



Imunolocalização de receptores de leptina no ovário de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831)¹

Luã B. Macêdo^{2*}, Carlos Eduardo B. Moura², Moacir F. Oliveira², Valéria V. Paula²,
Ferdinando V.F. Bezerra² e Genilson F. Queiroz²

ABSTRACT.- Macêdo L.B., Moura C.E.B., Oliveira M.F., Paula V.V., Bezerra F.V.F. & Queiroz G.F. 2018. [Immunolocalization of leptin receptor of Spix's Yellow-toothed Cavy (*Galea spixii* Wagler, 1831) ovary.] Imunolocalização de receptores de leptina no ovário de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(3):558-564. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota 572, Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: luanb.macedo27@gmail.com

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 study proposed to analyze the immunolocalization of leptin receptors (Ob-R) in the ovary of cavies. 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

INDEX TERMS: Immunolocalization, leptin receptor, yellow-toothed cavy, *Galea spixii*, ovary, adipocytokines, hystricomorphs, Caviidae, rodent reproduction.

RESUMO.- A leptina, uma citocina produzida pelas células adiposas, é alvo da comunidade científica por acreditarem que ela apresente impacto sobre a 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 (IHC). 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, perivasculars 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.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Imunolocalização, receptores de leptina, ovário, preá, *Galea spixii*, adipocitocinas, histicomorfos, Caviidae, reprodução de roedores.

¹ Recebido em 22 de maio de 2017.

Aceito para publicação em 20 de junho de 2017.

Pesquisa de Mestrado com apoio CAPES.

² Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Av. Francisco Mota 572, Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brasil. *Autor para correspondência: luanb.macedo27@gmail.com

INTRODUÇÃO

À 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 et al. 1996). Ahima et al. (1997) 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.

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 de forma indireta 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 et al. 2013).

A expressão da leptina e de seus receptores 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, 2003) e camundongos (Dupuis et al. 2013); bem como em aves (Adachi et al. 2008) e peixes (Escobar et al. 2016). Porém, até o presente momento não há na literatura nenhum relato de estudos deste hormônio em preás.

Galea spixii é um roedor amplamente distribuído pela América do Sul, e no território brasileiro é encontrado em todos os estados do nordeste, além do Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Distrito Federal (Souza et al. 2013). Esse animal possui um importante papel ecológico, atuando na dispersão de sementes e contribuindo para o desenvolvimento de seu habitat (Barboza et al. 2016). No entanto, são animais que se adaptam bem ao cativeiro, e podem ser criados em larga escala pelos pequenos produtores rurais, sendo fonte alternativa de carne de baixo custo e de elevado valor nutritivo desempenhando um papel crucial nos meios de subsistência e segurança alimentar de várias comunidades rurais e urbanas, especialmente durante as épocas de seca (Barboza et al. 2016, Santos et al. 2017).

As fêmeas de preás possuem ciclo estral contínuo dividido em fases (proestro, estro, metaestro e diestro), com duração de 14 a 18 dias e apresentando período gestacional de 48 dias (Santos et al. 2017). Porém ainda pouco se sabe sobre a reprodução desta espécie. Logo, a compreensão dos mecanismos que controlam a atividade reprodutiva de preás possui papel relevante para a preservação da espécie além do desenvolvimento de técnicas para aumentar a eficiência produtiva. Portanto, o presente trabalho visou analisar os receptores de leptina nos ovários de preá (*Galea spixii*), como primeiro passo para compreender sua importância sobre a reprodução dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

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, com número de protocolo: 48585-1/2015.

Seleção dos animais. Foram selecionadas 20 fêmeas de preá (*Galea spixii*) adultas, oriundas do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA.

Coleta das amostras. Para coleta das amostras os animais foram pesados e pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina na dose de (4mg.kg⁻¹) e cloridrato de cetamina (60mg.kg⁻¹) por via intramuscular. Após 10 minutos, os animais foram anestesiados com sobredose anestésica de tiopental (60mg.kg⁻¹) por fim a administração de cloreto de potássio 2,56mEq.Kg⁻¹, para eutanásia, sendo ambos os fármacos por via intracardiaca. Depois de constatada a morte dos animais, procedeu-se uma incisão abdominal ventral com intuito de promover a coleta dos ovários. Também foi coletada uma amostra de tecido adiposo intra-abdominal.

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 separadamente e identificados. Os ovários foram totalmente fragmentados em cortes contínuos com espessura de 3µm 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.

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, depois 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 10mM, (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, 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 (ImmunoCruz™ 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 biotilado 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 vermelha amarronzada enquanto que as negativas, coloração branca. Cortes de ovário de bovinos e tecido adiposo dos preás 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 imunoreatividade nas preparações controle. As melhores 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.

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 três observadores independentes, seguindo os critérios determinados: Ausência (1), fraco (2), moderado (3), forte (4) e muito forte (5).

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 software BioEstat 5.0.

RESULTADOS

A imunorreação para Ob-R foi detectada em várias células do tecido ovariano 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 e tecido adiposo periovariano (Fig.1). No entanto,

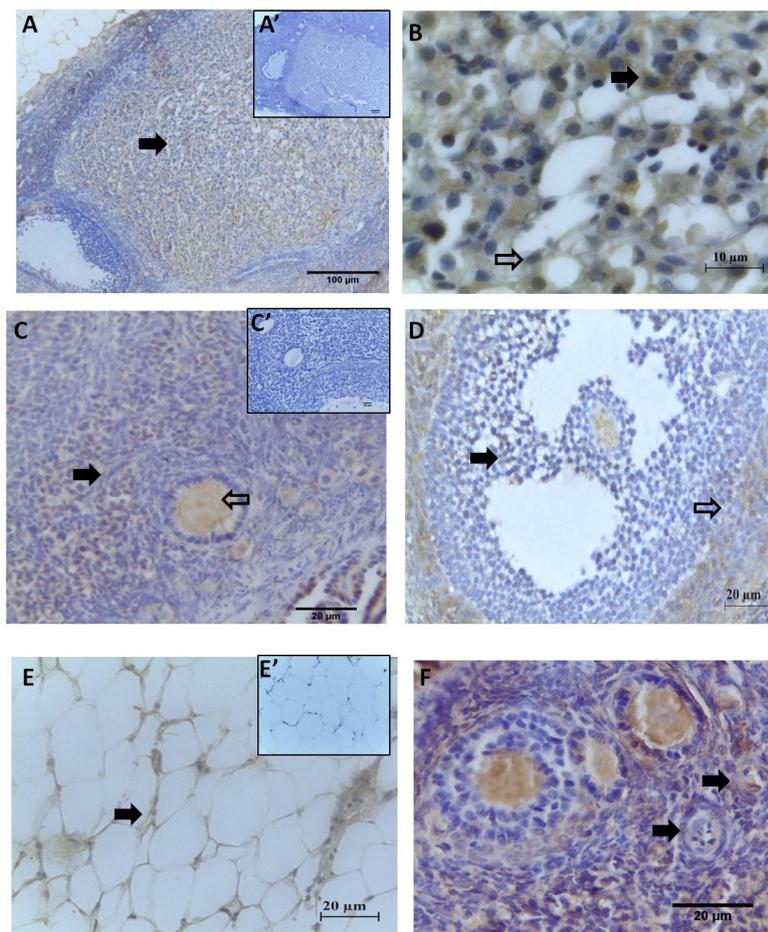


Fig.1. Imunolocalização de receptores de leptina em ovário (A-F) e tecido adiposo (E) de preá. (A) Corpo lúteo apresentando reação positiva. (B) CL positivo, células luteínicas grandes positivas (seta cheia) e células pequenas (seta vazia). (C) Estroma ovariano positivo (seta cheia) e oócito (seta vazia). (D) Folículo terciário positivo, células da granulosa fracamente coradas (seta cheia) e células da teca intensamente coradas (seta vazia). (E) Tecido adiposo periovariano apresentando imunomarcação. (F) Tecido ovariano apresentando marcação positiva, endotélio e células perivasculares positivas (seta cheia). As imagens A', C' e E' são imagens do controle negativo.

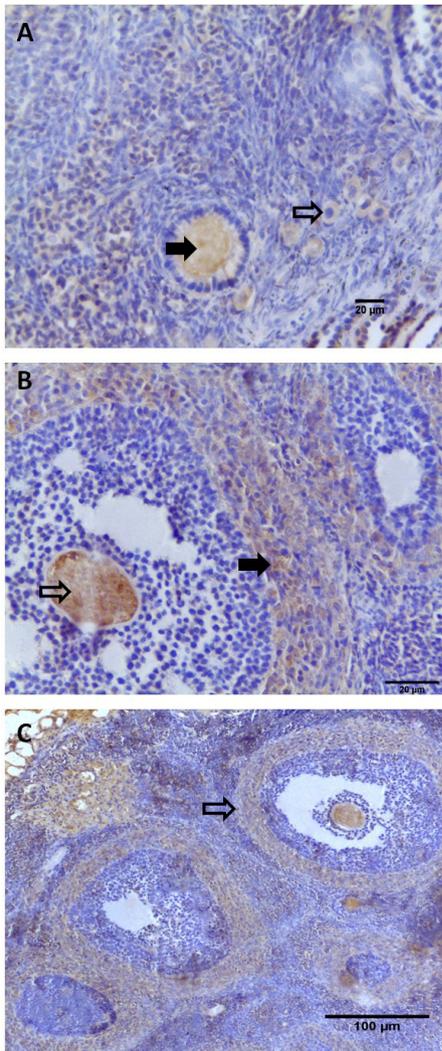


Fig.2. Folículos ovarianos de *Galea spixii* em diversos estádios de desenvolvimento. (A) Oócito em folículo primordial exibindo intensa coloração (seta vazia), oócito com forte marcação em folículo primário (seta cheia). (B) Oócito com marcação muito intensa em folículo secundário (seta vazia) e células da teca também fortemente coradas (seta cheia). (C) Células da teca e oócito fortemente marcados em folículo antral (seta vazia).

a intensidade de marcação variou. As células da teca e o oócito apresentaram reação forte, o estroma apresentou marcação moderada, enquanto as células da granulosa, endoteliais e perivasculares revelaram reação fraca (Quadro 1). Nos vasos sanguíneos, as células endoteliais e as perivasculares indicaram positividade para Ob-R principalmente quando próximas a folículos em desenvolvimento. O tecido adiposo periovariano também apresentou receptores de leptina (Fig.1).

Comparando a marcação dos receptores de leptina no decorrer das fases de desenvolvimento dos folículos, também se observou variação na intensidade. As células da teca, quando presentes, possuíam intensa marcação (Fig.2), entretanto as células da granulosa se apresentaram mais intensamente coradas nos estádios iniciais dos folículos do que nos finais (Fig.3). O oócito apresentou uma intensa imunorreação independente do estádio de desenvolvimento do folículo (Fig.2).

Em uma visão geral, o corpo lúteo apresentou uma extensa marcação, porém mais intensa na região interna da glândula do que em sua cápsula. A intensidade também variou quando comparados às células esteroidogênicas, nas células luteínicas grandes houve marcação moderada, enquanto as células luteínicas pequenas apresentavam fracamente positivas (Fig.1).

Quadro 1. Quantificação da intensidade de reação da imunohistoquímica para Ob-R em ovário de preás (*Galea spixii*)

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

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 entre parênteses o valor mínimo e máximo. Letras sobrescritas diferentes indica diferença significativa ($p \geq 0,05$).

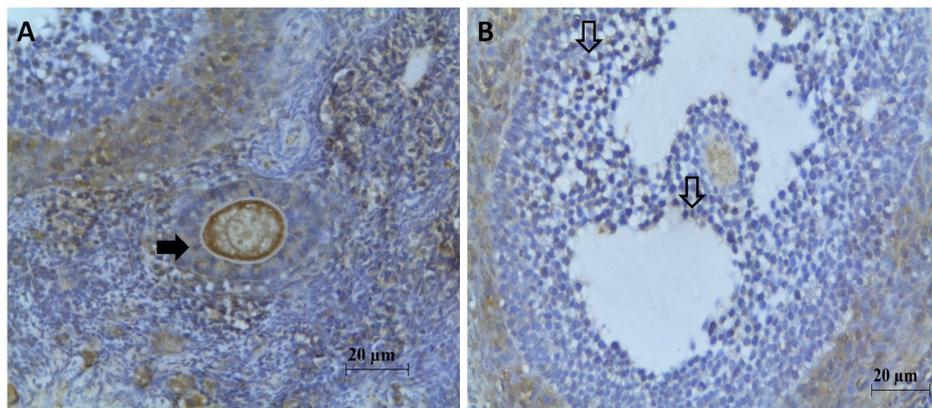


Fig.3. Células granulosas com diversas intensidades de marcação. (A) Folículo secundário apresentando oócito e células da granulosa fortemente marcadas (seta cheia). (B) Folículo antral apresentando células da granulosa com marcação fraca (setas vazias).

DISCUSSÃO

A leptina apresenta papel importante na reprodução sendo necessária para manutenção da capacidade reprodutiva dos animais (Taheri & Parham 2016). Atuando por meio de seus receptores, ela 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 da 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 supra-fisiológicas 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 & Parham 2016), bubalinos (Kumar et al. 2012) e suínos (Smolinska et al. 2013). O que indica que este hormônio possa atuar de forma semelhante nas células ovarianas de espécies diferentes.

Foi demonstrada neste trabalho, através da técnica de imunohistoquímica, a presença de receptores nos oócitos de preás, a qual se demonstrou forte intensidade em todos os estádios de desenvolvimento folicular, sugerindo que nesta espécie, a leptina possua participação primordial no metabolismo do oócito. Estes mesmos resultados foram demonstrados por Ryan et al. (2002) e Taheri & Parham (2016). A possível ação da leptina nesta estrutura pode ser explicada de duas maneiras: devido à 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. (2005) que avaliou a ação da leptina sobre a maturação de oócitos de suínos, eles observaram que quando introduziam a leptina na cultura havia um aumento na expressão de MAPK e uma maturação maior de oócitos, 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) intensamente corados, próximo a um folículo em desenvolvimento, como demonstrado na Figura 1F. A leptina atua na angiogênese através do aumento na expressão de citocinas 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 microcirculação nas adjacências dos folículos e oócitos, 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 Batista et al. 2013 que avaliaram a presença deste receptor nessas mesmas células de caprinos. 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 (Fig.3). Essa discrepância entre as marcações se deve ao mecanismo da leptina em atuar em receptores intracelulares, 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, onde 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 é concentrada no aprimoramento das proteínas responsáveis pela produção de progesterona (P4), e assim aumentando sua produção. Esta hipótese é reforçada pelos achados encontrados por Smolinska 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 a anticorpo 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 produção de progesterona por essas células. As células luteínicas grandes apresentam alta produção de progesterona, 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 expressem receptores como forma de autorregulação.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram a presença de imunomarcagem 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 indicando que nesta espécie a leptina atua de forma diferenciada em cada umas delas.

Com base nisso, é possível sugerir que a leptina desempenha papel fundamental na reprodução desta espécie.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (UNIVERSAL 443443/2014-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- Adachi H., Takemoto Y., Bungo T. & Ohkubo T. 2008. Chicken leptin receptor is functional in activating JAK-STAT pathway in vitro. *J. Endocrinol.* 197(2):335-342. <http://dx.doi.org/10.1677/JOE-08-0098>. PMID:18434363.
- Ahima R.S., Dushay J., Flier S.N., Prabakaran D. & Flier J.S. 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J. Clin. Invest.* 99(3):391-395. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI119172>. PMID:9022071.
- Albrizio M., Roscino M.T., Trisolini C., Binetti F., Rizzo A. & Sciorsci R.L. 2013. The expression of leptin receptor in the ovary of the queen: Leptin receptor expression in queen ovary. *Res. Vet. Sci.* 95(2):629-631. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.023>. PMID:23623353.
- Archanco M., Gomez-Ambrosi J., Tena-Sempere M., Frühbeck G. & Burrell M.A. 2007. Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. *J. Histochem. Cytochem.* 55(10):1027-1037. <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.6A7128.2007>. PMID:17565119.
- Balogh O., Kowalewski M.P. & Reichler I.M. 2012. Leptin and leptin receptor gene expression in the canine corpus luteum during diestrus, pregnancy and after aglepristone-induced luteolysis. *Reprod. Domest. Anim.* 47(Suppl.6):40-42. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12005>. PMID:23279462.
- Barboza R.R., Lopes S., Souto W., Fernandes-Ferreira H. & Alves R. 2016. The role of game mammals as bushmeat In the Caatinga, northeast Brazil. *Ecol. Soc.* 21(2):62-72. <http://dx.doi.org/10.5751/ES-08358-210202>.
- Batista A.M., Silva D.M., Rêgo M.J., Silva F.L., Silva E.C., Beltrão E.I., Gomes Filho M.A., Wischral A. & Guerra M.M. 2013. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 141(3/4):142-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.08.007>. PMID:24016607.
- Cavalcante F.S., Aiceles V. & Fonte Ramos C. 2013. Leptin regulates gonadotropins and steroid receptors in the rats ovary. *Nutr. Hosp.* 28(1):164-168. PMID:23808445.
- Chehab F.F., Lim M.E. & Lu R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.* 12(3):318-320. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0396-318>. PMID:8589726.
- Craig J.A., Zhu H., Dyce P.W., Wen L. & Li J. 2005. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 229(1/2):141-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2004.08.008>. PMID:15607538.
- Dupuis L., Schuermann Y., Cohen T., Siddappa D., Kalaiselvanraja A., Pansera M., Bordignon V. & Duggavathi R. 2013. Role of leptin receptors in granulosa cells during ovulation. *Reproduction* 147(2):221-229. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-13-0356>. PMID:24256641.
- Escobar S., Rocha A., Felip A., Carrillo M., Zanuy S., Kah O. & Servili A. 2016. Leptin receptor gene in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): cloning, phylogeny, tissue distribution and neuroanatomical organization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 229:100-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.017>. PMID:26979276.
- Fátima L.A., Evangelista M.C., Silva R.S., Cardoso A.P.M., Baruselli P.S. & Papa P.C. 2013. FSH up-regulates angiogenic factors in luteal cells of buffaloes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 45(4):224-237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.09.004>. PMID:24209507.
- Glasow A., Kiess W., Anderegg U., Berthold A., Bottner A. & Kratzsch J. 2001. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(9):4472-4479. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.9.7792>. PMID:11549696.
- Hu S., Gan C., Wen R., Xiao Q., Gou H., Liu H., Zhang Y., Li L. & Wang J. 2014. Role of leptin in the regulation of sterol/steroid biosynthesis in goose granulosa cells. *Theriogenology* 82(5):677-685. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.025>. PMID:25016410.

- Joo J.K., Joo B.S., Kim S.C., Choi J.R., Park S.H. & Lee K.S. 2010. Role of leptin in improvement of oocyte quality by regulation of ovarian angiogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 119(3/4):329-334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.002>. PMID:20197222.
- Karamouti M., Kollia P., Kallitsaris A., Vamvakopoulos N., Kollios G. & Messinis I.E. 2008. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertil. Steril.* 90(Suppl.4):1444-1450. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.076>. PMID:18082739.
- Kumar L., Panda R.P., Hyder I., Yadav V.P., Sastry K.V., Sharma G.T., Mahapatra R.K., Bag S., Bhure S.K., Das G.K., Mitra A. & Sarkar M. 2012. Expression of leptin and its receptor in corpus luteum during estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* 135(1-4):8-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.030>. PMID:22959515.
- Ogura K., Irahara M., Kiyokawa M., Tezuka M., Matsuzaki T., Yasui T., Kamada M. & Aono T. 2001. Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* 144(6):653-658. <http://dx.doi.org/10.1530/eje.0.1440653>. PMID:11375800.
- Reshma R., Mishra S.R., Thakur N., Parmar M.S., Somal A., Bharti M.K., Pandey S., Chandra V., Chouhan V.S., Verma M.R., Singh G., Sharma G.T., Maurya V.P. & Sarkar M. 2016. Modulatory role of leptin on ovarian functions in water buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology* 86(7):1720-1739. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.029>. PMID:27381558.
- Rossetto R., Lima I.M.T., Saraiva M.V.A., Lima-Verde I.B., Sales E.T. & De Figueiredo J.R. 2011. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. *Acta Vet. Brasilica* 5(1):15-23.
- Ryan N.K., Van der Hoek K.H., Robertson S.A. & Norman R.J. 2003. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. *Endocrinology* 144(11):5006-5013. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0584>. PMID:12959975.
- Ryan N.K., Woodhouse C.M., Van der Hoek K.H., Gilchrist R.B., Armstrong D.T. & Norman R.J. 2002. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 66(5):1548-1554. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1548>. PMID:11967222.
- Santos A.C., Viana D.C., Oliveira G.B., Silva R.S., Oliveira M.F. & Assis-Neto A.C. 2017. Follicular development and morphological changes in the vaginal epithelium during the estrous cycle of *Galea spixii*. *Microsc. Res. Tech.* 80(2):167-176. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22784>. PMID:27717109.
- Sarkar M., Schilffarth S., Schams D., Meyer H.H. & Berisha B. 2010. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 77(2):174-181. PMID:19908249.
- Smolinska N., Kaminski T., Siawryns G. & Przala J. 2010. Leptin gene and protein expression in the ovary during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs. *Reprod. Domest. Anim.* 45(5):174-183. PMID:19930136.
- Smolinska N., Kaminski T., Siawryns G. & Przala J. 2013. Expression of leptin and its receptor genes in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs. *Animal* 7(1):109-117. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731112001103>. PMID:23031202.
- Souza K., Coelho R.D.F., Reis P.M.A.G., Nicola P.A., Pereira L.C.M. & Ribeiro L.B. 2013. Predation of the spix's yellow-toothed cavy, *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae) by the tropical rattlesnake *Crotalus durissus cascavella* (Serpentes: Viperidae) in the semi-arid region of Brazil. *Herpetol. Notes* 6(1):277-279.
- Taheri S.J. & Parham A. 2016. Sheep oocyte expresses leptin and functional leptin receptor mRNA. *Asian Pac. J. Reprod.* 5(5):395-399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.002>.
- Wang B., Chandrasekera P.C. & Pippin J.J. 2014. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 10(2):131-145. <http://dx.doi.org/10.2174/1573399810666140508121012>. PMID:24809394.
- Wen R., Hu S., Xiao Q., Han C., Gan C., Gou H., Liu H., Li L., Xu H., He H. & Wang J. 2015. Leptin exerts proliferative and anti-apoptotic effects on goose granulosa cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 149:70-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.01.001>. PMID:25576904.
- Wiles J.R., Katchko R.A., Benavides E.A., O'Gorman C.W., Escudero J.M., Keisler D.H., Stanko R.L. & Garcia M.R. 2014. The effect of leptin on luteal angiogenic factors during the luteal phase of the estrous cycle in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 148(3/4):121-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.002>. PMID:24962614.