



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO

IMUNOLOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE LEPTINA NO OVÁRIO DE
PREÁS (*Galea spixii* Wagler, 1831)

MOSSORÓ/RN

2017

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE LEPTINA NO OVÁRIO DE
PREÁS (*Galea spixii* Wagler, 1831)**

Dissertação apresentada ao mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-Árido,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Linha de pesquisa: Morfofisiologia Animal

Orientador: Profa. Dra. Valéria Veras de
Paula

Co-orientador: Prof. Dr. Genilson Fernandes
de Queiroz

MOSSORÓ- RN

2017

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do autor, sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu respectivo autor sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B141i Barbalho de Macêdo, Luã.
IMUNOLOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE LEPTINA NO
OVÁRIO DE PREÃS (*Galea spixii* Wagler, 1831) /
Luã Barbalho de Macêdo. - 2017.
39 f. : il.

Orientadora: Valéria Veras de Paula.
Coorientador: Genilson Fernandes de Queiroz.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2017.

1. adipocitocinas. 2. folículos ovarianos. 3.
corpo lúteo. 4. reprodução de roedores. I. Veras
de Paula, Valéria, orient. II. Fernandes de
Queiroz, Genilson, co-orient. III. Título.

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE LEPTINA NO OVÁRIO DE
PREÁS (*Galea spixii* Wagler, 1831)**

Dissertação apresentada ao mestrado
em Ciência Animal do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia
Animal

Defendida em: 16 / 02 / 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dra. Valéria Veras de Paula, (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Genilson Fernandes de Queiroz (UFERSA)
Membro Examinador Interno



Prof^ª. Dra. Paula de Carvalho Papa (USP)
Membro Examinador Externo

Agradecimentos

Aos meus pais, Teresa Cristina Barbalho de Macêdo e Antônio Willame Cabral de Macêdo, que sempre foram um exemplo de superação, nunca deixaram de me apoiar e sempre me deram tudo que precisei para que eu crescesse na vida. Pelo amor incondicional, pelas críticas e pelos elogios no tempo certo. Ensinarão-me que mesmo que os obstáculos sejam intransponíveis, com trabalho e dedicação é possível transpassá-los. Palavras não podem expressar o sentimento que tenho por eles.

As “cabritas”, Capitu e Cristal (*in memorian*), a Dora e a Toquinho, agradeço por me fazer uma pessoa melhor, ter responsabilidade, enxergar a vida com outros olhos, ensinando o que realmente é lealdade. Acima de tudo, me mostraram que na vida a gente não precisa de fama e fortuna e sim de um cobertor para aquecer, uma bola para perseguir, um prato de ração, uma tigela de água para suprir as necessidades e um pouquinho de molecagem para nos sentirmos vivos e sermos realizados.

Aos meus parentes, tia Kaká Barbalho, tio Cláudio Fontoura, as minhas primas Tahyará Barbalho e Tahyná Barbalho, ao meu avô Gilberto Barbalho, vovó Maria das Neves (*in memorian*), aos meus irmãos Rhudá Barbalho e Jivago Barbalho (e suas esposas Raquel Marques e Raquel Campos respectivamente) e demais familiares, por me incentivarem direta ou indiretamente, mesmo eu tendo abdicado, muitas vezes, de sua companhia.

A Rosely Barbosa, que é para mim uma segunda mãe. Cuidou de mim, me educou, nunca deixou de me incentivar. Exemplo de superação. Mostrou que nunca é tarde para se realizar um sonho, mesmo que para isso tenhamos que sacrificar muitas coisas. Ensinarão-me a abrir mão do que gostamos para conquistar aquilo que amamos

A Muriel Pimentel, minha companheira, de tantas alegrias e de tantas tristezas. Foi parceira nos momentos em que mais precisei e soube me motivar quando desistir parecia ser a melhor opção. Mesmo distante é fonte de orgulho, perseguiu seus sonhos e agora esta usufruindo deles.

A minha orientadora professora doutora Valéria Veras de Paula gostaria de agradecer pelos ensinamentos para sala de aula, pesquisa e para a vida e pela confiança depositada em minha pessoa. Gostaria de agradecer também a oportunidade de cursar a pós-graduação.

Aos meus mentores professor doutor Genílson Fernandes de Queiroz e professor doutor Carlos Eduardo Bezerra de Moura pelo acolhimento, amizade, ensinamentos, compreensões, motivações, entre tantas coisas boas. Muito obrigado pela convivência, orientação e crença em minhas capacidades, que juntamente com a ideia de vocês, proporcionaram esta pequena contribuição à Ciência.

Isabelly Dias, a estagiária, que me ajudou com caronas e nas coletas, me fez companhia nos processamentos e análises dos dados.

Ao Professor Leandro Pires que mesmo sem nos conhecer, se prontificou em me ajudar nas pesquisas, fornecendo material e se prontificando em me ensinar as técnicas imunológicas, além do incentivo e da paciência em nossas conversas. Muito obrigado!

A equipe do Laboratório de Morfofisiologia Animal composto pelo Professor doutor Moacir Franco de Oliveira e seus estagiários Ferdinando Vinicius, Hélio Noberto, Igor Renno, André Vinicius, Felipe Venceslau por todo apoio nas coletas, incentivo nas tentativas frustradas e pelas tardes conversando besteiras para o processamento das amostras acabarem mais rápido.

Ao Professor Marlon Feijó e a sua equipe pela disponibilidade em me ajudar com o ELISA.

Ao pessoal de apoio do CEMAS “Cuscuz”, Almeida e Francisco se dispuseram em me ajudar na contenção dos animais e pelas manhãs agradáveis que passei em suas companhias.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

Se você for tentar, vá até o fim.

Senão, nem comece.

Vá Até o fim!

Isso pode significar perder amores, amigos,
empregos e talvez até a cabeça.

Vá até o fim.

Isso pode significar três ou quatro dias sem comer.
Isso pode significar congelar no banco de um parque.

Isso pode significar deboche, rejeição. Solidão.

Solidão? Pense nela como um presente.

E em todo o resto como um teste à sua persistência.

O tamanho da sua vontade de chegar lá.

Você vai chegar.

E vai ser melhor que qualquer coisa que você
possa imaginar.

(Charles Bukowski)

RESUMO

A leptina, uma citocina produzida pelas células adiposas, possui ação na reprodução dos animais promovendo a puberdade, foliculogênese e oogênese, ciclo estral e auxiliando na fecundação. A compreensão dos mecanismos que controlam a atividade reprodutiva de preás (*Galea spixii*) possui papel relevante para a preservação da espécie. Desta forma, o presente trabalho propôs analisar a imunolocalização dos receptores de leptina (Ob-R) no ovário de preás. Coletaram-se os ovários de 20 fêmeas adultas, não prenhes e saudáveis. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, incluídas em parafina e seccionadas para a realização de imunohistoquímica. As secções foram fotomicrografadas e avaliadas quanto à intensidade da reação. Observou-se forte imunorreação no oócito e nas células da teca, moderada nas células do estroma ovariano e nas células luteínicas grandes e fracamente coradas nas células da granulosa, endoteliais, perivasculares e células luteínicas pequenas. Quando comparado a expressão de receptores ao longo do desenvolvimento folicular foi observado que o oócito e as células da teca se mantiveram com expressão na mesma intensidade. Entretanto, as células da granulosa apresentaram forte marcação nos estádios pré-antrais enquanto que nos folículos antrais apresentou fraca intensidade. Concluímos que em ovários de *Galea spixii* existe a presença de Ob-R nas principais estruturas do ovário sugerindo que este hormônio desempenhe papel fundamental na reprodução desta espécie.

Palavras-chaves: adipocitocinas, folículos ovarianos, corpo lúteo, reprodução de roedores.

ABSTRACT

Leptin, a cytokine produced by adipose cells, is the target of the scientific community for believing that it has an impact on the reproduction of the animals promoting puberty, folliculogenesis and oogenesis, estrous cycle and aiding in fertilization. The understanding of the mechanisms controlling the reproductive activity of Spix's Yellow-toothed Cavy (*Galea spixii*) plays a relevant role in the preservation of the species. Thus, the present work proposed to analyze the immunolocalization of leptin receptors (Ob-R) in the ovary of cavy. Ovaries from 20 adult, non-pregnant, healthy females were collected. The samples were fixed in 4% phosphate buffered paraformaldehyde, embedded in paraffin and sectioned for immunohistochemistry. The sections were photomicrographs and intensity of the reaction was measured. Strong immunoreaction was observed in oocyte and theca cells, moderate in ovarian stromal cells and large luteal cells and weak stained in granulosa, endothelial, perivascular and small luteal cells. When compared to receptor expression along follicular development it was observed that the oocyte and the theca cells remained with expression at the same intensity. However, the granulosa cells presented strong stained in the preantral stages, whereas in the antral follicles it presented low intensity. We conclude that in the ovaries of *Galea spixii* there is the presence of Ob-R in the main structures of the ovary suggesting that this hormone plays a fundamental role in the reproduction of this species

Keywords: adipocytokines, ovarian follicles, corpus luteum, rodent reproduction.

Lista de Figuras

Figura 1: Preá (<i>Galea spixii</i>) no recinto do CEMAS. Acervo pessoal	21
Figura 2: Exposição do ovário após abertura da cavidade abdominal para coleta dos ovários em preá. Acervo pessoal	22
Figura 3: Imunolocalização de receptores de leptina em ovário (A, B, C, D, F) e tecido adiposo (E) de preá. A- Corpo lúteo apresentando reação positiva; B – CL positivo. Células luteínicas grandes (seta cheia) e células pequenas (seta vazia) positivas; C – Tecido ovariano positivo, oócito (seta vazia) e células do estroma (seta cheia); D – Folículo terciário positivo, células da granulosa fracamente coradas (seta cheia) e células da teca intensamente coradas (seta vazia); E- Tecido adiposo apresentando imunomarcacão para receptores de leptina; F- Tecido ovariano apresentando marcação positiva, endotélio e células perivasculares positivas (seta cheia). As imagens A', C' e E' são imagens do controle negativo.	25
Figura 4: Folículos ovarianos de <i>Galea spixii</i> em diversos estádios de desenvolvimento. A- Oócito em folículo primordial exibindo intensa coloração (seta vazia), oócito com intensa marcação em folículo primário (seta cheia); B –Oócito com marcação intensa em folículo secundário (seta vazia) e células da teca também fortemente coradas (seta cheia); C- Células da teca e oócito fortemente marcados em folículo antral (seta vazia).	27
Figura 5: Células da granulosa com diversas intensidades de marcação. A – Folículo secundário apresentando oócito e células da granulosa fortemente marcadas (seta cheia); B – Folículo antral apresentando células da granulosa com marcação fraca (seta vazia).	28

Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantificação da imunohistoquímica para Ob-R em ovário de preás (<i>Galea spixii</i>).	26
--	----

Lista de Siglas

°GL – Gay Lussac

3β-HSD – 3 beta Hidroxiesteroide Desidrogenase

CEMAS – Centro de Multiplicação de Animais Silvestres

CL – Corpo Lúteo

DAB – Diaminobenzidina

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

IGF-I – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina I

IHC - Imunohistoquímica

JAK – Janus Quinase

LH – Hormônio Luteinizante

MAPK – Proteína-quinase ativada por mitógenos

MAS - Esterol ativador de meiose

Ob – Leptina

Ob/Ob – Ratos transgênicos com mutação no gene que codifica a leptina

Ob-R – Receptor de Leptina

PBS – Tampão fosfato salino

P450SCC – Citocromo p450 para Clivagem da Cadeia Lateral

RNA – Ácido Ribonucleico

RTPCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real

STAR – Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese

STAT – Sinal de Tradução e Ativação de Transcrição

UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi-Árido

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1) INTRODUÇÃO	14
2) REVISÃO DE LITERATURA	15
I. Leptina	15
II. Leptina na reprodução	17
III. A influência da leptina no ovário.....	18
IV. Receptores de leptina no ovário.....	19
3) OBJETIVOS.....	20
I. OBJETIVO GERAL	20
II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4) METODOLOGIA	21
I. Seleção dos animais	21
II. Coleta das amostras	21
III. Processamento histológico das amostras	22
IV. Imunohistoquímica para receptores de leptina	22
V. Quantificando a imunorreação.....	24
VI. Análise estatística	24
5) RESULTADOS.....	24
6) DISCUSSÃO.....	28
7) CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9) ANEXO.....	38
ANEXO I	38
ANEXO II.....	39

1) INTRODUÇÃO

O tecido adiposo, constituído pelos adipócitos, secreta e sintetiza adipocitocinas, que são capazes de atuar de forma autócrina, parácrina ou endócrina. Uma das adipocitocinas mais importantes é a leptina, hormônio peptídeo, composto por 167 aminoácidos, produzido a partir do gene da obesidade e conhecida por regular o apetite e o gasto energético (AHRENS et al., 2013; CATLI et al., 2014). A sua descoberta teve grande influência na compreensão de como o tecido adiposo se comunica com outros órgãos do corpo, em especial com as glândulas endócrinas (CHAN et al., 2003) e o sistema digestório (BADO et al., 1998).

A leptina é um componente integral do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo através da ligação com receptores específicos (TAHERI e PARHAM, 2016), informando o estado nutricional do organismo para outros sistemas fisiológicos (DISKIN et al., 2003; ZHANG et al., 2015). Além disso, este hormônio está associado à regulação da puberdade (AHIMA et al., 1997), da reprodução, atuando no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, influenciando a esteroidogênese, folículo-gênese e oogênese (OGASAWARA et al., 2008; BATISTA et al., 2013; TAHERI e PARHAM et al., 2016), a função placentária (DALL'AGLIO et al., 2012) e o desenvolvimento embrionário (CRAIG et al., 2005).

A ação fisiológica da leptina é mediada por receptores produzidos pelo gene relacionado à diabetes, pertencentes à superfamília das citocinas de classe I, os quais possuem domínios intracelulares, extracelulares e transmembrânicos (BATISTA et al., 2013). Até o momento, foram relatadas seis variações de receptores sendo Ob-Ra, c, d e f considerados receptores curtos, o Ob-Re é solúvel e o Ob-Rb, o mais predominante, é um receptor longo. Eles atuam por meio de tradutores do sinal janus-quinase e de ativadores de transcrição (JAK-STAT) e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (RESHMAN et al. 2016; TAHERI e PARHAM, 2016).

A expressão da leptina e do Ob-Rb no ovário já foi relatada em diversas espécies animais como mamíferos (ALBRIZIO et al., 2013; BATISTA et al., 2013), entres eles, alguns roedores, como em ratos (RYAN et al., 2002; RYAN et al., 2003) e camundongos (DUPUIS et al., 2014); bem como em aves (ADACHI et al., 2008) e

peixes (ESCOBAR et al., 2016). Porém até o presente momento não há estudos deste hormônio como também de seus receptores em preás (*Galea spixii*).

Os preás são animais que se adaptam bem ao cativeiro e ao clima semiárido, e podem ser criados em larga escala pelos pequenos produtores rurais, sendo fonte alternativa de carne de baixo custo e de elevado valor nutritivo como também um bom dispersor de sementes (BARBOZA et al., 2016). Em função disto, justifica-se a utilização desses animais na pesquisa com o intuito de aprofundar os conhecimentos dos mecanismos que controlam sua atividade reprodutiva.

A compreensão dos mecanismos que controlam a atividade reprodutiva de preás possui papel relevante para a preservação da espécie, desenvolvimento de técnicas para aumentar a eficiência produtiva e descoberta de fármacos como forma de prevenção ou tratamento de afecções do sistema reprodutor. Portanto, o presente trabalho visou analisar os receptores de leptina nos ovários de preá (*Galea spixii*), com o intuito de, no futuro, detalhar sua importância sobre a reprodução dessa espécie.

2) REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão a seguir estão apresentadas as informações obtidas na literatura referentes à leptina, sua composição química, seu papel no organismo, local onde é produzido e forma de secreção, mecanismo de ação, seus receptores e as formas como ele interagem com a leptina. Em seguida será brevemente explanado sobre o papel da leptina na reprodução como também pesquisas as quais evidenciaram a influência da leptina e a localização dos receptores de leptina no ovário em diferentes espécies

I. Leptina

A leptina é um hormônio peptídico constituído por 167 aminoácidos e transcrito pelo gene da obesidade (Ob) e amplamente conhecido por regular o apetite e o gasto energético (AHRENS et al., 2013). Porém já foi relatada a possibilidade de influenciar em processos de angiogênese (WILES et al., 2014), osteogênese (ZHOU et al., 2014), regulação do sistema imune, inflamatório e hematopoiético (FATUZZI e FAGGIONI, 2000) na digestão e absorção (YARANDI et al., 2011) e na reprodução (CAVALCANTE; AICELES RAMOS, 2013).

Este peptídeo é secretado pelo tecido adiposo, principalmente aquele do tipo branco, no entanto há relatos de sua produção em outros tecidos como: placenta (DALL'AGLIO, 2012) e ovários (TRISOLINI et al., 2013) de felinos, útero de ratos (ARCHANCO et al., 2007), glândula mamária de bovinos (LEW; OLIVEIRA; CARVALHO, 2012), hipotálamo de ovelhas (IQBAL et al., 2000).

Este hormônio é secretado de forma pulsátil demonstrando um ritmo circadiano, com baixos níveis no meio da tarde e níveis elevados no meio da noite (LICINIO et al., 1997). O ritmo diário de secreção pode sofrer influência do sexo: sendo verificadas concentrações mais elevadas deste hormônio em mulheres do que em homens (SUMNER et al., 1998) e foi observado, também, que os níveis de leptina em mulheres após a menopausa caem drasticamente, sugerindo influência dos hormônios esteroides (PARK e AHIMA, 2015).

Atuação da leptina ocorre por meio da ligação com receptores específicos de membrana (LEW; OLIVEIRA; CARVALHO, 2012; MERCATI et al., 2014). O Receptor de leptina (Ob-R) é um membro da classe I da superfamília dos receptores de citocinas, produzido pelo gene da diabetes no qual é transcrito e clivado em seis isoformas diferentes: o receptor longo (Ob-Rb) que é a forma de sinalização mais predominante (CAVALCANTE; AICELES RAMOS, 2013), os receptores curtos (Ob-Ra, c, d e f) e o receptor solúvel (Ob-Re) (KUMAR et al., 2012; LANDRY; CLOUTIR; MARTIN, 2013; TAHERI e PARHAM, 2016).

Os receptores de leptina apresentam ações específicas: Ob-Rb possui domínios intracelulares que sinalizam a partir da via JAK-STAT, sendo responsável pela maioria dos efeitos biológicos da leptina como o controle energético por ativação dessa via no hipotálamo e proliferação de células mononucleares sanguíneas (PROCACCINI et al., 2009). Há também relatos de que a interação entre o hormônio e seu receptor promove a ativação da via da proteína quinase ativada por mitogénos e essa promove a maturação dos oócitos principalmente em vertebrados (CRAIG et al., 2004).

Este receptor pode ser encontrado nas células da granulosa, células da teca e células do *cumulus* e oócitos de folículos antrais (BATISTA et al., 2013), OB-Ra e OB-Rc são expressos em plexo coróide e microvasos, e são responsáveis pela captação de leptina ou efluxo do líquido cefalorraquidiano, bem como no transporte mediado por receptor de leptina através da barreira hematoencefálica (FRUHBECK, 2006), OB-Re atua como um sistema de tamponamento para a leptina de circulação livre, podendo codificar o receptor solúvel, todavia, necessita do domínio intracelular e

transmembrânicos (LEE et al., 1996), OB-Rd age na remoção da leptina da circulação (CEDDIA et al., 1998), OB-Rf é principalmente encontrado em tecidos envolvidos com o sistema imunológico, porém sua função não está bem elucidada (MANN et al., 2003).

II. Leptina na reprodução

A leptina tem sido creditada importância tanto na homeostase energética quanto na reprodução (HU et al., 2014). A evidência direta de que a leptina estava envolvida na reprodução foi obtida através de estudos com camundongos obesos (Ob/Ob) que são deficientes nesse hormônio e eram inférteis, porém após administração de doses de leptina, adquiriram a capacidade de reproduzir (CHEHAB; LIM; LU, 1996).

Foi relatado que o bloqueio de leptina em ratos neonatos causava um retardo no início da puberdade e modificações na expressão de neuropeptídeos na idade adulta (MELA et al., 2017). Ahima et al., (1996) demonstram que injeções de leptina em camundongos fêmeas jovens faziam com que esses animais alcançassem a puberdade cada vez mais precocemente sem alterar o peso corporal, sugerindo que a leptina atue regulando o sistema neuroendócrino e consequentemente a função reprodutiva. Associado a isso, demonstrou-se que em cultura de células de hipófise de ratos suplementadas com doses de leptina ocorria aumento da secreção de LH e FSH e a administração de soro anti-leptina promovia o decréscimo na pulsação de LH (OGURA et al., 2001).

Roedores e humanos com deficiência genética de leptina apresentam amenorreia hipotalâmica que é revertida após reposição exógena de leptina (CHOU et al., 2011). A deficiência de leptina devido à restrição alimentar em roedores também inibe o eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, e da mesma forma, a reposição do hormônio promove a pulsação de LH e o retorno do ciclo estral (LESHAN; PFAFF, 2014).

Estudos desenvolvidos por Maguire et al., (2012) demonstraram que mulheres acometidas lipodistrofia congênita, e consequentemente deficiência de leptina, que eram suplementadas com leptina recombinante conseguiram reestabelecer seu ciclo menstrual regular como também sua fertilidade. Já Khosropour et al., (2016) identificaram alterações no gene da leptina e de seu receptor estão envolvidas com infertilidade e diminuição na contagem de espermatozoides em homens.

III. A influência da leptina no ovário

A grande distribuição de leptina e seu receptor no ovário de camundongos (RYAN et al., 2003), coelhos (ZERANI et al., 2004) suínos (SMOLINSKA et al., 2012), bovinos (SARKAR et al., 2010), gatas (ALBRIZIO et al., 2013), cabras (BATISTA et al., 2013) e búfalas (RESHMA et al., 2016) sugere a importância deste hormônio no controle de vários aspectos da reprodução (DALL'AGLIO et al., 2012). Sua influência na reprodução é contraditória, pois alguns trabalhos relatam que a suplementação do hormônio causa efeito inibitório na função ovariana, outros citam estimulação na atividade ovariana (SIAWRY; SMOLINSKA, 2012; TRISOLINI et al., 2013; RESHMAN et al., 2016).

Em relação aos efeitos diretos da leptina no ovário, há relatos de inibição do crescimento folicular em ratos (KIKUCHI et al., 2001), porém em bubalinos foi verificado que esse crescimento foi estimulado através dos efeitos desse hormônio (RESHMA et al., 2016). Segundo Joo et al. (2010), ratos e coelhos tratados com leptina apresentavam aumento de ovulações e que a deficiência de leptina em ratos estava associada a supressão da foliculogênese e o aumento de apoptose nas células da granulosa.

O mecanismo de ação da leptina no ovário, é explicado de várias maneiras, uma delas é sua ação direta sobre a atividade secretora do ovário, outra é atuando sobre a angiogênese e também na apoptose folicular (HU et al., 2014; RESHMA et al., 2016). Este hormônio também atua de forma indireta como ativador do sistema neuroendócrino, exercendo os seus efeitos sobre no eixo hipotálamo-hipofisário gonadal. Além de estimular o GnRH, a leptina atua diretamente na hipófise estimulando a secreção de FSH e LH (OGURA et al., 2001; CAVALCANTE; AICELES RAMOS, 2013).

Inúmeros estudos *in vitro* demonstram que aplicações suprafisiológicas de leptina inibiram a esteroidogênese nas células da granulosa de bovinos e em outras espécies. Em contraste, doses fisiológicas estimularam a esteroidogênese em células cultivadas da granulosa de suínos e de gansos na presença e na ausência de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) I. Logo, níveis circulantes de leptina podem exercer efeito direto sobre a atividade ovariana (KARAMOUTI et al., 2008; SMOLINSKA et al., 2012; CAVALCANTE; AICELES RAMOS, 2013; HU et al., 2014).

Estudos em cultura de células ovarianas de ovelhas e suplementadas com leptina puderam concluir que ela promove o desenvolvimento de oócitos competentes, proliferação do tecido ovariano e aumento no número de folículos (KAMALAMMA et al., 2016).

IV. Receptores de leptina no ovário

Estudos desenvolvidos por Zerani et al., (2004), Archanco et al., (2007) Kumar et al., (2012) e Batista et al., (2013) verificaram a expressão por meio de imunohistoquímica (IHC) de receptores de leptina presentes no ovário de coelhas pseudogestantes, ratos, bubalinas e cabras respectivamente, sendo a marcação mais intensa nas células da granulosa dos folículos primários, secundários e terciários, no oócitos e no corpo lúteo, principalmente nas células luteínicas grandes, foram encontradas também nas células da teca, porém, nessas a marcação foi menos intensa.

A leptina e seus receptores foram encontrados, por meio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RTPCR), em ovários de cadelas prenhes, com abundância nas células da granulosa luteinizadas e no corpo lúteo. Tanto a leptina quanto seu receptor apresentaram variação nos níveis de expressão durante a vida útil do corpo lúteo, alcançando seu maior índice na primeira metade da gestação (BALOGH et al., 2012).

Quando analisaram as alterações cíclicas da expressão de receptores de leptina em gatas, Albrizio et al., (2013) observaram que a expressão oscilava no decorrer do ciclo estral dos animais, apresentando valores maiores na gestação e pseudogestação quando comparados ao anestro, proestro e estro, sugerindo que a expressão deste hormônio está sob influência das gonadotrofinas ou hormônios esteroides.

3) OBJETIVOS

I. OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunolocalização e distribuição dos receptores de leptina (Ob-R) nas principais estruturas ovarianas de preás (*Galea spixii*).

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliar a distribuição dos receptores de leptina nos folículos e oócitos em diferentes estádios do desenvolvimento folicular;
- B. Verificar a imunolocalização dos receptores de leptina nas células do corpo lúteo e do estroma ovariano;
- C. Quantificar a imunorreação dos receptores de leptina nas estruturas ovarianas da espécie

4) METODOLOGIA

Este experimento foi aprovado pelo Instituto Chico Mendes ICMBio/SISBIO (23091.005451/2015-51) e pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA (Anexo I), com número de protocolo: 48585-1/2015.

I. Seleção dos animais

Foram selecionadas aleatoriamente 20 fêmeas de preá (*Galea spixii*) (Figura 1) adultas, oriundas do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA.



Figura 1: Preá (*Galea spixii*) no recinto do CEMAS. Acervo pessoal

II. Coleta das amostras

Para coleta das amostras os animais foram pesados e pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina na dose de 4 mg.Kg^{-1} e cloridrato de cetamina 60 mg.Kg^{-1} por via intramuscular. Após 10 minutos, os animais foram anestesiados com sobredose anestésica de tiopental (60 mg.Kg^{-1}) por via intracardíaca e por fim eutanasiados com administração de cloreto de potássio $2,56 \text{ mEq.Kg}^{-1}$ também por via intracardíaca. Depois de constatada a morte dos animais, procedeu-se uma incisão abdominal ventral com intuito de promover a coleta dos ovários (Figura 2). Também foi coletada uma amostra de tecido adiposo intra-abdominal.



Figura 2: Exposição do ovário após abertura da cavidade abdominal para coleta dos ovários em preá. Acervo pessoal

III. Processamento histológico das amostras

Os ovários foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0.1M, pH 7,2 a 4°C por 24 horas. Após fixação, o material foi lavado em água corrente por 30 minutos para retirada do excesso de fixador. Em seguida, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90, 95 °GL) e três soluções a 100 °GL, permanecendo em cada uma delas por 30 minutos, de modo a garantir total desidratação do material. Após desidratação, as amostras foram imersas em duas soluções de xilol durante 30 minutos cada para diafanização. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em parafina onde permaneceram “overnight”. No dia seguinte, os ovários foram realocados para uma segunda parafina por 60 minutos para então serem emblocados e identificados.

Os ovários foram totalmente fragmentados em cortes contínuos com espessura de 5 µm com auxílio de micrótomo (LEICA RM 2125 RT) em lâminas silanizadas (StarFrost® Advanced Polycat, Alemanha) que foram submetidas ao processo de imunohistoquímica e fotomicrografadas para identificação das estruturas.

IV. Imunohistoquímica para receptores de leptina

Para a realização da imunohistoquímica, os cortes foram submetidos à sequência de imersão em duas soluções de xilol por 10 minutos cada, depois imersos em soluções decrescentes de álcool em três soluções de álcool absoluto, uma a 95°GL, uma a 80°GL e uma de 70 °GL por cinco minutos cada, e por fim as amostras permaneceram em água destilada por mesmo tempo.

A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão das lâminas em solução de citrato de sódio 10 mM, (pH 6,0) tamponado com solução de tampão fosfato salino (PBS) e aquecidos em três sessões de 5 minutos em micro-ondas caseiro na potência máxima (750W), tendo o cuidado de evitar a fervura do material. Após o resfriamento das amostras, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena mergulhando as secções em uma solução contendo 1% de peróxido de hidrogênio diluído em PBS por 10 minutos. O material foi lavado em outra solução de fosfato salino duas vezes e sob agitação, por 5 minutos cada lavagem.

Para o bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se uma solução própria incluída no kit do anticorpo secundário (ImmunoCruzTM rabbit ABC staining System – sc-2018), gotejando sobre os cortes presentes na lâmina até cobri-los. As lâminas contendo os cortes foram armazenadas em câmara úmida por 30 minutos sob refrigeração. Seguindo-se com uma lavagem em PBS sob agitação em três séries de 5 minutos e secadas com papel toalha.

Para a marcação dos receptores de leptina foi instilado 70µL do anticorpo contra receptores de leptina (OB-R H-300 RABBIT IgG, sc-8325, Santa Cruz[®], anticorpo recomendado para as formas curtas e longas dos receptores) na concentração de 1:50 diluído em PBS, e logo em seguida as lâminas foram colocadas em câmara úmida por 12 horas sob refrigeração. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e em seguida todos os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado contra anticorpo de coelho (donkey anti-rabbit IgG-B: sc-2089, Santa Cruz[®]) em câmara úmida por 30 minutos e novamente lavadas em PBS e em seguida incubada com o complexo avidina-biotina em câmara úmida por 30 minutos e lavadas em PBS novamente. Em ambiente escuro, foi instilada uma gota do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB) em cada secção sendo imersas em água destilada após 3 minutos. Após suspensa todas as reações, as lâminas foram banhadas em hematoxilina de Harris, por 10 segundos, e mergulhadas em álcool absoluto e xilol e conseguinte montadas com Permount[®] (Fisher Chemical). As reações positivas foram reconhecidas pela coloração vermelho amarronzadas enquanto que as negativas, coloração branca. Cortes de ovário de bovinos e tecido adiposo foram utilizados como controle positivo da reação (conforme recomendação do fabricante) e seguindo a mesma metodologia supracitada. Os controles negativos envolveram a omissão da incubação com o anticorpo primário (OB-R H-300 RABBIT IgG, sc-8325, Santa Cruz[®]) do procedimento. Não se visualizou imunorreatividade nas preparações controle.

As lâminas foram selecionadas e suas secções fotomicrografadas com a utilização de um microscópio com câmera acoplada (LEICA DM500) sendo capturadas tanto imagens das sessões positivas quanto das negativas.

V. Quantificando a imunorreação

Para quantificar a intensidade das reações positivas de cada estrutura do ovário seguiu-se a metodologia empregada por Fátima et al., (2013) na qual foram selecionadas três secções para cada estrutura e analisadas por um único observador, contabilizando 20 células de cada estrutura seguindo os critérios determinados: Ausência de reação (1), fraca reação (2), moderada (3), forte (4) e muito forte (5).

VI. Análise estatística

As medianas da intensidade de marcação quanto à imunohistoquímica foram comparadas por Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Todas as comparações foram realizadas em função dos diferentes tipos celulares com nível de probabilidade de 5%, sendo utilizado para tal finalidade o BioEstat 5.0.

5) RESULTADOS

A imunorreação para Ob-R foi detectada no ovário de preás. As marcações positivas foram localizadas nas células da granulosa, células da teca, oócito, células do estroma, endoteliais e perivasculares, assim como no corpo lúteo. O tecido adiposo também apresentou receptores de leptina (Figura 3). As secções designadas para o controle negativo foram livres de marcação (Figura 3- A', C', E').

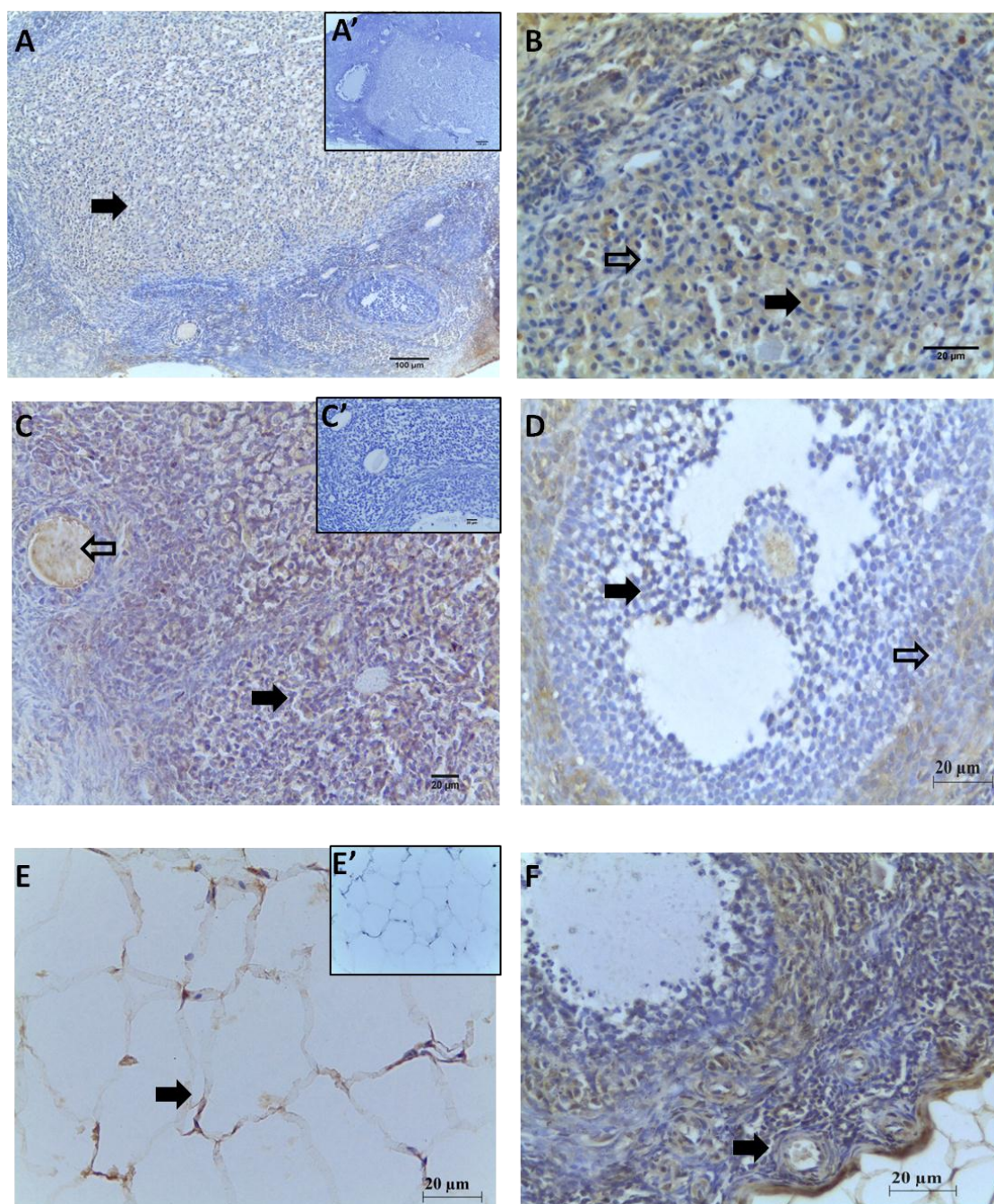


Figura 3: Imunolocalização de receptores de leptina em ovário (A, B, C, D, F) e tecido adiposo (E) de préa. A- Corpo lúteo apresentando reação positiva; B – CL positivo. Células luteínicas grandes (seta cheia) e células pequenas (seta vazia) positivas; C – Tecido ovariano positivo, oócito (seta vazia) e células do estroma (seta cheia); D – Folículo terciário positivo, células da granulosa fracamente coradas (seta cheia) e células da teca intensamente coradas (seta vazia); E- Tecido adiposo apresentando imunomarcção para receptores de leptina; F- Tecido ovariano apresentando marcação positiva, endotélio e células perivasculares positivas (seta cheia). As imagens A', C' e E' são imagens do controle negativo.

Quando observado a intensidade da marcação verificou-se que as células da teca e o oócito apresentaram reação forte, o estroma e as células luteínicas grandes apresentaram marcação moderada as células da granulosa, endotélio, perivascular e luteínicas pequenas apresentaram reação fraca (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação da imunohistoquímica para Ob-R em ovário de preás (*Galea spixii*).

Células	Intensidade de Marcação
Células da Granulosa	2,00 ^a ± 1,00
Células da Teca	5,00 ^d ± 1,00
Oócito	5,00 ^d ± 3,00
Células do estroma	3,00 ^{cd} ± 2,00
Células endoteliais	3,00 ^{abc} ± 2,00
Perivasculares	2,00 ^{abc} ± 3,00
Luteínicas grandes	3,00 ^{bcd} ± 2,00
Luteínicas pequenas	2,00 ^{ab} ± 3,00

Letras minúsculas indicam comparação entre linhas. A intensidade da imunocoloração foi graduada de 1 a 5, usando o critério a seguir: 1, ausente; 2, fraco; 3, moderado; 4, forte; 5, muito forte. Os valores foram expressos em mediana e desvio padrão. Letras subscritas diferentes indica diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Comparando a marcação dos receptores de leptina no decorrer das fases de desenvolvimento dos folículos, observou-se que o oócito permaneceu intensamente marcado em todas as fases, as células da teca, quando presentes, também seguiram o mesmo padrão da dos oócitos (Figura 4), entretanto as células da granulosa se apresentaram mais intensamente coradas nos estádios iniciais dos folículos do que nos estádios finais (Figura 5).

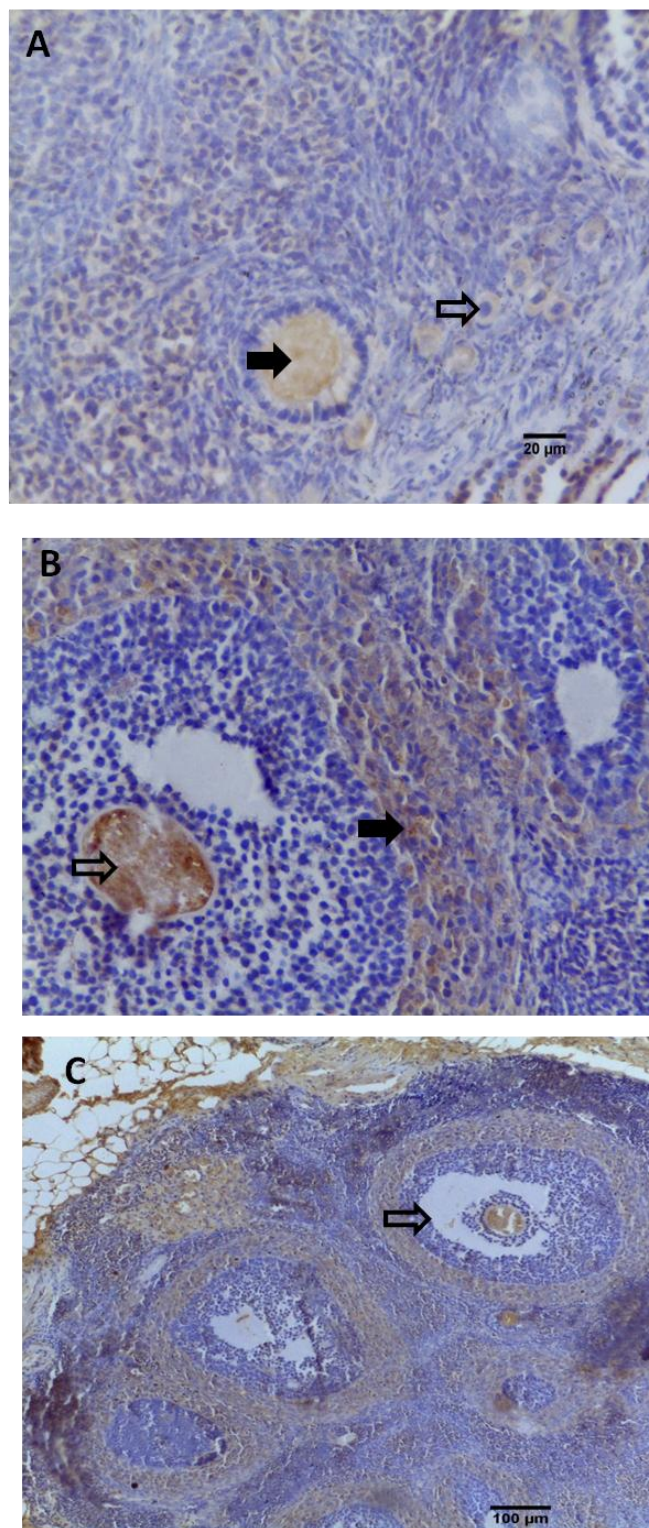


Figura 4: Folículos ovarianos de *Galea spixii* em diversos estádios de desenvolvimento. A- Oócito em folículo primordial exibindo intensa coloração (seta cheia), oócito com intensa marcação em folículo primário (seta vazia); B –Oócito com marcação intensa em folículo secundário (seta vazia) e células da teca também fortemente coradas (seta cheia); C- Células da teca e oócito fortemente marcados em folículo antral (seta vazia).

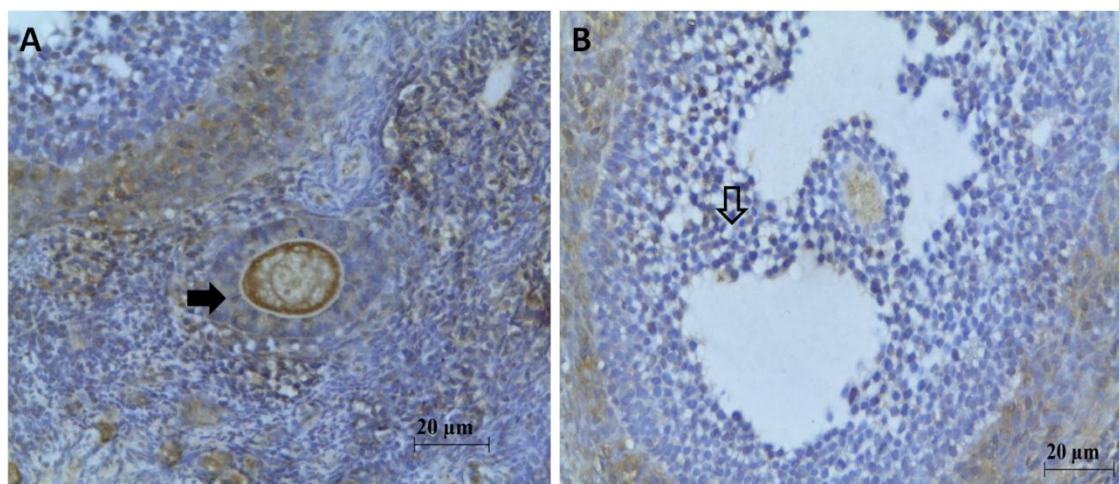


Figura 5: Células da granulosa com diversas intensidades de marcação. A – Folículo secundário apresentando oócito e células da granulosa fortemente marcadas (seta cheia); B – Folículo antral apresentando células da granulosa com marcação fraca (seta vazia).

6) DISCUSSÃO

A leptina apresenta papel importante na reprodução sendo necessária para manutenção da capacidade reprodutiva dos animais (TAHERI e PARHAM, 2016). Atuando por meio de seus receptores, influencia a fisiologia do ovário. O envolvimento direto desse hormônio nas funções ovarianas já foram demonstradas em muitas espécies (KUMAR et al., 2012; ALBRIZIO et al., 2013; BATISTA et al., 2013), entretanto, até o presente momento não há relatos na literatura de estudo deste hormônio e seus receptores em *Galea spixii*. Neste experimento, nós demonstramos pela primeira vez a imunolocalização de receptores de leptina nesta espécie.

No presente trabalho foi observado a imunolocalização dos receptores de leptina (Ob-R) nas principais estruturas do ovário, como: células foliculares, oócitos e corpo lúteo. Estes achados associados às marcações do hormônio leptina encontradas em ratos (RYAN et al., 2002), bovinos (SARKAR et al., 2010), caprinos (BATISTA et al., 2013), nas mesmas estruturas nos faz acreditar que a leptina atue de forma parácrina e/ou autócrina e que interaja com seus receptores em um mecanismo de autorregulação. Outro achado na literatura que embasa essa teoria, é que, animais com deficiência na expressão de receptores de leptina (db/db) apresentam concentrações suprafisiológicas de leptina em sua corrente sanguínea (WANG et al., 2014). Entretanto essa afirmação pode não ser verdadeira na fisiologia de preás, uma vez que não foi analisada a expressão do próprio hormônio nesta espécie.

Com base nos resultados desta pesquisa, foram encontrados receptores de leptina nos oócitos, células da teca, células da granulosa, corpo lúteo, endotélio e células do estroma ovariano de preás (*Galea spixii*). Resultados semelhantes foram relatados em caprinos (BATISTA et al., 2013); ratos (ARCHANCO et al., 2007); ovinos (TAHERI E PARHAM, 2016); bubalinos (KUMAR et al., 2012) e suínos (SMOLINSKA et al., 2012). O que indica que este hormônio possa atuar de forma semelhante nas principais estruturas ovarianas, como folículos e oócitos, corpo lúteo, vasos sanguíneos de espécies diferentes.

Foi demonstrada neste trabalho, através da técnica de imunohistoquímica, a presença de receptores nos oócitos de preás, a qual apresentou forte intensidade em todos os estádios de desenvolvimento folicular, sugerindo que nesta espécie, a leptina tenha participação no metabolismo do oócito. Estes mesmos resultados foram demonstrados ovinos por Taheri e Parham (2016) e em ratos por Ryan et al., (2002). A possível ação da leptina nesta estrutura pode ser explicada de duas maneiras: a primeira é devido a ação direta da leptina sobre seus receptores presente no núcleo do oócito que ativam a MAPK e consequentemente promovendo sua maturação. Essa hipótese foi demonstrada por Craig et al., (2004) ao avaliarem a ação da leptina sobre a maturação de oócitos de suínos, ao observaram que quando introduziam a leptina na cultura havia um aumento na expressão de MAPK e um maior número de oócitos maturados, entretanto quando utilizavam um bloqueador específico de MAPK (U0126) dessa reação, havia redução na expressão desta proteína nos oócitos. A outra forma seria por meio da ação indireta da leptina nas células foliculares ou na angiogênese ovariana.

Ryan et al (2003) e Batista et al., (2013) observaram em ratos e caprinos, respectivamente, que as células da teca demonstravam fraca reação de imunohistoquímica para receptores de leptina. Contudo, em preás, observamos intensa marcação dos receptores de leptina nas células da teca em todas as fases foliculares neste estudo. As diferenças entre as pesquisas podem ter sido causadas por metodologias diferentes. Ryan et al. (2003) utilizaram o congelamento para fixação e processamento das amostras o que pode ter acarretado em perda de propriedades das células da teca, enquanto Batista et al. (2013) na metodologia em seu estudo com caprinos, utilizaram uma concentração do anticorpo primário no momento da incubação divergiu da utilizada em ovários de *Galea spixii* o que pode ter ocasionado uma diminuição na ligação entre o anticorpo e a estrutura mencionada.

A alta expressão de receptores de leptina na teca pode indicar que esse hormônio participe do desenvolvimento folicular e oocitário. Com base nos achados desta pesquisa, acredita-se numa possível associação deste hormônio com as células da teca para a oogênese, uma vez que é sabido que a leptina promove nas células foliculares, a produção de esterol ativador de meiose (MAS), que promoverá a maturação do oócito (RYAN et al., 2002).

Quanto à angiogênese, este estudo observou vasos (endotélio e células perivasculares) marcados para receptores de leptina próximos a folículos em desenvolvimento, como demonstrado na figura 3F. A leptina atua na angiogênese através do aumento na expressão de fatores que promovam a vascularização do ovário como é o caso do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (JOO et al, 2010, WILES et al., 2014). Com essa possível ação sobre a vascularização, a leptina promove o aumento da microvascularização nas adjacências dos folículos, desencadeando maior aporte de nutrientes, hormônios esteroides, gonadotrofinas e oxigênio que servirão de subsídio para proliferação celular desencadeado pela ativação da cascata da proteína MAPK. Acredita-se ainda, que os receptores de leptina nas células endoteliais, por meio dos receptores Ob-Ra e Ob-Rc atuem na captação do hormônio leptina na corrente sanguínea transportando-o para dentro do ovário e que neste, possa exercer sua influência, corroborando com os achados desta pesquisa.

No presente trabalho, foi observado que nas células da granulosa, nos folículos antrais, apresentavam fraca reação ao anticorpo contra o receptor. Este resultado corrobora com Ryan et al., (2002) que avaliaram a presença deste receptor nessas mesmas células de murinos. A presença desses receptores nas células da granulosa tem sido associadas a estimulação da produção de esteroides por elas (KARAMOUTI et al., 2008), ou ainda, que ele atue como um fator proliferativo ou anti apoptótico (WEN et al., 2015).

Comparando as fases de desenvolvimento folicular, notou-se que as células da granulosa nos folículos pré antrais apresentavam mais forte marcação aos receptores da leptina, ao contrário dos antrais, que demonstraram fraca marcação (figura 5). Essa variação entre as marcações se deve ao mecanismo da leptina em atuar em receptores, ativando cascatas mitogênicas e fazendo com que este hormônio atue como fator de proliferação celular. Como os folículos pré antrais necessitam de uma maior proliferação celular para seu desenvolvimento, eles necessitam de maiores quantidades de receptores para este hormônio, o que justifica sua intensa marcação, já nos folículos

antrais, nos quais a mitose não é tão intensa, não se faz necessário grande expressão de receptores, como demonstrado por Wen et al., (2015) que comprovou que a leptina exercia efeito proliferativo em células cultivadas da granulosa de ganso.

Após a ovulação, as células da teca e de granulosa, sofrem um processo de luteinização, que culmina na formação do corpo lúteo (CL). A identificação de receptores nas células do CL de preás (*Galea spixii*) indica que a leptina possa influenciar no metabolismo desta estrutura. Os mesmos achados foram encontrados por Sarkar et al., (2010), Balogh et al., (2012), e Kumar et al., (2012), que avaliaram a expressão de receptores de leptina no CL de bovinos, caninos e bubalinos respectivamente. A influência da leptina nas células luteínicas está relacionada a síntese de enzimas responsáveis pela produção de progesterona (P4), e assim aumentando sua produção. Esta hipótese é reforçada pelos achados encontrados por Smolisnka et al., (2010) e Kumar et al., (2012) que observaram uma correlação entre os níveis de leptina e a expressão dessas enzimas em células do CL no qual a elevação de leptina promovia uma maior expressão das proteínas STAR, P450scc e 3 β -HSD enzimas responsáveis pela quebra e captação de precursores, conversão e produção de P4.

Ainda sobre o corpo lúteo, foi observado neste estudo, alterações na intensidade de reação ao anticorpo contra receptores de leptina entre as células luteínicas, sendo as células luteínicas grandes coradas mais intensamente que as células luteínicas pequenas. Este mesmo dado foi observado também em corpos lúteos de búfalas (KUMAR et al., 2012). A explicação para essa alteração pode estar na capacidade de produção de progesterona por essas células. As células luteínicas grandes apresentam alta produção de progesterona (KALENDER; ARIKAN; SIMSEK, 2014), que faz com que elas acumulem uma maior quantidade de receptores de leptina para que esta possa maximizar sua produção. Entretanto, as células luteínicas pequenas, cuja produção de progesterona é reduzida, não precisam expressar tantos receptores para a leptina.

O estroma ovariano é formado por tecido conjuntivo, principalmente fibroblastos (ROSSETTO et al., 2011). Foi observada neste estudo, forte marcação de receptores de leptina no fibroblasto do estroma ovariano. A julgar pela maior concentração de fibroblastos no tecido ovariano, acredita-se que a função da leptina no estroma ovariano esteja relacionada nesta célula. Segundo Glasow et al., (2001), o tecido conjuntivo é a principal fonte de síntese e ação das citocinas. Como os fibroblastos e adipócitos estão intimamente relacionados, devido sua origem em comum das células germinativas, há hipótese de que os fibroblastos poderiam ser uma outra

fonte de produção de leptina, fazendo com que essas células necessitem expressar receptores como forma de autorregulação da produção hormonal.

7) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram a presença de imunomarcção de receptores para leptina por meio de imunohistoquímica no oócito, células da teca e da granulosa em todos os estádios de desenvolvimento dos folículos, corpo lúteo tanto nas células luteínicas pequenas quanto nas grandes, células endoteliais e perivasculares assim como do estroma do ovário de preás (*Galea spixii*). Com diferentes intensidades entre as estruturas ovarianas sendo observada intensa marcação no oócito e nas células da teca, moderada nas células do estroma e luteínicas grandes, fraca para os demais tipos celulares citados. Com base nisso, é possível se sugerir que a leptina desempenha papel fundamental na reprodução desta espécie.

Entretanto essa pesquisa é apenas o primeiro passo para o entendimento da reprodução desta espécie, uma vez que são necessários estudos mais aprofundados da fisiologia destes animais como, por exemplo, correlacionar os nossos resultados com a marcação de leptina no ovário de preás, além disso, mensurar os hormônios dessa espécie e correlacionar com a leptina e com outros hormônios metabólicos.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, H et al. Chicken leptin receptor is functional in activating JAK–STAT pathway in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 2, p. 335-342, 2008.
- AHIMA, R. S. et al. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 3, p. 391, 1997.
- AHIMA, R. S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, p. 250 – 252, 1996.
- AHRENS, K et al. Serum leptin levels and reproductive function during the menstrual cycle. **American journal of obstetrics and gynecology**, 2013.
- ALBRIZIO, M. et al. The expression of leptin receptor in the ovary of the Queen: Leptin receptor expression in queen ovary. **Research in Veterinary Science**, v.95, p. 629-631, 2013.
- ARCHANCO, M et al. Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.55, n.10, p. 1027-1037, 2007.
- BADO, A et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, n. 6695, p. 790-793, 1998.
- BALOGH, O. et al. Leptin and Leptin Receptor Gene Expression in the Canine Corpus Luteum During Diestrus, Pregnancy and after Aglepristone-Induced Luteolysis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.s6,p. 40-42,2012.
- BARBOZA, R.R et al. The role of game mammals as bushmeat In the Caatinga, northeast Brazil. **Ecology and Society**, v. 21, n. 2, 2016.
- BATISTA, A. M. et al. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. **Animal reproduction science**, v.141, n.3, p. 142-147, 2013.
- CATLI, G. et al. The relation of leptin and soluble leptin receptor levels with metabolic and clinical parameters in obese and healthy children. **Peptides**, v. 56, p. 72-76, 2014.
- CAVALCANTE, F.S.; AICELES, V.; RAMOS, C. F. Leptin regulates gonadotropins and steroid receptors in the rats ovary. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 1, p. 164-168, 2013.
- CEDDIA, R. B. et al. Leptin inhibits insulin-stimulated incorporation of glucose into lipids and stimulates glucose decarboxylation in isolated rat adipocytes. **Journal of endocrinology**, v. 158, n. 3, p. R7-R9, 1998.

CHAN, Jean L. et al. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 9, p. 1409-1421, 2003.

CHEHAB, F F.; LIM, M. E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature genetics**, v. 12, n. 3, p. 318-320, 1996.

CHOU, S. H. et al. Leptin is an effective treatment for hypothalamic amenorrhea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 16, p. 6585-6590, 2011.

CRAIG, J. et al. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5355-5363, 2004.

CRAIG, J. et al. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 229, n. 1, p. 141-147, 2005.

DALL'AGLIO, C. et al. Immunolocalization of leptin and its receptor in the placenta of cats. **Acta histochemica**, v. 114, n. 7, p. 719-722, 2012

DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-370, 2003.

DUPUIS, L et al. Role of leptin receptors in granulosa cells during ovulation. **Reproduction** , v. 147, n. 2, p. 221-229,2014.

ESCOBAR, S et al. Leptin receptor gene in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Cloning, phylogeny, tissue distribution and neuroanatomical organization. **General and comparative endocrinology**, v. 229, p. 100-111, 2016.

FÁTIMA, L. A et al. FSH up-regulates angiogenic factors in luteal cells of buffaloes. **Domestic animal endocrinology**, v. 45, n. 4, p. 224-237, 2013.

GLASOW, A et al. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4472-4479, 2001.

HU, S et al. Role of leptin in the regulation of sterol/steroid biosynthesis in goose granulosa cells. **Theriogenology**, v. 82, p. 677- 685, 2014.

IQBAL, J et al. Localization of long-form leptin receptor in the somatostatin-containing neurons in the sheep hypothalamus. **Brain research**, v. 887, n. 1, p. 1-6, 2000.

JOO, J. et al. Role of leptin in improvement of oocyte quality by regulation of ovarian angiogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 329-334, 2010.

KALENDER, Hakan; ARIKAN, Şevket; ŞİMŞEK, Özkan. The effects of LH on progesterone production by cell subpopulations isolated from early and late luteal phase goat corpora lutea. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 38, n. 4, p. 433-438, 2014.

KAMALAMMA, P. et al. Effect of leptin on in vitro development of ovine preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 85, n. 2, p. 224-229, 2016.

KARAMOUTI, M et al. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 4, p. 1444-1450, 2008.

KHOSROPOUR, S et al. Leptin and leptin-receptor polymorphisms in fertile and infertile men. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, p. 1-8, 2016.

KIKUCHI N. et al. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. **Biology Reproduction**, v. 65, p.66–71, 2001.

KUMAR, L. et al. Expression of leptin and its receptor in corpus luteum during estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal reproduction science**, v. 135, n. 1, p. 8-17, 2012.

LANDRY, D.; CLOUTIR, F.; MARTIN, L. J. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. **Reproductive Biology**. v. 13, p. 1-14, 2013.

LEE, G et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, p. 632 – 635, 1996.

LESHAN, R.B.; PFAFF, D. W.; The hypothalamic ventral premammillary nucleus: A key site in leptin's regulation of reproduction. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61-62, p. 239-247, 2014.

LEW, B. J, DE OLIVEIRA, M. D. S., DE CARVALHO, M. V. Expressão do gene da leptina e seu receptor Ob-Rb no parênquima mamário de novilhas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 5, p. 1263-1270, 2012.

LICINIO, J et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary–adrenal function. **Nature medicine**, v. 3, n. 5, p. 575-579, 1997.

MAGUIRE, M et al. Pregnancy in a woman with congenital generalized lipodystrophy: leptin's vital role in reproduction. **Obstetrics and gynecology**, v. 119, n. 2 Pt 2, p. 452, 2012.

MANN, D R. et al. Changes in circulating leptin, leptin receptor, and gonadal hormones from infancy until advanced age in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3339-3345, 2003.

MELA, V et al. Blockage of neonatal leptin signaling induces changes in the hypothalamus associated with delayed pubertal onset and modifications in neuropeptide expression during adulthood in male rats. **Peptides**, v. 86, p. 63-71, 2016.

MERCATI, F. et al. Leptin receptor is expressed by epidermis and skin appendages in dog. **Acta Histochemica**, v. 116, p. 1270-1275, 2014.

OGASAWARA, H et al. Localization of leptin and leptin receptor in the bovine adenohypophysis. **Domestic animal endocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8-15, 2008.

OGURA, K et al. Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. **European journal of endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 653-658, 2001.

PARK, H.; AHIMA, R. S. Physiology of leptin: energy homeostatis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism clinical and experimental**. v. 64, p. 24-34, 2015.

PROCACCINI, Claudio, et al. Leptin signaling: a key pathway in immune responses. **Current signal transduction therapy**, v. 4, n.1 p. 22-30, 2009.

RESHMA, R. et al. Modulatory Role of Leptin on Ovarian Functions in Water Buffalo (Bubalus Bubalis). **Theriogenology**, 2016.

ROSSETTO, R et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 15-23, 2011.

RYAN, N. K. et al. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 5006-5013, 2003.

RYAN, N. K. et al. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1548-1554, 2002.

SARKAR, M. et al. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 2, p. 174-181, 2010.

SIAWRYS, G; SMOLINSKA, N. Direct *in vitro* effect of LH and steroids on leptin gene expression and leptin secretion by porcine luteal cells during the mid-luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology**, v. 12, n. 3, p. 317-323, 2012.

SMOLINSKA, N et al. Long form of leptin receptor gene and protein expression in the porcine ovary during the estrous cycle and early pregnancy. **Reproductive Biology**, v. 7, p. 17-39, 2007.

SMOLINSKA, N. et al. Leptin gene and protein expression in the ovary during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 5, p. e174-e183, 2010.

SMOLINSKA, N. et al. Expression of leptin and its receptor genes in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs. **animal**, v. 7, n. 01, p. 109-117, 2013.

SUMNER, A. E. et al. Relationship of leptin concentration to gender, menopause, age, diabetes, and fat mass in African Americans. **Obesity**, v.6, n.2, p. 128-133, 1998.

TAHERI, S J; PARHAM, A. Sheep oocyte expresses leptin and functional leptin receptor mRNA. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 395-399, 2016.

TRISOLINI, C et al. Leptin and queen ovary: New insights about ovulation. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 3, p. 707-710, 2013.

WANG, B et al. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 10, n. 2, p. 131-145, 2014.

WEN, R et al. Leptin exerts proliferative and anti-apoptotic effects on goose granulosa cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 149, p. 70-79, 2015.

WILES, J R. et al. The effect of leptin on luteal angiogenic factors during the luteal phase of the estrous cycle in goats. **Animal reproduction science**, v. 148, n. 3, p. 121-129, 2014.

YARANDI, S S. et al. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. **Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 269-275, 2011.

ZERANI, M. et al. A. Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea. **Journal of endocrinology**, v. 183, n. 2, p. 279-288, 2004.

ZHANG, L et al. Regulation and mechanism of leptin on lipid metabolism in ovarian follicle cells from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **General and comparative endocrinology**, v. 222, p. 116-123, 2015.

ZHOU, B O. et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. **Cell stem cell**, v. 15, n. 2, p. 154-168, 2014.

9) ANEXO

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 04 de julho de 2015.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Receptores de leptina, FSH e LH no ovário, hipotálamo e glândulas mamárias de preás (*Galea spixii*) criados em cativeiro”**, protocolo n. 23091.005451/2015-51 sob a responsabilidade de Genilson Fernandes de Queiroz. – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião de 23/06/2015

Vigência do projeto	Agosto a Dezembro de 2015
Espécie/linhagem	<i>Galea spixii</i>
N. de Animais	20
Peso/idade	1 ano
Sexo	Feminino
Origem	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS-UFERSA

Atenciosamente,


Marcelo Barbosa Bezerra
Presidente CEUA-UFERSA

ANEXO II

Células	Corpo lúteo							
	Células da Granulosa	Células da teca	Oócito	Estroma	Endotélio	Perivasculares	Luteínicas Grandes	Luteínicas pequenas
1	2	3	5	3	2	3	5	2
2	2	3	5	3	2	2	5	3
3	3	3	5	3	2	2	3	1
4	2	4	5	3	3	3	3	2
5	2	4	5	3	3	3	3	3
6	3	5	4	3	3	3	5	2
7	2	5	4	4	3	1	5	3
8	1	5	5	4	3	1	3	2
9	1	5	2	4	2	2	4	1
10	1	5	5	3	1	2	1	3
11	2	5	5	3	1	1	3	2
12	2	5	3	4	2	2	3	3
13	3	5	5	4	3	3	5	2
14	3	5	3	4	3	3	3	1
15	2	5	5	5	3	3	3	2
16	2	5	5	5	2	2	3	3
17	1	5	5	3	2	2	4	5
18	1	4	5	3	4	1	5	3
19	3	4	5	4	5	5	3	2
20	2	5	5	3	5	5	1	2
Somatório	40	90	91	71	54	49	70	47
Mediana								
Desvio	2 ± 1,0	5 ± 1,0	5 ± 3,0	3 ± 2,0	3 ± 2,0	2 ± 3,0	3,0 ± 2,0	2,0 ± 3,0
Padrão								