampão. O anticorpo secundário e o complexo avidina-biotina foram mantidos. Essa reação não foi capaz de revelar imunomarcação no ovário [Figura 13].

c) Controle de negativo da reação pela substituição por anticorpo irrelevante

Para garantir a especificidade da marcação encontrada realizamos o teste do anticorpo irrelevante (Malik, Lillehoj, 1994). Este consiste em incubar como anticorpo primário outro anticorpo, cujo antígeno esper-ase que não seja produzido no tecido. Esse anticorpo deve ser produzido na mesma espécie animal que o anticorpo de interesse, para descartar a possibilidade de uma marcação inespecífica. Essa reação também não revelou a presença de imunomarcação no ovário [Figura 13].

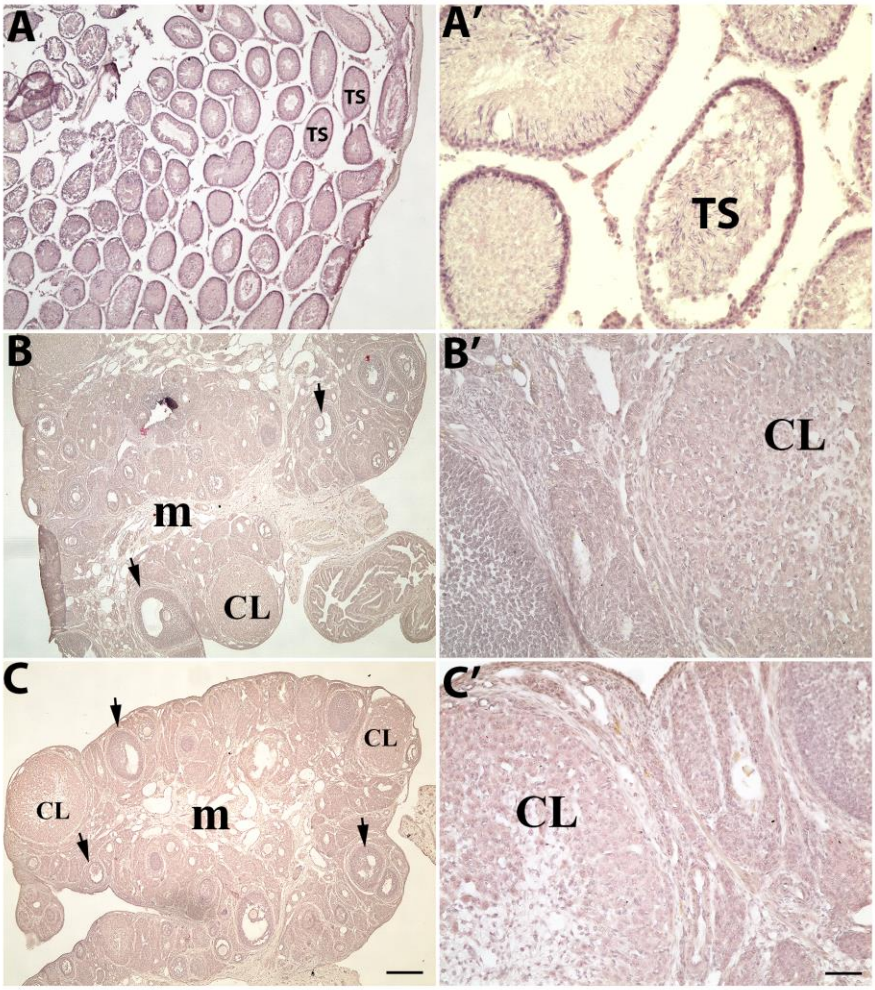

Figura 13 - Controles da reação de imuno-histoquímica. Fotomicrografias em campo claro. A, A', controle positivo: testículo; B,B', controle negativo: ovário; C,C', reação com anticorpo irrelevante (insulina): ovário. Legenda: TS, túbulo seminífero; CL, corpo lúteo, Setas, folículos ovarianos; m, medula.
Barra: 250μm em A, B e C; 50μm em A´, B´e C´.

A imuno-histoquímica revelou marcação em corpo lúteo e na medula ovariana [Figura 14]. Esse resultado foi consistente em todas as fases do ciclo reprodutivo analisadas. Contextualizando essas estruturas descritas temos que, o ovário consiste em duas regiões distintas: o córtex, contendo folículos produtores do ovócito e os corpos lúteos; e medula formada por tecido conjuntivo frouxo, além de nervos e vasos sanguíneos.

Nossos dados confirmam a presença de imunorreatividade do MCH em corpo lúteo, que são folículos pós-ovulatórios, secretores de progestinas e estrógenos. O corpo lúteo é formado por uma reorganização do folículo após o processo de oocitação: as células da camada granulosa dos folículos juntamente com as células da teca sofrem alteração morfológica, aumentando de tamanho e armazenando lipídeos. O corpo lúteo é uma estrutura transitória cuja função é a preparação dos órgãos internos para a gravidez. Caso essa não ocorra este começa a se degenerar, formando o corpo albicans, porém, se ocorrer, o corpo lúteo aumenta de tamanho, secretando progesterona que contribui para a interrupção do desenvolvimento cíclico dos folículos.

Além do corpo lúteo, encontramos marcação na medula ovariana. Esta, no animal adulto, além das estruturas previamente descritas, contém em uma rede ovárica rudimentar, resquício embrionário da gônada antes indiferenciada.

Hervieu e Nahon (1995) descreveram a presença de RNAm do Pmch em tecidos periféricos, incluindo testículos. Nestes, observaram a presença especificamente em células de Sertoli. Estas são células de sustentação, que com seu complexo de junções oclusivas e do tipo *gap* formam um microambiente para o desenvolvimento dos espermatozoides, nos túbulos seminíferos.

Em uma abordagem embriológica notamos que folículos ovarianos e túbulos seminíferos possuem uma origem comum: os cordões gonadais, estruturas epiteliais que penetram na gônada indiferenciada. Nossos dados mostram pela primeira vez que o MCH está localizado em corpo lúteo, estrutura derivada dos folículos após o processo de oocitação. Ainda não compreendemos a ausência de marcação em células foliculares pré-ovulatórias ou o motivo da expressão do peptídeo se dar apenas após a transformação em corpo lúteo.

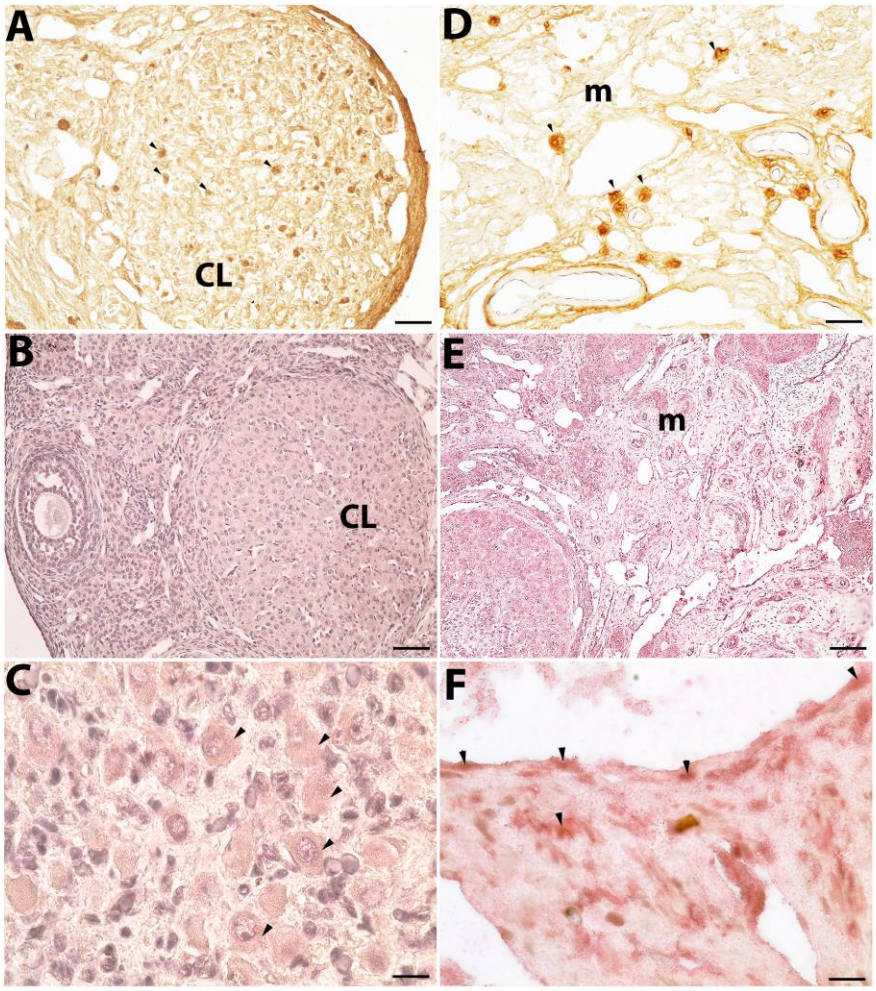

Figura 14 - Locais de marcação de imunorreatividade em ovário. A e D: imuno-histoquímica pelo método da peroxidase; B, C, E e F: imuno-histoquímica pelo método da fosfatase alcalina.
A, B, C: imunorreatividade em corpo lúteo; D, E, F: imunorreatividade em medula ovariana.
Legenda: CL, corpo lúteo, cabeças de setas, detalhe da marcação; m, medula.
Barra: 100μm em E; 50μm em A,B,D; 10μm em C.

A tabela 2 compara os resultados até então registrados da presença do MCH em gônadas.

Tabela 2 - Registros da presença do MCH em gônadas: estruturas derivadas dos cordões gonadais e suas respectivas localizações.

	Embrião XY	**Embrião XX**
Medula	Rede testicular *[a]*	Rede ovárica *[b]*
Córtex	Túnica albugínea	Folículo primordial *[b]*

Legenda: Estruturas derivadas dos cordões gonadais e suas respectivas localizações. A estrutura identificada com [a] é registrada no trabalho de Hervieu e Nahon (1995) como portadoras do RNAm do Pmch; estruturas com [b] são identificadas nosso trabalho como imunorreativas ao anticorpo anti-rMCH.

5.3.2 Western blotting

Realizamos a técnica de *western blotting* para uma análise semi quantitativa da produção do peptídeo MCH no ovário. Através dos dados de densidade óptica foi feita a razão entre os dados obtidos para o MCH e para a proteína de referência beta actina, e os dados estão representados graficamente na figura 15.

Uma vez que os dados não atenderam aos pré-requisitos para testes paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, que revelou não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos amostrais ($p = 0.53$ para o ciclo estral e $p = 0.42$ para os grupos de gestação e lactação).

Esses resultados estão em conformidade com os apresentados até agora. Os valores de MCH não parecem alterar nas fases analisadas, de forma que não encontramos diferenças estatísticas ao compararmos os valores obtidos pela quantificação relativa das amostras.

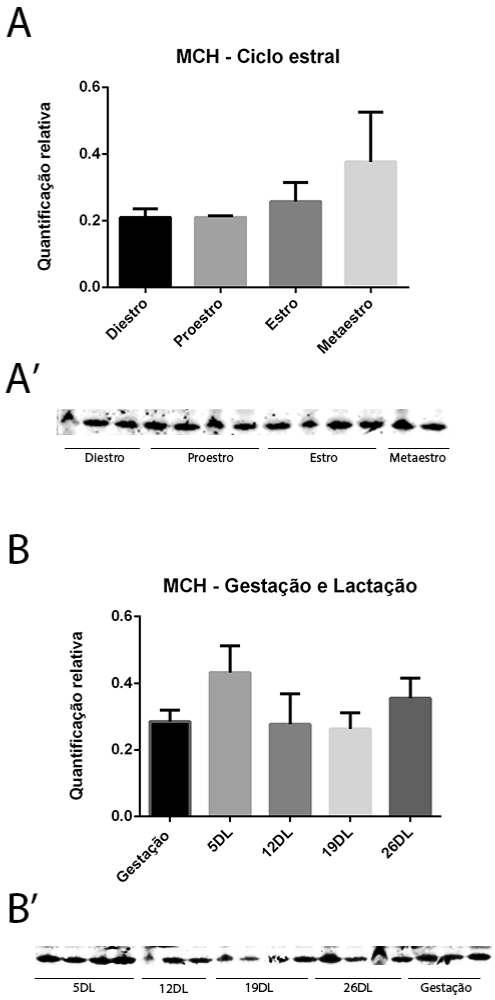

Figura 15 - Nível protéico do MCH no ovário analisado pela técnica de *western blotting*.
A) Quantificação relativa da densitometria da banda relativa ao MCH no ovário de ratas nas fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro, metaestro). Barra: desvio padrão da média. A')Bandas correspondentes ao peptídeo MCH em membrana de nitrocelulose.
B) Quantificação relativa da densitometria da banda relativa ao MCH no ovário de ratas nas fases de gestação e em diferentes momentos da lactação. 5DL, 5º dia da lactação; 12DL, 12º dia da lactação; 19DL, 19º dia da lactação; 26 DL, 26º dia da lactação. Barra: desvio padrão da média. B')Bandas correspondentes ao peptídeo MCH em membrana de nitrocelulose. Número amostral = 3 por grupo.

5.4 Ensaio Imunoenzimático

Foram realizadas as dosagens dos níveis séricos dos hormônios progesterona, prolactina e MCH. Esses valores serão descritos comparando os grupos do ciclo estral [proestro, estro, metaestro e diestro] com os grupos após 4, 8 e 12 dias de ovariectomia [Ovx 4, Ovx 8 e Ovx 12, respectivamente] e, separadamente, comparando os grupos de gestação e de diferentes momentos da lactação [5º, 12º e 19º dias] e com e sem desmame [CD e SD, respectivamente].

5.4.1 Progesterona

Como esperado, o teste de Kruskal-Wallis apontou para um efeito estatisticamente significante da ovariectomia sobre a quantidade de progesterona circulante ($p = 0,0031$). O teste de múltiplas comparações de Dunn revelou diferença significativa entre o grupo proestro [79,34 ng/mL] e ovariectomia 4 dias [5,89 ng/mL; $P< 0,01$], refletindo a diminuição esperada de hormônios ovarianos circulantes após a remoção dos ovários [Figura 16A]. Também observamos efeito da fase do ciclo reprodutivo na quantidade de progesterona ($p = 0,0017$), com diferenças entre o grupo 26º dia de lactação com desmame [25,44 ng/mL] e os grupos 10º dia de gestação [162,26 ng/mL; $p<0,05$] e 5º dia de lactação [187,05 ng/mL; $p<0,01$] [Figura 16B].

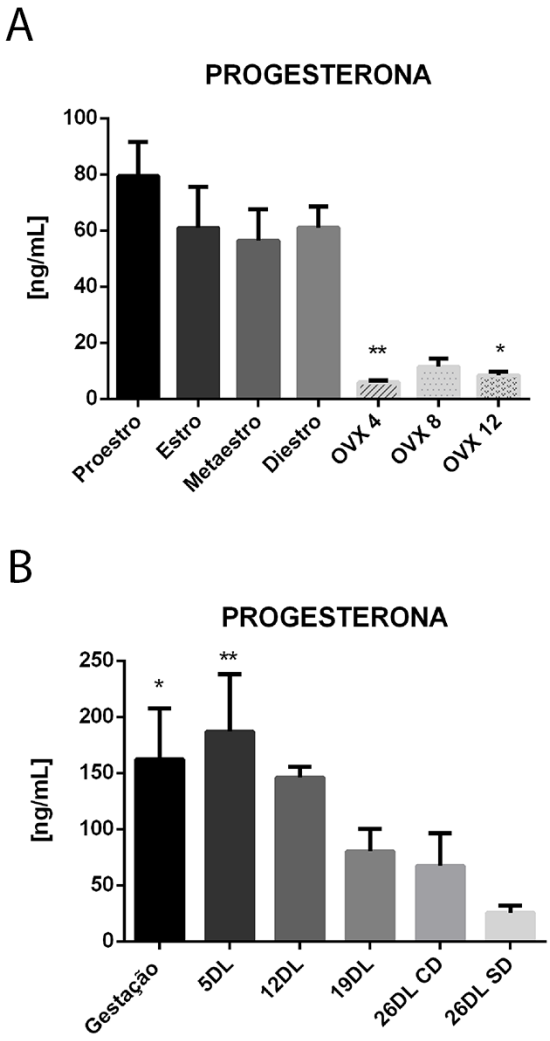

Figura 16 - Quantificação dos níveis circulantes de progesterona.
A) Em ratas nas fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) e 4 dias (Ovx 4), 8 dias (Ovx 8) e 12 dias (Ovx 12) após a ovariectomia. Referência estatística em relação ao grupo proestro. P< 0,05 (*). Barra: desvio padrão da média.
B) Em ratas durante a gestação e em diferentes momentos da lactação (5DL, 5º dia da lactação; 12DL, 12º dia da lactação; 19 DL, 19º dia da lactação; 26 DL, 26º dia da lactação) Referência estatística em relação ao grupo 26DL CD. P< 0,05 (*) e P< 0,01 (**). Barra: desvio padrão da média.

Os baixos valores de progesterona encontrados nas coletas realizadas após a ovariectomia eram esperados, uma vez que a secreção de progesterona é realizada pelo corpo lúteo ovariano. Esses valores servem como controle de nossa dosagem.

O corpo lúteo gestacional secreta progesterona e faz com que seus níveis sejam observados mais altos durante a gestação. Porém, segundo o trabalho de Grota and Eiknes (1967) os valores de progesterona reduzem próximo ao parto, voltando a aumentar por volta do 5º dia de lactação. Essa redução é proposta como mecanismo que permite uma mudança fisiológica em preparação para o parto. Nossos dados se mostraram consonantes, também demonstrando esse aumento nos níveis circulantes de progesterona no início do período de lactação.

Ademais, essa alteração nos valores de progesterona deve funcionar como um controle na secreção de prolactina, onde valores mais baixos de progesterona no final da gestação seguido de um aumento durante a lactação é determinante para a inibição e estimulação, respectivamente, da secreção de prolactina ambos mediados pelo, sistema opióide (Soaje, de Di Nasso, Deis, 2002).

5.4.2 Prolactina

Ao analisar as concentrações de prolactina, o teste de Kruskal-Wallis revelou um efeito significante da fase do ciclo estral ($p = 0,069$) e do ciclo reprodutivo ($p = 0,0008$). Podemos notar uma diferença significativa entre os grupos proestro [7,49 ng/mL] e metaestro [0,84 ng/mL] com $p<0,05$, e entre os grupos 10º dia de gestação [0,62 ng/mL; $p< 0,05$] e 26º dia de lactação com desmame [0 ng/mL; $p< 0,01$] em relação ao grupo 12º dia de lactação [4,12 ng/mL] [Figura 17].

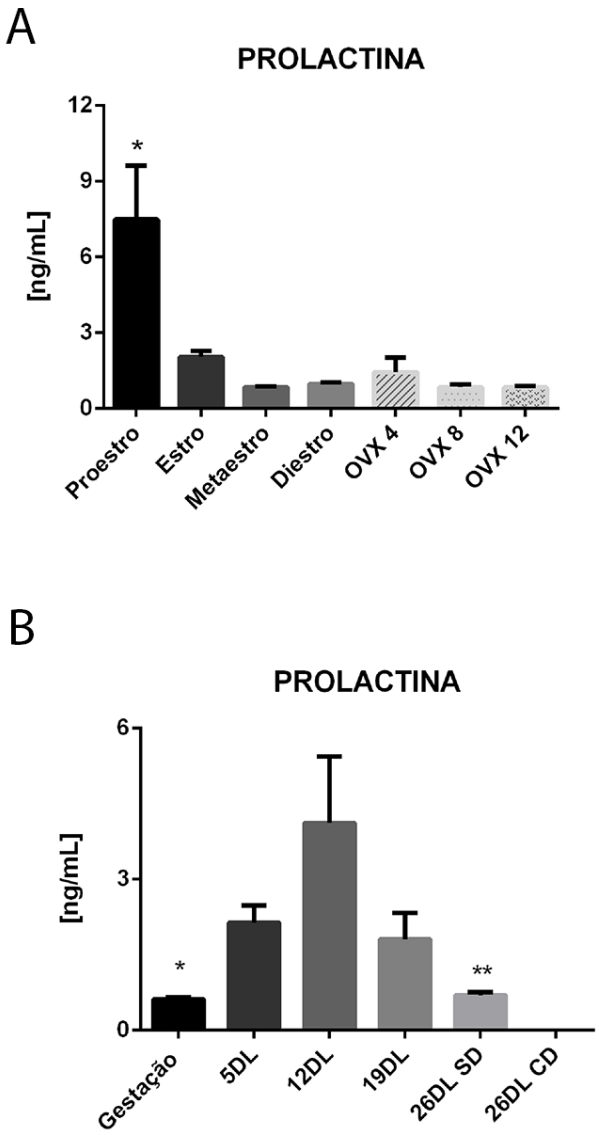

Figura 17 - Quantificação dos níveis circulantes de prolactina.
A) Em ratas nas fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro) e 4 dias (Ovx 4), 8 dias (Ovx 8) e 12 dias (Ovx 12) após a ovariectomia. Referência estatística em relação ao grupo metaestro. P< 0,05 (*). Barra: desvio padrão da média.
B) Em ratas durante a gestação e em diferentes momentos da lactação (5DL, 5º dia da lactação; 12DL, 12º dia da lactação; 19 DL, 19º dia da lactação; 26 DL, 26º dia da lactação) Referência estatística em relação ao grupo 12DL.P< 0,05

Os altos níveis de prolactina observados durante o proestro são provavelmente resultado da indução da hiperprolactinemia induzida pelo estrógeno, como também observado por Freeman (2000), sendo que esses valores começam a reduzir já na manhã no estro, permanecendo baixos até o próximo proestro. Este mesmo trabalho também observa que os níveis de prolactina se reduzem a partir do 10º dia de gestação, possivelmente devido a ação do *feedback* negativo dos lactogênicos placentários que agem no eixo hipotálamo-hipófise (Freeman et al., 2000). Nossos dados concordam com essas alterações, revelando baixos níveis de prolactina a partir do 10º dia da gestação. Os níveis de prolactina voltam a aumentar após o parto, durante a lactação. Segundo Gratan (2015) durante o fim da gravidez há uma diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos - a principal inibição da secreção de prolactina, associada a picos de secreção de prolactina imediatamente após o parto. Isso resulta em aumento dos níveis circulantes desse hormônio, necessário para a produção do leite, aumento esse também observado em nossos resultados.

A diferença observada nos grupos com desmame (26DL CD) e sem desmame (26DL SD) confirma o fato de que a sucção é o principal estímulo para liberação de prolactina pelos lactotrófos da hipófise anterior (Crowley, 2015). Logo, a retirada do estímulo é suficiente para reduzir os níveis circulantes desse hormônio, observado em nossa dosagem.

5.4.3 Hormônio concentrador de melanina

A quantificação sérica do MCH nos mostrou uma variação nos valores dos grupos do ciclo estral [Kruskal-Wallis: efeito da fase de coleta sobre o nível de MCH, $p < 0,05$]. O teste de múltiplas comparações de Dunn revelou uma redução significativa no metaestro [231,91 pg/ml] quando comparado ao proestro [4.845,22 pg/ml] [Figura 18].

Essa queda no metaestro parece coincidir com o primeiro pico de progesterona do ciclo estral, de origem luteal. Esse aumento na secreção de progesterona ocorre durante o meio dia do metaestro e mantém-se até a madrugada do diestro, retornando rapidamente aos níveis basais na manhã do diestro (Smith, Freeman, Neill, 1975). O inverso acontece em nossos dados: o MCH se reduz significantemente no metaestro, enquanto no diestro já retorna aos níveis observados nas demais fases do ciclo estral. Dessa forma, sugerimos

que possivelmente, a progesterona atue como um modulador, inibindo a liberação de MCH, fato inédito na literatura atual. Contudo, será preciso investigar com maior profundidade os efeitos que a progesterona desempenha sobre o MCH.

Vale ressaltar que o outro pico de progesterona observado no ciclo estral acontece na tarde no proestro, resultado da estimulação pelo LH. Nessa fase, nós não observamos a redução sérica do MCH como esperado pela inibição pela progesterona. Isso é possivelmente pelo padrão de coleta utilizado. Como dito, nossas coletas foram realizadas de forma padronizada às 13 horas, ou seja, no início do período da tarde. O aumento nos valores de progesterona observados no proestro, e possivelmente inibidor da liberação de MCH, começam a ocorrer a partir desse momento [isto é, as 13 horas].

Comparando os valores de MCH circulante de ratas no metaestro com ratas ovariectomizadas, observamos uma redução naquele grupo [metaestro: 231,91 pg/ml; OvX 4: 2.233,82 pg/ml; OvX 8: 2.035,8 pg/ml; OvX 12: 2.189,43 pg/ml], embora sem diferença estatística [Figura 18]. Sugerimos que a ovariectomia é capaz de reestabelecer parcialmente os valores de MCH circulantes encontrados nas demais fases do ciclo estral, possivelmente pela retirada do fator inibidor da liberação de MCH, isto é, a progesterona. Esses dados foram consistentes nos grupos com 4, 8 e 12 dias após a cirurgia de retirada do ovário, sugerindo que, sem a ciclicidade de produção de hormônios ovarianos, os níveis de MCH no soro tornam-se constantes.

Além disso, ao comparamos os valores obtidos em ratas nas fases do ciclo estral, por exemplo no diestro, e ratas ovariectomizadas, observamos uma redução nos valores nos grupos de ovariectomia, embora não estatisticamente significante [diestro: 3.642,43 pg/ml; OvX 4: 2.233,82 pg/ml; OvX 8: 2.035,8 pg/ml; OvX 12: 2.189,43 pg/ml] [Figura 19].

Nos parece que essa retirada dos ovários reduz a quantidade circulante de MCH e para isso observação sugerimos duas explicações. Os hormônios ovarianos podem modular em nível hipotalâmico ou hipofisário a liberação do MCH ali produzido, de forma que a retirada dos ovários, sem a reposição hormonal, foi capaz de alterar o padrão observado nos níveis de MCH. Por outro lado, o MCH produzido no ovário pode contribuir com os níveis circulantes desse peptídeo, e dessa forma, a retirada dessa glândula, um dos locais produtores de MCH, pode reduzir os seus valores séricos. Para elucidar melhor essa questão, futuros estudos com ratas hipofisectomizadas são de grande importância.

Uma outra consideração importante a ser feita é que a retirada do ovário não leva a remoção total do MCH sérico e por isso sugerimos que o MCH encontrado no plasma sanguíneo deva ter diferentes origens além ovário. Outros tecidos periféricos como coração, estômago e intestino, ou mesmo o hipotálamo são locais de produção e, portanto, podem ser diferentes fontes de contribuição com os seus níveis séricos.

Em relação aos grupos gestação e lactação, nós não observamos diferença estatística significante entre eles [Figura 19]. O estudo de Sun e colaboradores (2004) revelou que não há um aumento dos níveis séricos de MCH em ratas lactantes quando comparadas com ratas virgens, concordando com nossos resultados, onde não observamos diferença significativa nos valores, fazendo uma comparação entre o grupo diestro e os grupos de gestação e lactação [Figura 19].

Por outro lado, já se sabe que centralmente há novos locais de produção de MCH em ratas durante a lactação (Knollema et al., 1992; Rondini et al., 2010). Dessa forma, os níveis de MCH sérico não devem refletir à expressão de MCH central, proposta essa endossada por Naufahu e colaboradores (2017), em um estudo recente realizado em humanos, onde discutem que o MCH sérico não deve refletir à mesma função hipotalâmica.

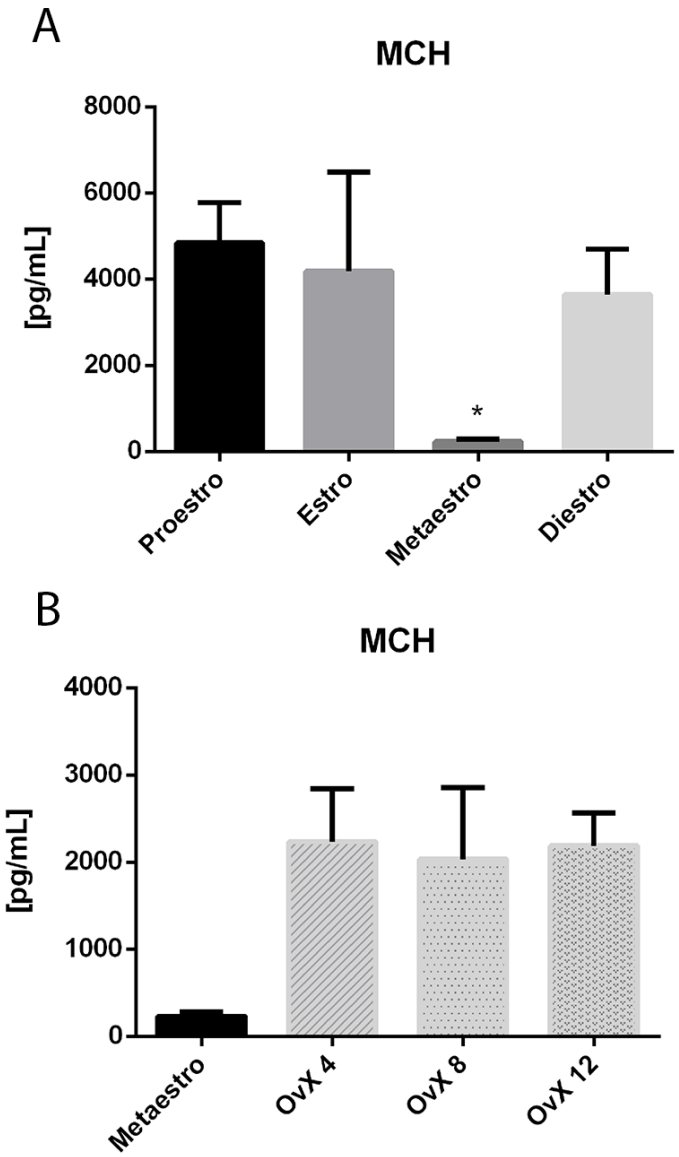

Figura 18 - Quantificação dos níveis circulantes de MCH.
A) Em ratas nas fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro). Referência estatística em relação ao grupo proestro. P< 0,05 (*). Barra: desvio padrão da média.
B) Em ratas na fase metaestro do ciclo estral e após 4 (OvX 4), 8 (OvX 8) ou 12 (OvX 12) dias de ovariectomia. Barra: desvio padrão da média.

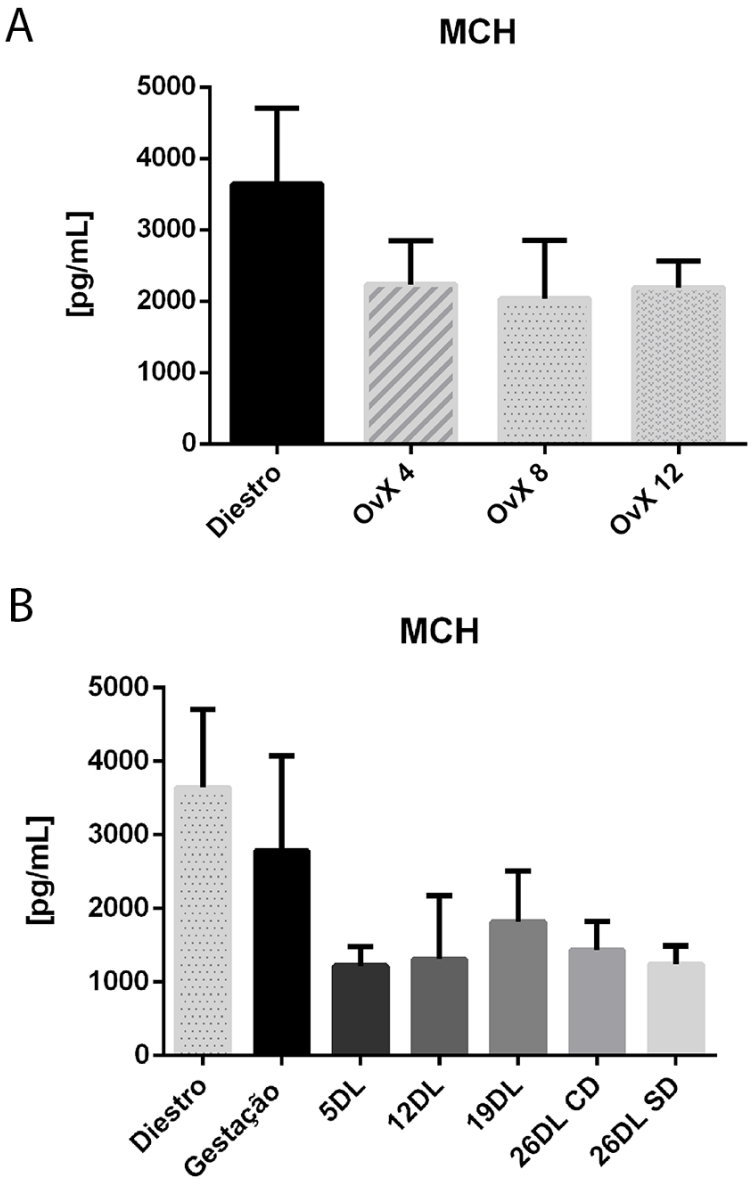

Figura 19 - Quantificação dos níveis circulantes de MCH.
A) Em ratas na fase diestro do ciclo estral e após 4 (OvX 4), 8 (OvX 8) ou 12 (OvX 12) dias de ovariectomia. Barra: desvio padrão da média.
B) Em ratas na fase diestro do ciclo estral, durante a gestação e em diferentes momentos da lactação (5DL, 5º dia da lactação; 12DL, 12º dia da lactação; 19 DL, 19º dia da lactação; 26 DL, 26º dia da lactação).

Em conjunto, os dados aqui apresentados nos levam à algumas considerações. Assim com o MCH, diversos outros neuropeptídeos são também produzidos em tecidos periféricos, bem como peptídeos produzidos perifericamente são também encontrados no SNC, o que faz com que essas moléculas sejam integradoras das funções biológicas no organismo (Waite, Geib, King, 2014).

Como exemplo, a ocitocina produzida nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo é secretada na hipófise posterior alcançando a circulação sanguínea (Crowley, 2015), dessa forma, atuando como neurohormônio. Porém, a ocitocina atua também como neurotransmissor (Buijs, 1983), além de ser produzida perifericamente na retina e timo, por exemplo (Gauquelin et al., 1983; Geenen et al., 1987).

Considerando a produção central do MCH, é possível afirmar que este atue como neuromodulador no controle da liberação de hormônios pré-ovulatórios (Gonzalez, Baker, Wilson, 1997; Murray et al., 2000a; Tsukamura et al., 2000; Smith, Grove, 2002; Murray et al., 2006). Porém, essa modulação se mostra complexa, com diversos estudos que se mostram inicialmente contraditórios, mas que, se analisados os sítios de administração de MCH bem como o perfil endócrino do modelo animal podem sugerir uma modulação do MCH sobre o LH e FSH (Naufahu, Cunliffe, Murray, 2013).

Williamson-Hughes e colaboradores (2005) demonstraram uma possível via neural direta pela qual o MCH pode desempenhar um papel importante na regulação da função neuronal do GnRH. Esse trabalho relata que fibras imunorreativas ao MCH se projetam para cerca de 85 a 90% dos neurônios GnRH nas áreas pré-optica medial e hipotalâmica anterior em rato, e cerca de 50 a 55% dos receptores MCHR1 são expressos em neurônios GnRH. Diversos outros trabalhos a partir de então relataram essa proximidade de fibras MCH com os neurônios produtores de GnRH (Murray et al., 2006; Ward et al., 2009; Wu et al., 2009).

Para além dessa ação em nível hipotalâmico, observamos também uma regulação em hipófise, de forma que experimentos *in vitro* demonstraram um aumento dos níveis do LH e do FSH após incubação de células da eminência mediana e hipófise anterior com MCH, condicionado a altas concentrações de estradiol (Chiocchio et al., 2001). Outra evidência a favor dessa hipótese veio da demonstração da grande aposição de fibras MCH com terminais imunorreativos ao GnRH na lâmina externa da eminência mediana (Williamson-Hughes, Grove, Smith, 2005). Fato interessante é que essas fibras MCH exibem uma variação cíclica em sua densidade imunorreativa, de forma que em

ratas no proestro e diestro foi observada densidade maior que nas demais fases do ciclo estral ou mesmo se comparado a machos. Esses resultados vão além e nos mostram que se analisarmos apenas o proestro, a densidade dessas fibras, bem como das fibras GnRH é maior ao meio dia, já diminuindo partir das 13 horas porém, não acompanhadas pela diminuição na densidade das fibras imunorreativas do GnRH (Gallardo, Chiocchio, Tramezzani, 2004).

Ao ser administrado na MPOA ou na eminência mediana, o MCH estimula a liberação de LH em ratas ovariectomizadas tratadas com reposição hormonal (Gonzalez, Baker, Wilson, 1997; Murray et al., 2000c; Murray et al., 2006). Porém, ao ser administrado no III ventrículo o MCH inibe a secreção de LH em ratas ovariectomizadas com reposição hormonal (Tsukamura et al., 2000). Além disso, outro contraponto é o estudo de Ward e colaboradores (2009), que mostra que o MCH deve inibir os neurônios produtores de GnRH.

É proposta também uma regulação do estradiol sobre o MCH (Mystkowski et al., 2000; Messina et al., 2006). Murray e colaboradores (2000b) sugerem que um dos mecanismos de regulação do precursor do MCH seja através do estrógeno na área incerto-hipotalâmica, região que contém uma sub população neuronal produtora de MCH, 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 diminuiu 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)

Neste presente trabalho nós identificamos a presença do MCH no ovário, um tecido periférico relacionado à função reprodutiva. Pouco se sabe sobre a ação periférica desse peptídeo, porém, consideramos este trabalho uma evidência inicial de uma possível contribuição do MCH no eixo HPG, especificamente quanto à modulação da função reprodutiva.

Além dos estudos prévios sugerindo uma modulação do estrógeno sobre o MCH, nossos dados sugerem que o MCH, no ovário, possa ter sua liberação inibida pela progesterona. Entretanto, diferente da liberação, a produção do MCH no ovário parece ter uma outra regulação, uma vez que não observamos variações nos níveis do seu RNAm e de seu peptídeo nesse tecido nos grupos analisados.

Além do mais, neste presente estudo nós investigamos a possível relação do MCH com a função reprodutiva. Dessa forma, o que observamos foi que os níveis circulantes de MCH sofrem variação durante o ciclo estral, mas não durante a gestação e lactação, informação esta inédita na literatura.

Já se sabe que durante o ciclo estral ratas apresentam uma redução protéica de MCH e de seu receptor durante o proestro no hipotálamo (Santollo, Eckel, 2013). Porém, um estudo em andamento do nosso grupo de pesquisa visa mapear e comparar a distribuição do MCH no hipotálamo de camundongos fêmeas ao longo das fases do ciclo estral, atentando-se para as suas diferentes populações hipotalâmicas. Dessa forma, poderemos relacionar com os níveis séricos e observar se segue o mesmo padrão dos estudos previamente citados, ou seja, de que os níveis circulantes de MCH não refletem seus valores de imunorreatividade hipotalâmica.

Por outro lado, observamos que a produção local de MCH no ovário deve contribuir, mas não de forma exclusiva, com os níveis desse peptídeo na circulação. Para ampliar essa investigação é necessário preencher algumas lacunas e dessa forma propomos estudos com ratas hipofisectomizadas por achar que estes serão úteis para elucidar se existe uma contribuição nos níveis séricos do MCH produzido no hipotálamo, secretados via hipófise posterior, e dessa forma, atuando com um neurohormônio.

A continuidade desses estudos propostos pode, assim, no futuro apontar o MCH como um peptídeo integrador de funções biológicas, importante para o estabelecimento de uma comunicação do SNC com tecidos periféricos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- Nós demonstramos a presença do MCH no ovário de ratas em todas as fases do ciclo estral, isto é, no proestro, estro, metaestro e diestro e observamos que os níveis desse peptídeo e do seu RNAm são constantes ao longo dessas fases.
- Nós também demonstramos a presença do MCH no ovário de ratas durante a gestação e em diferentes momentos da lactação, isto é, nos dias 5, 12 e 19 da lactação, bem como no 26º dia da lactação com ou sem desmame no 21º dia e observamos que os níveis desse peptídeo e do seu RNAm são constantes ao longo dessas fases.
- Nós medimos os níveis séricos de prolactina e progesterona para a confirmação das fases do ciclo reprodutivo analisadas. Quantificamos também os níveis séricos de MCH e observamos uma variação no ciclo estral, com valores significantemente menores no metaestro, mas não identificamos variação na gestação ou nos diferentes momentos da lactação.

7 REFERÊNCIAS*

Adams AC,Domouzoglou EM,Chee MJ,Segal-Lieberman G,Pissios P,Maratos-Flier E. Ablation of the hypothalamic neuropeptide melanin concentrating hormone is associated with behavioral abnormalities that reflect impaired olfactory integration. Behav Brain Res. 2011;224(1):195-200.

Akaishi T,Sakuma Y. Estrogen excites oxytocinergic, but not vasopressinergic cells in the paraventricular nucleus of female rat hypothalamus. Brain Res. 1985;335(2):302-5.

Araujo-Lopes R,Crampton JR,Aquino NS,Miranda RM,Kokay IC,Reis AM,Franci CR,Grattan DR,Szawka RE. Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. Endocrinology. 2014;155(3):1010-20.

Baker BI,Bird DJ,Buckingham JC. Salmonid melanin-concentrating hormone inhibits corticotrophin release. J Endocrinol. 1985;106(2):R5-8.

Ben-Jonathan N,Arbogast LA,Hyde JF. Neuroendocrine [corrected] regulation of prolactin release. Prog Neurobiol. 1989;33(5-6):399-447.

Bertolini A,Gessa GL. Behavioral effects of ACTH and MSH peptides. J Endocrinol Invest. 1981;4(2):241-51.

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

Bittencourt JC,Presse F,Arias C,Peto C,Vaughan J,Nahon JL,Vale W,Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J Comp Neurol. 1992;319(2):218-45.

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

Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. Front Neuroendocrinol. 2015;36:178-96.

Brown RS,Herbison AE,Grattan DR. Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. J Neuroendocrinol. 2014;26(12):898-908.

Brunton PJ,Russell JA. Attenuated hypothalamo-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge during pregnancy: the neurosteroid opioid connection. J Physiol. 2008;586(2):369-75.

Buijs RM. Vasopressin and oxytocin--their role in neurotransmission. Pharmacol Ther. 1983;22(1):127-41.

Butcher RL,Collins WE,Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology. 1974;94(6):1704-8.

Butcher RL,Collins WE,Fugo NW. Altered secretion of gonadotropins and steroids resulting from delayed ovulation in the rat. Endocrinology. 1975;96(3):576-86.

Caligioni CS,Franci CR. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. Life Sci. 2002;71(24):2821-31.

Chiocchio SR,Gallardo MG,Louzan P,Gutnisky V,Tramezzani JH. Melanin-concentrating hormone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropins in the female rat acting at both median eminence and pituitary levels. Biol Reprod. 2001;64(5):1466-72.

Cora MC,Kooistra L,Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. Toxicol Pathol. 2015;43(6):776-93.

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

Couzinet B,Schaison G. The control of gonadotrophin secretion by ovarian steroids. Hum Reprod. 1993;8 Suppl 2:97-101.

Crowley WR. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. Compr Physiol. 2015;5(1):255-91.

DeMaria JE,Livingstone JD,Freeman ME. Characterization of the dopaminergic input to the pituitary gland throughout the estrous cycle of the rat. Neuroendocrinology. 1998;67(6):377-83.

Donovan BT. The behavioural actions of the hypothalamic peptides: a review. Psychol Med. 1978;8(2):305-16.

Erskine MS. Prolactin release after mating and genitosensory stimulation in females. Endocr Rev. 1995;16(4):508-28.

Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. Fertil Steril. 1999;71(3):405-14.

Flier JS,Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. Cell. 1998;92(4):437-40.

Fox SR,Smith MS. The suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion during lactation in the rat. Endocrinology. 1984;115(6):2045-51.

Freeman ME,Kanyicska B,Lerant A,Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev. 2000;80(4):1523-631.

Fukushima A,Yin P,Ishida M,Sugiyama N,Arita J. Pup removal suppresses estrogen-induced surges of LH secretion and activation of GnRH neurons in lactating rats. J Endocrinol. 2006;191(1):339-48.

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

Gauquelin G,Geelen G,Louis F,Allevard AM,Meunier C,Cuisinaud G,Benjanet S,Seidah NG,Chretien M,Legros JJ,et al. Presence of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the retina of mammals, effect of light and darkness, comparison with the neuropeptide content of the neurohypophysis and the pineal gland. Peptides. 1983;4(4):509-15.

Geenen V,LEGROS JJ,FRANCHIMONT P,DEFRESNE MP,BONIVER J,IVELL R,RICHTER D. The Thymus as a Neuroendocrine Organ. Synthesis of Vasopressin and Oxytocin in Human Thymic Epithelium. Ann N Y Acad Sci. 1987;496(1):56-66.

Georgescu M,Sabongui C,Del Corpo A,Marsan L,Pfaus JG. Vaginocervical stimulation induces Fos in glutamate neurons in the ventromedial hypothalamus: attenuation by estrogen and progesterone. Horm Behav. 2009;56(4):450-6.

Georgiadis JR,Kringelbach ML,Pfaus JG. Sex for fun: a synthesis of human and animal neurobiology. Nat Rev Urol. 2012;9(9):486-98.

Giordano AL,Ahdieh HB,Mayer AD,Siegel HI,Rosenblatt JS. 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. Horm Behav. 1990;24(2):232-55.

Goldman JM,Murr AS,Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2007;80(2):84-97.

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

Goodman RL. The site of the positive feedback action of estradiol in the rat. Endocrinology. 1978;102(1):151-9.

Grattan DR. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. Prog Brain Res. 2001;133:153-71.

Grattan DR. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. J Endocrinol. 2015;226(2):T101-22.

Gray DS,Gorzalka BB. Adrenal steroid interactions in female sexual behavior : a review. Psychoneuroendocrinology. 1980;5(2):157-75.

Griffin GD,Flanagan-Cato LM. Ovarian hormone action in the hypothalamic ventromedial nucleus: remodelling to regulate reproduction. J Neuroendocrinol. 2011;23(6):465-71.

Grota LJ,Eik-Nes KB. Plasma progesterone concentrations during pregnancy and lactation in the rat. J Reprod Fertil. 1967;13(1):83-91.

Gudelsky GA. Tuberoinfundibular dopamine neurons and the regulation of prolactin secretion. Psychoneuroendocrinology. 1981;6(1):3-16.

Harris GW. Neural control of the pituitary gland. London,: E. Arnold; 1955. p. 298 p.

Herman JP,Figueiredo H,Mueller NK,Ulrich-Lai Y,Ostrander MM,Choi DC,Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol. 2003;24(3):151-80.

Hervieu G,Nahon JL. Pro-melanin concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptides expression in peripheral tissues of the rat. Neuroendocrinology. 1995;61(4):348-64.

Higuchi T,Tadokoro Y,Honda K,Negoro H. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. J Endocrinol. 1986;110(2):251-6.

Ichikawa S,Sawada T,Nakamura Y,Morioka H. Ovarian secretion of pregnane compounds during the estrous cycle and pregnancy in rats. Endocrinology. 1974;94(6):1615-20.

Jiang XH,Bukhari I,Zheng W,Yin S,Wang Z,Cooke HJ,Shi QH. Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. Asian J Androl. 2014;16(4):572-80.

Kawauchi H,Kawazoe I,Tsubokawa M,Kishida M,Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. Nature. 1983;305(5932):321-3.

Knollema S,Brown ER,Vale W,Sawchenko PE. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic Acid and Peptide expression in lactating rats. J Neuroendocrinol. 1992;4(6):709-17.

Lafuente A,Marco J,Esquifino AI. Pulsatile prolactin secretory patterns throughout the oestrous cycle in the rat. J Endocrinol. 1993;137(1):43-7.

Lee LR,Haisenleder DJ,Marshall JC,Smith MS. Effects of progesterone on pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion and LH subunit messenger ribonucleic acid during lactation in the rat. Endocrinology. 1989;124(5):2128-34.

Lehman MN,Coolen LM,Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology. 2010;151(8):3479-89.

Levine JE. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. Biol Reprod. 1997;56(2):293-302.

Liu X,Herbison AE. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. Endocrinology. 2013;154(1):340-50.

Long JA,Evans HM. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. Berkeley,: Univ. of California Press; 1922. p. 148.

Malik VS,Lillehoj EP. Antibody techniques. San Diego: Academic Press; 1994. p. xvi, 353 p.

Marcondes FK,Bianchi FJ,Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol. 2002;62(4A):609-14.

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

Miller FD,Ozimek G,Milner RJ,Bloom FE. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(7):2468-72.

Mizusawa K,Amiya N,Yamaguchi Y,Takabe S,Amano M,Breves JP,Fox BK,Grau EG,Hyodo S,Takahashi A. Identification of mRNAs coding for mammalian-type melanin-concentrating hormone and its receptors in the scalloped hammerhead shark Sphyrna lewini. Gen Comp Endocrinol. 2012;179(1):78-87.

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

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

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

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

Murray JF,Mercer JG,Adan RA,Datta JJ,Aldairy C,Moar KM,Baker BI,Stock MJ,Wilson CA. The effect of leptin on luteinizing hormone release is exerted in the zona incerta and mediated by melanin-concentrating hormone. J Neuroendocrinol. 2000c;12(11):1133-9.

Musatov S,Chen W,Pfaff DW,Kaplitt MG,Ogawa S. RNAi-mediated silencing of estrogen receptor {alpha} in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(27):10456-60.

Mystkowski P,Seeley RJ,Hahn TM,Baskin DG,Havel PJ,Matsumoto AM,Wilkinson CW,Peacock-Kinzig K,Blake KA,Schwartz MW. Hypothalamic melanin-concentrating hormone and estrogen-induced weight loss. J Neurosci. 2000;20(22):8637-42.

Nahon JL,Presse F,Bittencourt JC,Sawchenko PE,Vale W. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. Endocrinology. 1989;125(4):2056-65.

Nahon JL,Presse F,Breton C,Hervieu G,Schorpp M. Structure and regulation of the melanin-concentrating hormone gene. Ann N Y Acad Sci. 1993;680:111-29.

Naufahu J,Alzaid F,Fiuza Brito M,Doslikova B,Valencia TM,Cunliffe A,Murray JF. Melanin concentrating hormone in peripheral circulation in the human. J Endocrinol. 2017.

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

Negoro H,Visessuwan S,Holland RC. Unit activity in the paraventricular nucleus of female rats at different stages of the reproductive cycle and after ovariectomy, with or without oestrogen or progesterone treatment. J Endocrinol. 1973;59(3):545-58.

Numan M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. Behav Cogn Neurosci Rev. 2006;5(4):163-90.

Numan M,Roach JK,del Cerro MC,Guillamon A,Segovia S,Sheehan TP,Numan MJ. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. Brain Res. 1999;830(2):358-71.

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

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

Oomura Y,Aou S,Koyama Y,Fujita I,Yoshimatsu H. Central control of sexual behavior. Brain Res Bull. 1988;20(6):863-70.

Petrulis A. Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior. Front Neuroendocrinol. 2013;34(4):255-67.

Plant TM. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. J Endocrinol. 2015;226(2):T41-54.

Powers JB. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. Physiol Behav. 1970;5(8):831-5.

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

Reymond MJ,Porter JC. Involvement of hypothalamic dopamine in the regulation of prolactin secretion. Horm Res. 1985;22(3):142-52.

Rhodes CH,Morrell JI,Pfaff DW. Estrogen-concentrating neurophysin-containing hypothalamic magnocellular neurons in the vasopressin-deficient (Brattleboro) rat: a study combining steroid autoradiography and immunocytochemistry. J Neurosci. 1982;2(12):1718-24.

Rondini TA,Donato J, Jr.,Rodrigues Bde 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.

Russell JA,Douglas AJ,Ingram CD. Brain preparations for maternity- adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. Prog Brain Res. 2001;133:1-38.

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

Sar M,Stumpf WE. Simultaneous localization of [3H]estradiol and neurophysin I or arginine vasopressin in hypothalamic neurons demonstrated by a combined technique of dry-mount autoradiography and immunohistochemistry. Neurosci Lett. 1980;17(1-2):179-84.

Sarkar DK,Gibbs DM. Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats. Neuroendocrinology. 1984;39(5):481-3.

Schwartz NB,Talley WL. Daily measurement of pituitary LH content during pregnancy in the rat: do cyclic changes persist? J Reprod Fertil. 1968;15(1):39-45.

Shaikh AA. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. Biol Reprod. 1971;5(3):297-307.

Sherwood A,Wosiski-Kuhn M,Nguyen T,Holland PC,Lakaye B,Adamantidis A,Johnson AW. The role of melanin-concentrating hormone in conditioned reward learning. Eur J Neurosci. 2012;36(8):3126-33.

Smith MS. Hypothalamic-pituitary responsiveness during lactation in the rat: estrogen-induced luteinizing hormone surges. Endocrinology. 1978;102(1):121-7.

Smith MS,Freeman ME,Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. Endocrinology. 1975;96(1):219-26.

Smith MS,Grove KL. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. Front Neuroendocrinol. 2002;23(3):225-56.

Smith MS,Neill JD. Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. Biol Reprod. 1977;17(2):255-61.

Smith MS,True C,Grove KL. The neuroendocrine basis of lactation-induced suppression of GnRH: role of kisspeptin and leptin. Brain Res. 2010;1364:139-52.

Soaje M,de Di Nasso EG,Deis RP. Regulation by endogenous opioids of suckling-induced prolactin secretion in pregnant and lactating rats: role of ovarian steroids. J Endocrinol. 2002;172(2):255-61.

Soares MJ,Faria TN,Roby KF,Deb S. Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary, uterine, and placental expression. Endocr Rev. 1991;12(4):402-23.

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

Swanson L. The hypothalamus. In: Björklund AS, L.W., Hökfelt, T., editor. Handbook of chemical neuroanatomy.Elsevier 1987. p. 1-124.

Takahashi S,Okazaki K,Kawashima S. Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. Cell Tissue Res. 1984;235(3):497-502.

Tetel MJ,Getzinger MJ,Blaustein JD. Fos expression in the rat brain following vaginal-cervical stimulation by mating and manual probing. J Neuroendocrinol. 1993;5(4):397-404.

Thody AJ,Wilson CA,Everard D. alpha-Melanocyte stimulating hormone stimulates sexual behaviour in the female rat. Psychopharmacology (Berl). 1981;74(2):153-6.

Thong FS,Graham TE. Leptin and reproduction: is it a critical link between adipose tissue, nutrition, and reproduction? Can J Appl Physiol. 1999;24(4):317-36.

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

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

Tsunematsu T,Ueno T,Tabuchi S,Inutsuka A,Tanaka KF,Hasuwa H,Kilduff TS,Terao A,Yamanaka A. Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. J Neurosci. 2014;34(20):6896-909.

Valdez SR,Penissi AB,Deis RP,Jahn GA. Hormonal profile and reproductive performance in lactation deficient (OFA hr/hr) and normal (Sprague-Dawley) female rats. Reproduction. 2007;133(4):827-40.

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

Viale A,Kerdelhue B,Nahon JL. 17beta-estradiol regulation of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-E-I contents in cynomolgus monkeys: a preliminary study. Peptides. 1999;20(5):553-9.

Voogt JL,Lee Y,Yang S,Arbogast L. Regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation. Prog Brain Res. 2001;133:173-85.

Waite GN,Geib RW,King MW. Neuropeptides as biologial system integrators mini review. Biomed Sci Instrum. 2014;50:1-11.

Ward DR,Dear FM,Ward IA,Anderson SI,Spergel DJ,Smith PA,Ebling FJ. Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse. PLoS One. 2009;4(4):e5322.

Wheeler DS,Wan S,Miller A,Angeli N,Adileh B,Hu W,Holland PC. Role of lateral hypothalamus in two aspects of attention in associative learning. Eur J Neurosci. 2014;40(2):2359-77.

Williamson-Hughes PS,Grove KL,Smith MS. Melanin concentrating hormone (MCH): a novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. Brain Res. 2005;1041(2):117-24.

Wu M,Dumalska I,Morozova E,van den Pol A,Alreja M. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(40):17217-22.

Yamaguchi K,Akaishi T,Negoro H. Effect of estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats. Endocrinol Jpn. 1979;26(2):197-205.

Yeo SH,Herbison AE. Estrogen-negative feedback and estrous cyclicity are critically dependent upon estrogen receptor-alpha expression in the arcuate nucleus of adult female mice. Endocrinology. 2014;155(8):2986-95.

Yoshinaga K,Hawkins RA,Stocker JF. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. Endocrinology. 1969;85(1):103-12.

ANEXOS

ANEXOS

Lista de atividades realizadas durante o período do mestrado

- Conclusão das disciplinas para a aquisição de créditos (36 créditos concluídos dos 32 necessários para a defesa da dissertação);
- "**The 11th International Interim Conference on Plastination**" - 13 a 16 de julho de 2015, Vitória, ES: participação na comissão organizadora.
- Simpósio "**Neural mechanisms of regulation of behavior and memory: recent advances and future perspectives**": - 6 e 7 de julho de 2015, São Bernardo do Campo, SP: participação no evento
- "**VI Simpósio da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais**" - 16 e 17 de setembro de 2015 na Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
    - Avaliação de pôsteres de iniciação científica.
    - Participação no evento.
- **VIII Jornada de Anatomia da USP –** 11 a 22 de Janeiro de 2016, São Paulo
    - Ministrando aula teórica e prática com o tema: "**Vascularização e inervação dos músculos no membro superior**"
    - Monitoria nas seguintes aulas práticas: "**Músculos do ombro e braço**" e "**Ossos e articulação do esqueleto axial**".
- **Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE)**,
    - Participação no primeiro semestre de 2016, atuando como monitora bolsista na disciplina Anatomia Humana (BMA 126) para o curso de Farmácia da Universidade de São Paulo.
    - Participação no segundo semestre de 2016, atuando como monitora voluntária na disciplina Anatomia Humana (BMA 0311) para os cursos de Fonoaudiologia, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade de São Paulo, onde pude ministrar a aula teórica "**Sistema Neurovegetativo**"

- **VII Simpósio do programa de pós graduação em Ciências Morfofuncionais**, - 04 e 05 de outubro, no Instituto de Ciências Biomédicas III.
    - Organização do evento
    - **Prêmio de melhor trabalho de mestrado** (1° lugar) do VII Simpósio da Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais, no dia 5 de outubro de 2016.
- **IX Jornada de Anatomia da USP -** 9 a 20 de janeiro de 2017.
    - Participação da comissão organizadora: Membro da Comissão de Organização e Coordenadora da Comissão de Seleção.
    - Ministrando aula teórica a prática com o tema: "**Córtex cerebral**"
    - Monitora na aula prática: "**Cerebelo**".
- **XXVII Congresso Brasileiro de Anatomia**- 20 a 23 de julho de 2016, Natal RN.
    - Participação no evento
    - **Prêmio Irvênia Prada**: "Melhor trabalho de anatomia animal do XXVII Congresso Brasileiro de Anatomia", no dia 23 de julho de 2016.
    - Curadoria e coordenação da exposição "**O admirável corpo humano**", ocorrida em paralelo ao evento.
- Participação no trabalho "**Increased litter size enhances the number of melanin-concentrating hormone neurons in the medial preoptic area of lactating dams**" apresentado no II Falan Congress (Federation of Neuroscience Societies in Latin America and the Caribbean) – 17 a 20 de outubro de 2016, Buenos Aires, Argentina.
- Conclusão do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB
- Conclusão do Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos"
- Conclusão do Curso "Uso de Animais em Experimentação"