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

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.

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].

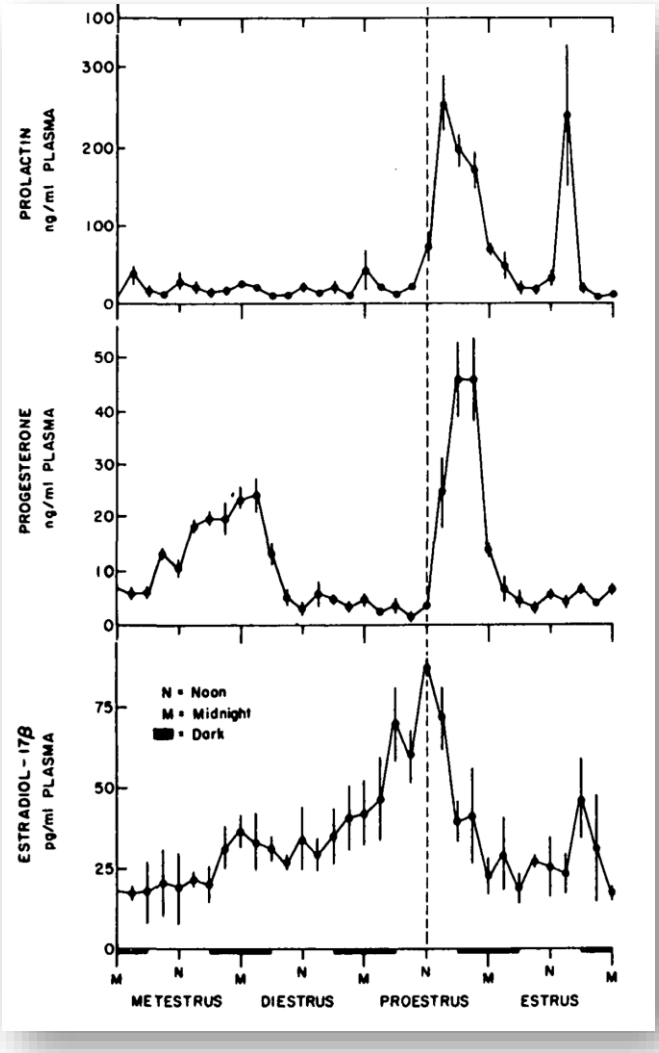

Figura 1 - Demonstração gráfica dos níveis plasmáticos de prolactina, progesterona e estradiol-17β durante as fases do ciclo estral de rata, para fins de ilustração do ítem 1.2.1.1. Valores de prolactina e progesterona em ng/ml e estradiol-17β em pg/ml. Extraído de (Butcher, Collins, Fugo, 1974).

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).

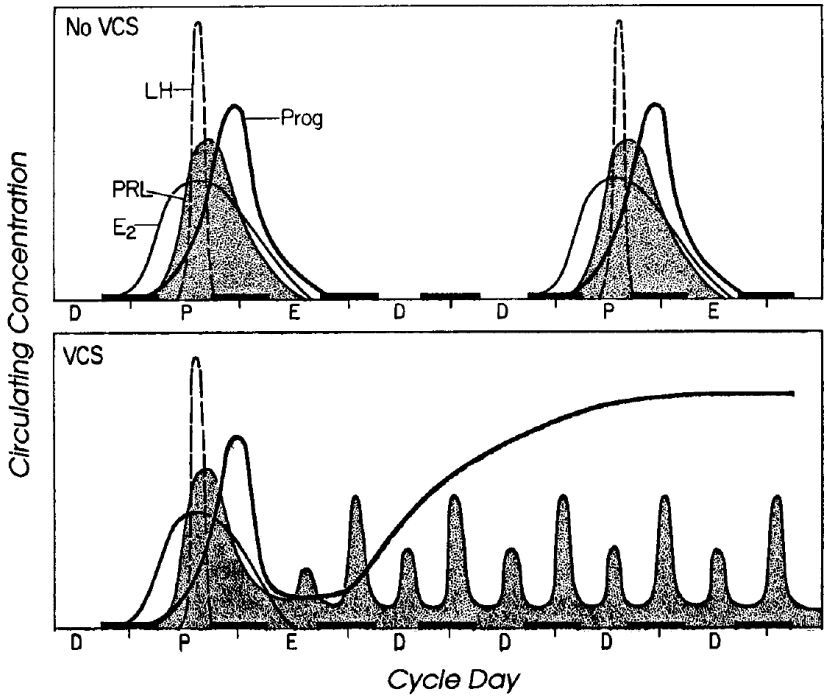

Figura 2 - Demonstração gráfica do efeito da estimulação da porção cervical da vagina (VCS) sobre a secreção de LH, Prolactina, Estradiol e Progesterona, para fins de ilustração do item 1.2.2. Legenda: No VCS: padrão hormonal apresentado durante o ciclo estral de ratas sem acasalamento. VCS: padrão hormonal 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).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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,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.

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,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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.