

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Tito Cardoso de Almeida Mafra

**MELATONINA MATERNA E ASPECTOS DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DA
PROLE ADULTA**

Belo Horizonte

2023

Tito Cardoso de Almeida Mafra

MELATONINA MATERNA E ASPECTOS DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DA PROLE ADULTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre (a) em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte
2023

043 Mafra, Tito Cardoso de Almeida.
Melatonina materna e aspectos da função reprodutiva da prole adulta
[manuscrito] / Tito Cardoso de Almeida Mafra. – 2023.
48 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Cronobiologia. 3. Glândula Pineal. 4. Melatonina. 5. Ciclo
Estral. 6. Testosterona. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Fabiane C M Reis, CRB 6 - 2680



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Melatonina Materna e Aspectos da Função Reprodutiva da Prole Adulta"

ALUNO: TITO CARDOSO DE ALMEIDA MAFRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 05 de setembro de 2023, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Eduardo Koji Tamura - DCS/UESC

Profa. Dr. Roberta Araújo Lopes - ICB/UFMG

Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini - ICB/UFMG



Documento assinado eletronicamente por Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior, em 19/09/2023, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 52 do Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020.

sei!

Documento assinado eletronicamente por Eduardo Koji Tamura, Usuário Externo, em 19/09/2023, às 13:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 59 do 13 de novpmhrn dp



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Araújo Lopes, Usuária Externa**, em 25/09/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2638513** e o código CRC **17C15858**.

Documento assinado eletronicamente por Roberta Araújo Lopes, Usuária Externa, em 25/09/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 59 do

Dedico este trabalho a minha orientadora Maristela Poletini que fez este sonho se tornar possível e não desistiu de mim. Aos meus pais, que agora estão juntos de Deus cuidando de mim, e a minha esposa Ludimila que está ao meu lado nos bons e nos maus momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido por meio da concessão da bolsa de estudos durante o período de realização deste mestrado. O suporte financeiro foi fundamental para a minha dedicação exclusiva à pesquisa, bem como para a aquisição de materiais e recursos necessários para o desenvolvimento desta dissertação.

À minha orientadora, Maristela de Oliveira Poletini, agradeço imensamente pela sua orientação sábia, paciência incansável e dedicação inabalável. Seu profissionalismo e expertise foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Suas palavras de encorajamento e confiança me impulsionaram a não desistir, a superar os desafios e alcançar resultados que jamais imaginei possíveis. Sua presença ao longo dessa caminhada foi um verdadeiro presente.

Aos professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia (PGFISFAR), agradeço pela qualidade dos cursos e disciplinas oferecidos, que proporcionaram uma base sólida para a minha formação acadêmica. Agradeço também pelo estímulo à reflexão crítica e pela construção do ambiente acadêmico enriquecedor, onde pude trocar ideias e compartilhar conhecimentos com os discentes e os docentes.

Ao meu pai, José Geraldo Mafra, que nos deixou bem no início do meu período no Mestrado, e minha mãe, Márcia Maria Cardoso de Almeida, que também nos deixou recentemente. Pelo amor, apoio e incentivo incondicionais ao longo de toda a minha trajetória em que puderam acompanhar. A confiança de ambos em mim foi fundamental para que eu pudesse perseguir meus objetivos. Agradeço também aos meus irmãos, Joyce Aparecida Mafra e Leonardo Henrique, pelo apoio e compreensão durante os momentos de ausência e dedicação intensa.

À minha esposa, Ludimila Carvalho, agradeço por ser a minha maior fonte de inspiração. Seu amor e paciência me ajudaram a superar os meus desafios internos e externos, proporcionando um equilíbrio necessário para dar continuidade nesta jornada. Agradeço por ser meu Norte, por acreditar em mim e por estar ao meu lado.

RESUMO

A melatonina é o sinalizador da fase de escuridão do ciclo circadiano. O feto e o neonato recebem melatonina exclusivamente da mãe. Assim, a falta de melatonina materna pode significar uma cronoruptura circadiana, ou seja, um desalinhamento do relógio biológico com os ciclos de luz e escuridão (LE), gerando prejuízo na programação fetal. O presente trabalho avaliou o papel da melatonina materna sobre alguns aspectos da função do eixo hipotálamo-hipófise gonadal (HHG) da prole na vida adulta. Para isso, ratos machos e fêmeas adultos filhos de ratas pinealectomizadas (PINX), PINX tratadas com melatonina durante a gestação e lactação (PINX-MEL) e ratas controles foram estudados na fase adulta (2 meses de idade). Nas fêmeas, foram analisados o ciclo estral, peso uterino e as concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH). Nos machos, foram analisados o peso do testículo, da vesícula seminal, do epidídimo, o índice gonadossomático, além das concentrações plasmáticas de LH e testosterona. Observamos que a frequência de proestro foi menor nas ratas PINX e PINX-MEL comparada às ratas controle. A frequência de estro foi maior nas ratas PINX comparada às ratas controle. Já a frequência de diestro foi menor no grupo PINX comparado ao grupo controle. Os resultados mostraram irregularidade no ciclo estral no grupo PINX, o qual não foi revertida pelo tratamento com melatonina. Em relação ao LH das fêmeas, não houve diferença estatística entre os grupos. No entanto, a grande dispersão nas concentrações plasmáticas de LH encontrada nas filhas de mães PINX e PINX-Mel sugere que o pico pré-ovulatório de LH tenha ocorrido em diferentes horários do dia nestes grupos. Já em relação aos machos, observamos uma redução nas concentrações de LH nos filhos de mães PINX e PINX-Mel em relação aos filhos de mães controles. Por outro lado, a prole masculina PINX mostrou uma tendência de aumento dos valores de testosterona sanguínea em relação à prole controle. Em relação as células de Leydig, machos PINX apresentaram um volume celular e citoplasmático maiores comparados aos machos controle, o que pode indicar uma alteração na esteroidogênese. Em paralelo, machos PINX apresentaram um número reduzido de células de Leydig comparado aos machos controle, o que pode ser consequência dos valores reduzidos de LH encontrados neste grupo. O tratamento com melatonina reduziu o volume celular e citoplasmático quando comparado aos machos controle e PINX. Além disso, a reposição com melatonina parcialmente

restabeleceu o número de células de Leydig. Os resultados em conjunto mostram que PINX materna participa do desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em fêmeas e machos, uma vez que a PINX das mães repercutiu em alterações no ciclo estral e secreção de LH em fêmeas bem como na morfologia dos testículos, na secreção de LH e de testosterona em machos.

Palavras-chave: cronobiologia; glândula pineal; ciclo estral; testosterona.

ABSTRACT

Melatonin is the marker of the dark phase of the circadian cycle. The fetus and the newborn exclusively receive melatonin from the mother. Therefore, the lack of maternal melatonin can misalign the biological clock with the light-dark (LD) cycles, leading to impairments in fetal programming. This study evaluated the role of maternal melatonin on some aspects of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis function in adult offspring. To do so, adult male and female rats born to pinealectomized (PINX) mothers, PINX mothers treated with melatonin during gestation and lactation (PINX-MEL), and control rats were studied in adulthood (2 months of age). In females, the estrous cycle, uterine weight, and plasma luteinizing hormone (LH) levels were analyzed. In males, testicular weight, seminal vesicle weight, epididymis weight, gonadosomatic index, and plasma LH and testosterone levels were analyzed. We observed that the proestrus frequency was lower in PINX and PINX-MEL rats compared to control rats. The estrus frequency was higher in PINX rats compared to control rats. On the other hand, the diestrus frequency was lower in the PINX group compared to the control group. The results showed irregularities in the estrous cycle in the PINX group, which were not reversed by melatonin treatment. Regarding female LH, there was no statistical difference between the groups. However, the high dispersion in plasma LH concentrations found in the offspring of PINX and PINX-MEL mothers suggested that the preovulatory LH peak may have occurred at different times of the day in these groups. As for males, we observed a reduction in LH concentrations in the offspring of PINX and PINX-MEL mothers compared to the offspring of control mothers. On the other hand, male PINX offspring showed a tendency of increased blood testosterone levels compared to control offspring. Concerning Leydig cells, PINX males exhibited larger cellular and cytoplasmic volumes than control males, indicating a potential alteration in steroidogenesis. In parallel, PINX males had a reduced number of Leydig cells compared to control males, which could be a consequence of the reduced LH values found in this group. Melatonin treatment reduced cellular and cytoplasmic volumes compared to control and PINX males. Furthermore, melatonin supplementation partially restored the number of Leydig cells. Taken together, the results suggest that maternal PINX induces alterations in the development of the hypothalamic-pituitarygonadal axis in females and males, which have repercussions

on the estrous cycle and LH secretion in females, as well as testicular morphology, LH secretion, and testosterone levels in males.

Key words: Chronobiology; pineal; estrous cycle; testosterone.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Organização do sistema de tempo circadiano..... | 14 |
| Figura 2 – Circuito neural da supressão e secreção da melatonina..... | 18 |
| Figura 3 – Concentrações de progesterona, prolactina, estradiol, LH e FSH..... | 22 |
| Figura 4 – Peso e partos das ratas mães CONTROLE, PINX e PINX MEL..... | 34 |
| Figura 5 – Número de filhotes, peso da ninhada com todos os filhotes..... | 35 |
| Figura 6 – Porcentagem das fases de proestro (P), estro (E) e diestro (D)..... | 37 |
| Figura 7 – Peso dos órgãos reprodutores e índice anogenital de filhotes..... | 39 |
| Figura 8 – Volume celular, citoplasmático, número das células de Leydig de filhotes..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|---|
| AANAT | Arilalquilamina N-acetiltransferase |
| ACTH | Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotropina |
| ALE | Atividade locomotora espontânea |
| AMPK | Proteína quinase A ativada |
| ARC | Núcleo Arqueado |
| AVPV | Núcleo Anteroventral periventricular |
| BMAL1 | Brain and muscle ARNT-Like 1 |
| CLOCK | Circadian locomotor output cycles kaput |
| CRH | Hormônio liberador de corticotrofina |
| Cry | Cryptochrome |
| DHT | Di-hidrotestosterona |
| ER | Receptor de Estrógeno |
| ER α | Receptor de estrógeno tipo alfa |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| HHG | Hipotálamo-hipófise gonadal |
| IGS | Índice gonadossomático |
| Kiss1 | Kisspeptina-1 |
| LE | Luz e escuridão |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| MT1 | Receptor de melatonina 1a |
| MT2 | Receptor de Melatonina 2b |
| NSQ | Núcleo Supraquiasmático |
| Per | Period Genes |

PFA Paraformaldeído

PINX Pinealectomizado

PINX-MEL Pinealectomizado com reposição oral de melatonina

PR Receptor para progesterona

PVN Núcleo Paraventricular

REL Retículo endoplasmático liso

Rev-Erba/ β Nuclear Receptor subfamily 1

Rora/ β RAR-related Orphan Receptor alpha/beta

TC Temperatura corporal

ZT Zeitgeber Time

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 19 |
| 2.1 GLÂNDULA PINEAL, SÍNTESE E SECREÇÃO DE MELATONINA | 19 |
| 2.2 MELATONINA NA GESTAÇÃO E SEU PAPEL NA FUNÇÃO REPRODUTIVA | 21 |
| 2.3 ASPECTOS ENDÓCRINOS DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE FÊMEAS | 22 |
| 2.4 FUNCIONAMENTO DOS TESTÍCULOS..... | 25 |
| 3. HIPÓTESE CENTRAL | 27 |
| 4. OBJETIVOS | 27 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL | 27 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 5.1 ANIMAIS | 28 |
| 5.2 CIRURGIA DE PINEALECTOMIA..... | 28 |
| 5.3 CRUZAMENTO | 29 |
| 5.4 SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA..... | 29 |
| 5.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL NA PROLE FEMININA | 30 |
| 5.5.1 <i>Esfregaço vaginal</i> | 30 |
| 5.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL NA PROLE MASCULINA | 30 |
| 5.6.1 <i>Análise morfológica dos testículos</i> | 30 |
| 5.6.2 <i>Parâmetros morfológicos das células de Leydig</i> | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6.3 Dosagem de LH | 32 |
| 5.6.4 Dosagem de Testosterona | 33 |
| 6. ANÁLISE DOS RESULTADOS | 34 |
| 6.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 34 |
| 7. CONCLUSÃO | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema temporal circadiano de mamíferos é constituído de elementos capazes de detectar pistas temporais previsíveis e traduzi-las para um oscilador central, localizado no NSQ (Núcleo Supraquiasmático). A luz é considerada a principal pista temporal capaz de promover o ajuste ou arraste dos ritmos circadianos. A melatonina da glândula pineal é diretamente regulada pela luz, a qual inibe a produção e secreção deste hormônio. Assim, as concentrações sanguíneas de melatonina oscilam de acordo com o ciclo de claro e escuro e, como consequência, da regulação do relógio central, sendo um eferente endócrino crucial para a manutenção da homeostase temporal (Amaral et al., 2018).

O NSQ além de gerar os ritmos circadianos, é responsável pelo alinhamento destes ritmos ao ciclo de luz e escuridão, (Moore and Eichler 1972; LeSauter, Lehman, and Silver 1996; Ralph et al. 1990; Sujino et al. 2003; Golombek and Rosenstein 2010). A rota neural responsável pelo alinhamento ou foto-arrastamento dos ritmos circadianos, inicia-se nas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina que são responsáveis pela percepção da irradiação luminosa (Provencio, Rollag, and Castrucci 2002; Berson, Dunn, and Takao 2002). A partir destas células, origina-se o trato retino-hipotalâmico, que envia um sinal neuronal estimulatório para o NSQ, de tal maneira que a atividade deste núcleo encontra-se aumentada durante a fase de luz (Ohta, Yamazaki, and McMahon 2005; Partch, Green, and Takahashi 2014). Já do ponto de vista de efeitores endócrinos, a melatonina da pineal e os glicocorticoides das adrenais são os principais hormônios do sistema temporal circadiano.

A melatonina atua como o principal agente endógeno sinalizador do fotoperíodo, enquanto os glicocorticoides predizem o início da fase de atividade do animal, promovendo alterações metabólicas com o intuito de mobilizar energia para uma maior demanda energética encontrada na fase ativa do animal (Su et al. 2016; Spiga et al. 2014). Além disso, o NSQ, por meio de suas inervações aos neurônios pré-autonômicos do hipotálamo, pode regular o aporte simpático e parassimpático a órgãos periféricos, tais como o pâncreas, a adrenal e o fígado, sincronizando assim os ritmos circadianos das concentrações de glicose, insulina e ácidos graxos livres ao ciclo de luz e escuridão (Buijs et al. 2003). Os ritmos de atividade locomotora

espontânea (ALE) e temperatura corporal (TC) são regulados pelas projeções neurais do NSQ, principalmente à área pré-óptica medial, núcleo pré-óptico mediano e núcleo dorso medial do hipotálamo (Dibner, Schibler, and Albrecht 2010). Ao nível celular, o sistema temporal circadiano conta com um conjunto de proteínas chamadas de proteínas de relógios, as quais regulam a fisiologia tanto do oscilador central (o NSQ) quanto de tecidos periféricos. A expressão destas proteínas segue um ritmo circadiano que é determinado pelo funcionamento de alças de retroalimentação positiva e negativa, ilustrada de forma simplificada na figura 1A. As proteínas CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) e BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein 1) formam heterodímeros, os quais estimulam a transcrição dos genes *Period* (Per) 1, 2 e 3, e *Cryptochrome* (Cry) 1 e 2. As proteínas PER e CRY formam oligômeros, que são fosforilados por uma caseína quinase e transportados do citoplasma para o núcleo. Uma vez no núcleo celular, o dímero PERCRY bloqueia a transcrição de seus respectivos genes ao interagir com CLOCK/BMAL1, inibindo sua ação, resultando no fim da transcrição de Per e Cry. As proteínas Rev-Erba/β (NR1D1, Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1/2) e Rora/β (RAR-related Orphan Receptor alpha/beta) aumentam em resposta a ação de CLOCK/BMAL1 e, REV-ERBa reprime a transcrição de Bmal1, ligando-se ao seu promotor, enquanto RORα estimula. Quando a proteína REV-ERBa está ausente, o gene Bmal1 (e possivelmente também o gene Clock) é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano de expressão das proteínas de relógio (Albrecht 2012). Em tecidos periféricos, o ritmo circadiano de expressão das proteínas de relógio pode ocorrer independente do oscilador central, no entanto, a sintonia de fase deste ritmo em cada célula de um tecido requer sinais neuroendócrinos regulados pelo NSQ (Pilorz, Helfrich-Förster, and Oster 2018).

Na figura 1A a maquinaria molecular do relógio está representada como relógio de ponteiros, a hipótese de trabalho dos pesquisadores centra-se em proteínas de relógio estão em fase em função do efeito sincronizador de eferentes neurais e endócrinos (Figura 1A). Como consequência de uma rota neural originada no NSQ, o ritmo circadiano de alterações fisiológicas, comportamentais e moleculares está alinhado com o ciclo de luz e escuridão, representado pelas barras brancas e pretas, respectivamente, na figura 1A. Observa-se uma compartimentação temporal (dia e noite) dos horários de alimentação, das atividades e das interações sociais, as quais

são acompanhadas de ritmos endócrinos na secreção de melatonina e dos glicocorticoides, os quais por sua vez, também podem funcionar como pistas endógenas para os relógios periféricos (Figura 1A). Um desalinhamento desses ritmos é conhecido como cronorruptura circadiana, ou seja, órgãos e tecidos não conseguem desempenhar sua fisiologia de forma coordenada no tempo (Buhr and Takahashi 2013). Os efeitos negativos da cronorruptura sobre a saúde humana podem ser observados de forma acentuada em trabalhadores de turno invertido. Estes indivíduos apresentam uma maior incidência de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia (Maury, Ramsey, and Bass 2010; Reid and Abbott 2015), além de problemas relacionados com a função reprodutiva. As causas de um possível desalinhamento entre os relógios periféricos, bem como as mudanças de fase e amplitude de eferentes endócrinos são pouco conhecidas (Figura 1B).

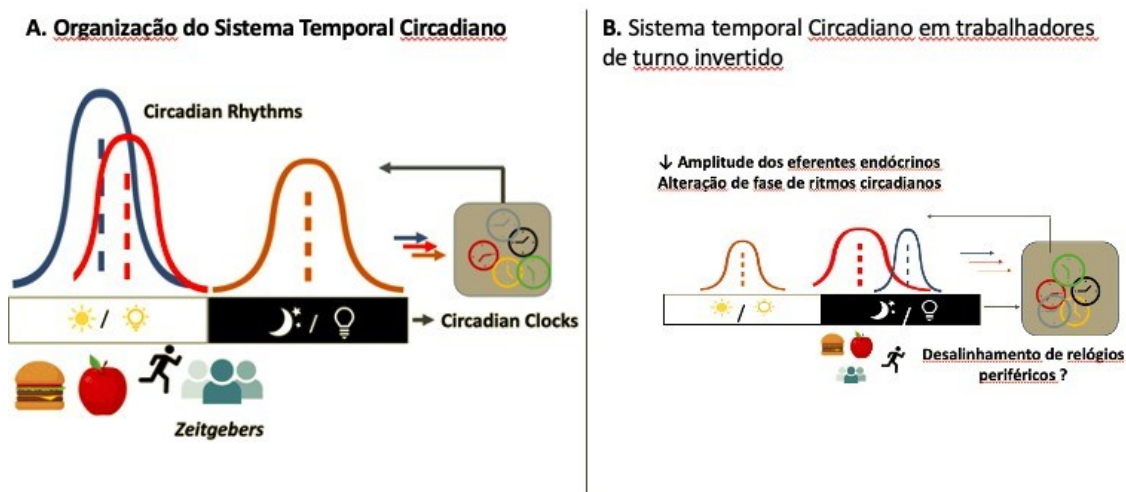


Figura 1 – Organização do sistema de tempo circadiano. Painel A, a organização do sistema de tempo circadiano é apresentada. Os sincronizadores temporais (zeitgebers) são compartimentalizados de acordo com o ciclo claro e escuro (LD), ilustrado pelos retângulos brancos e pretos. A luz solar ou luz artificial determina o fotoperíodo. Os ritmos circadianos no comportamento e na fisiologia (eferentes endócrinos e metabólicos) são representados pelas linhas azuis, vermelhas e marrons. Esses ritmos são uma consequência dos osciladores endógenos ou relógios circadianos, ilustrados por relógios coloridos. Cada relógio representa uma oscilação periférica na maquinaria molecular do relógio expressa em todo o corpo. Ciclos LD, horário de alimentação, interações sociais e atividade são todos sincronizadores temporais (ou pistas temporais) que ajustam os ritmos circadianos por meio dos relógios circadianos. Esses ritmos também funcionam como sincronizadores temporais internos para os relógios circadianos. Painel B, Alterações no estilo de vida, como alterações nos padrões temporais alimentares, de locomoção e das interações sociais podem ser decorrência do trabalho em turno invertido. Essas mudanças alteram zeitgebers externos e, possivelmente, internos o que pode ser consequência da redução da amplitude e fase de ritmos circadianos. Este fenômeno é conhecido como cronorruptura. Figura modificada de Poletini et al 2023.

Mulheres que trabalham em turno invertido apresentam ciclos menstruais alterados com tempo de sangramento maior e maior incidência de cólicas menstruais

graves (Labyak et al. 2002), apresentam alterações no período da fase folicular e nos níveis plasmático do hormônio folículo estimulante (FSH) (Lohstroh et al. 2003; Chung et al. 2005) e são mais susceptíveis a abortos espontâneos (Knutsson 2003; Fernandez et al. 2016).

Sabe-se que desafios enfrentados pela mãe no período gestacional, ou mesmo no período próximo a concepção, podem acarretar danos ao desenvolvimento embrionário e fetal (Hanson and Gluckman 2014). Estes podem levar a alterações na programação fetal por mecanismos que variam desde a alteração das divisões celulares até processos epigenéticos capazes de modificar o padrão de expressão gênica dos embriões (Hanson and Gluckman 2014). Estas alterações podem causar impactos diversos na saúde dos indivíduos na vida adulta (Varcoe, Gatford, and Kennaway 2018). Em mulheres, embora existam dados epidemiológicos apontando o efeito da cronoruptura circadiana sobre a gestação e a função reprodutiva (Fernandez et al. 2016), não se conhece os efeitos da cronoruptura materna sobre a programação fetal e o desenvolvimento e saúde dos filhos destas mães na vida adulta. Por outro lado, modelos animais revelaram que manipulação no fotoperíodo (exposição a luz constante ou a protocolo de foto-arrastamento), durante a gestação, levam a alterações metabólicas e do sistema temporal circadiano, além de prejuízos às respostas do eixo adrenal ao estresse na prole adulta (Spichiger et al. 2015; Salazar et al. 2018; Varcoe 2018; Varcoe, Gatford, and Kennaway 2018). Tendo em vista que (1) a luz é a principal pista ambiental para o sistema temporal circadiano, (2) a melatonina é um importante hormônio sinalizador do fotoperíodo e zeitgeber interno para o organismo e (3) a única fonte de melatonina circadiana para o feto e o neonato é a de origem materna (Illnerová, Burešová, and Presl 1993; Attanasio, Rager, and Gupta 1986; Kennaway, Stamp, and Goble 1992), investigamos o efeito da melatonina sobre aspectos da fisiologia reprodutiva da prole na vida adulta de ratas e ratos. Nossos resultados somar-se-ão ao da literatura, os quais apontam para um papel da melatonina da glândula pineal materna sobre a programação fetal no metabolismo da glicose (Ferreira et al. 2012), no tempo de aparecimento de caracteres físicos, tais como a pelagem, assim como no desenvolvimento neural e da função cognitiva da prole masculina (Motta-Teixeira et al. 2018). Juntos, estes resultados contribuem na construção de um arcabouço científico para balizar políticas públicas para mães e pais trabalhadores de turno invertido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glândula Pineal, síntese e secreção de Melatonina

A glândula pineal está localizada na região do diencéfalo, pertencendo ao epitélamo, é uma estrutura neuroendócrina que se desenvolve como uma projeção do terceiro ventrículo. Os pinealócitos, células da glândula pineal, são os principais responsáveis pela síntese e secreção de melatonina. A melatonina é um hormônio amínico, derivado do aminoácido Triptofano, que ao sofrer a ação da enzima Triptofano-hidroxilase, é convertido em 5-hidroxitriptofano. Após ser descarboxilado, é formada Serotonina, que poderá seguir para a via desaminativa-oxidativa ou a via acetilativa. Em condições de ausência de luz, ocorre aumento significativo da atividade da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), que faz com que a Serotonina produzida passe pela via Acetilativa e seja convertida em N-acetil5metoxitriptamina (Melatonina). Por outro lado, na presença de luz, a atividade da enzima AANAT é reduzida e quase toda a serotonina produzida passa pela via desaminativa-oxidativa, na qual, grande parte da serotonina é degradada (Bubenik et al., 1998).

A via neural que comunica a condição de luz externa origina-se nos receptores fotossensíveis da retina, que através do trato retino-hipotalâmico, leva a informação fóptica até o NSQ. Do NSQ partem projeções para o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), que por sua vez, enviam projeções para os núcleos da medula espinhal localizados na coluna intermediolateral, onde se localizam os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Estes, por sua vez, se projetam para o gânglio cervical superior, onde, por fim, os neurônios pós-ganglionares simpáticos, se projetam para a glândula pineal. Durante a fase escura, neurônios do sistema simpático envolvidos na via, recebem sinais excitatórios, fazendo com que seja liberado noradrenalina, a qual via receptor beta-1, ativa os pinealócitos, aumentando a atividade da enzima AANAT, e por consequência, fazendo com que a serotonina seja desviada para a via acetilativa e seja sintetizada e secretada a melatonina (Amaral et al, 2018). Como pode ser observado na figura 2, como consequência da ativação do NSQ pelo sinal fóptico, a secreção de melatonina pela glândula pineal está inibida, em decorrência da inibição do circuito neural: NSQ → núcleo paraventricular (PVN) → gânglio cervical → liberação de noradrenalina na pineal (Teclerian-Mesbah et al. 1999; Simonneaux

and Ribelayga 2003). Paralelamente, projeções do NSQ para o núcleo subparaventricular e dorsomedial hipotalâmicos terminam em neurônios gabaérgicos em animais noturnos, e em neurônios glutamatérgicos, em animais diurnos. Esses interneurônios, por sua vez, inervam os neurônios parvicelulares do PVN, produtores de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), responsável pela regulação da secreção de ACTH e glicocorticoides adrenais (Dibner, Schibler, and Albrecht 2010). Assim, durante a fase de luz, o NSQ, por meio destas projeções, inibe a secreção de glicocorticoides adrenais em animais noturnos e, ao contrário, estimula, em animais diurnos (Buijs et al. 1999).

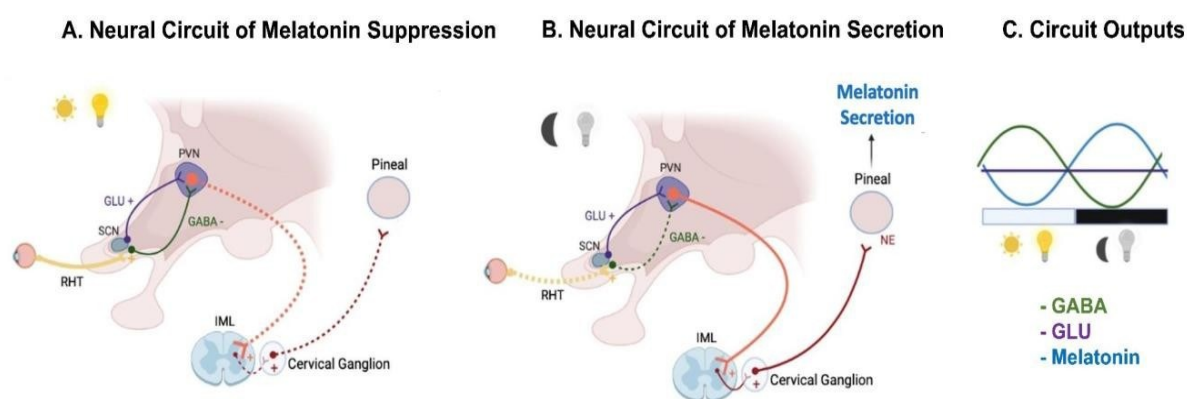


Figura 2 – Circuito neural da supressão e secreção da melatonina. (A) A luz ativa o núcleo supraquiasmático (NSQ) através do trato retinohipotalâmico (TRH), o que desencadeia um aumento na entrada GABAérgica no núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo. Em resposta à inibição GABAérgica, a atividade da via neural NPV > núcleo intermediolateral da medula espinal (NIL) > gânglio cervical superior > glândula pineal é reduzida, e a produção de melatonina é suprimida. (B) Na ausência de luz artificial ou natural, a entrada GABA do NSQ no NPV está ausente, e o circuito NPV > NIL > GCS > glândula pineal está ativo, resultando na secreção de melatonina pela pineal durante a fase escura. (C) Perfil diário da liberação de GABA e glutamato (GLU) no NPV, e melatonina da pineal como resultado do funcionamento desse circuito através das fases de luz e escuridão. Note que as entradas de glutamato do NSQ no NPV não mudam durante o ciclo circadiano. Em A e B, NE significa norepinefrina, linhas sólidas significam ativação e linhas tracejadas significam inibição. Em C, retângulos brancos e escuros representam as fases de luz e escuridão, respectivamente. A figura foi criada com o Biorender.com e está no trabalho de Toledo et al 2023.

Algumas das ações da melatonina são mediadas por receptores de membrana específicos. Três subtipos de receptores de melatonina em mamíferos já foram identificados, sendo que dois deles, o receptor de melatonina 1a e 2b (MT1 e MT2), são pertencentes a família de receptores acoplados a proteína G. O mecanismo de transdução de sinal associado à ativação de MT1 ou MT2 em células-alvo causa a inibição da atividade da adenilato ciclase, a redução dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e, conseqüentemente, a menor ativação da proteína quinase A (PKA). No entanto, em órgãos e tecidos específicos, a melatonina pode desencadear

cascatas específicas de segundos mensageiros. No cérebro, os receptores do tipo MT1 são abundantemente encontrados no NSQ, hipocampo e cerebelo e pars tuberalis da hipófise. Já o receptor do tipo MT1 é mais comumente encontrado na retina. Nos tecidos reprodutivos humanos, os receptores do tipo MT1 e MT2 já foram identificados no epitélio mamário, miométrio uterino, células da granulosa e lútea do ovário (Claustrat et al., 2015).

2.2 Melatonina na gestação e seu papel na função reprodutiva

A glândula pineal se desenvolve a partir de uma área do neuroepitélio que reveste o teto do terceiro ventrículo do cérebro pré-natal da prole durante as primeiras semanas de vida. A única fonte de melatonina circulante para a prole até o 16º dia da gestação de ratos é a de origem materna. A partir deste período os níveis de melatonina começam a variar de acordo com o período do dia, estando mais elevados durante o ciclo escuro.

O desenvolvimento da glândula pineal é dependente de uma rede de fatores de transcrição, que mantém e impulsionam a formação da glândula. A glândula pineal madura é um órgão bastante homogêneo, sendo que aproximadamente 95% das células são pinealócitos, enquanto o restante são principalmente células intersticiais, vasos sanguíneos e fibras nervosas (Jimenez-Jorge et al., 2007; Tamura et al., 2008).

Existem evidências de que a glândula pineal influencia o eixo hipotálamohipófise-gonadal por meio da melatonina. A regulação da secreção de gonadotrofina e prolactina responde a fotoperíodos ambientais. A pulsatilidade do GnRH, hormônio que controla a secreção de LH e FSH, está sujeito a influência da ação da melatonina. É sabido que as concentrações séricas de melatonina de humanos e de roedores apresentam aumento significativo durante o período gestacional, sendo que após o parto estes valores tendem a se reduzir. Em fêmeas prenhas, é sabido que a melatonina materna possui diversas ações relacionadas ao desenvolvimento da prole. As variações circadianas na concentração de melatonina materna durante a gravidez servem como um valioso sinal para feto incorporar os ritmos circadianos, desenvolvendo mecanismos de ajuste influenciados pela duração do dia e da fase circadiana dos recém nascidos após o parto. Assim como o

crescimento gonadal dos fetos e dos recém-nascidos, que são diretamente influenciados por informações do fotoperíodo recebidas no útero através da mãe.

Entretanto, não está claro o efeito da ausência de melatonina na gestação. Sabe-se que a melatonina afeta o tempo de gestação, mas não o crescimento fetal. A ausência de melatonina materna por meio da pinealectomia materna, com ou sem suplementação de melatonina, não afeta a produção de progesterona. Porém, alguns estudos já demonstraram que a pinealectomia materna aumenta a expressão de receptores de melatonina no NSQ fetal e neonatal em ratos, podendo influenciar por consequência o ritmo de atividade de alguns genes, proteínas e outros substratos (Tamura et al., 2008; Takayama et al., 2003).

2.3 Aspectos endócrinos da função reprodutiva de fêmeas

Sabe-se que tanto fêmeas quanto machos de mamíferos apresentam um padrão ultradiano pulsátil de secreção de LH, que deriva da secreção igualmente pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no sangue porta-hipofisário, o qual é absolutamente essencial para a manutenção da responsividade dos gonadotrofos hipofisários e funcionalidade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Em adição o padrão pulsátil de secreção de LH, as fêmeas também apresentam um padrão periódico infradiano de liberação das gonadotrofinas, induzido pelo aumento dos níveis de estradiol de origem folicular através de um mecanismo de retroalimentação positiva. Este evento corresponde ao pico pré-ovulatório de LH, que deflagra a ovulação e a formação do corpo lúteo em fêmeas. Em roedores, o pico pré-ovulatório de LH apresenta um marcante componente de regulação circadiana, estando temporalmente acoplado ao período de vigília e de comportamento sexual (Everett and Sawyer 1950; De La Iglesia and Schwartz 2006). Por fim, é reconhecido que ambos os padrões periódicos de secreção de LH, pulsatilidade e pico préovulatório, são essenciais para a função reprodutiva e a fertilidade em fêmeas (Herbison, 2016). As gonadotrofinas hipofisárias LH e FSH atuam nas gônadas estimulando a produção de gametas e a secreção de esteroides sexuais. Os esteroides sexuais, por sua vez, exercem ações de retroalimentação negativa no sistema nervoso central e na hipófise e, desta forma, inibem a secreção de LH e controlam a atividade do eixo HHG. Estradiol e progesterona são os principais esteroides sexuais em fêmeas. O ciclo reprodutivo de fêmeas de roedores tem

duração de aproximadamente 4 a 5 dias, e pode ser monitorado pelo acompanhamento das características morfológicas do epitélio vaginal através da visualização ao microscópio óptico do esfregaço vaginal. Estas características refletem as variações dos esteroides ovarianos, principalmente o estradiol, que determina o tipo celular presente no esfregaço vaginal. Dessa forma, a cada aproximadamente 1 dia, ocorre alterações no esfregaço, as quais refletem as concentrações hormonais de cada fase do ciclo estral. A predominância de leucócitos, os quais são células menores com um citoplasma granular indica a fase de diestro, que é dividida em diestrus 1 ou metaestrus e diestrus 2. Como podemos observar na figura abaixo, no diestrus 2, baixas concentrações de FSH e LH enquanto concentrações crescentes de estradiol são observadas (Figura 3). Já a predominância de células nucleadas e arredondadas em aglomerados indica a fase do Proestro. Na manhã de proestro, são observadas as mais elevadas concentrações de estradiol, e, na tarde o pico pré-ovulatório de LH, FSH e prolactina, os quais são sucedidos por concentrações elevadas de progesterona e queda das concentrações de estradiol. A seguir, inicia-se a fase de estrus, onde há a predominância de células epiteliais escamosas cornificadas, sem núcleo observável e com forma irregular. Do ponto de vista comportamental, o estrus é caracterizado pela agitação do animal e sua suscetibilidade à copula, que pode ocorrer com sucesso na noite entre o proestros e estrus (LEVINE, 2015).

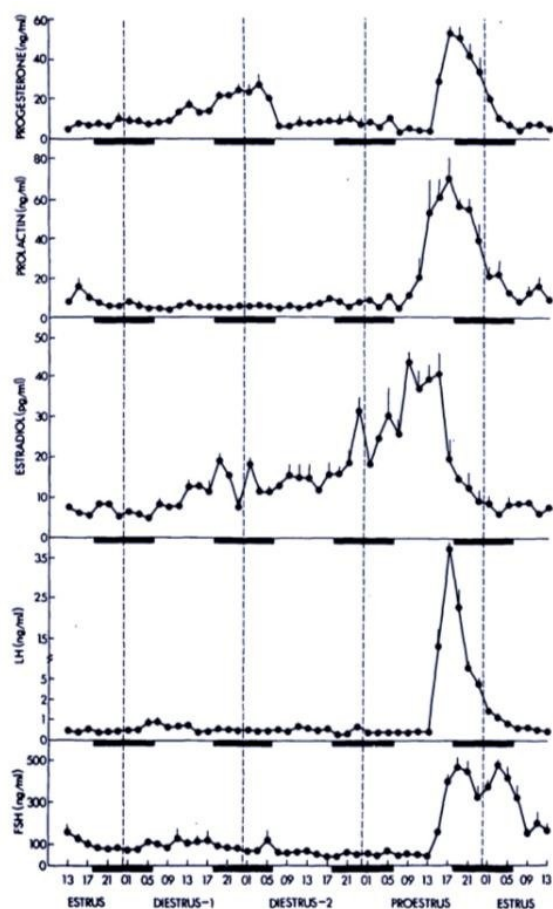


Figura 3 – Concentrações de progesterona, prolactina, estradiol, LH e FSH durante os 4 dias de ciclo estral de ratas. Para a construção deste gráfico, Smith et al (1975) eutanasiou de 4 a 6 ratas a cada 2 horas durante o ciclo estral. As horas do relógio estão na abscissa, e as barras pretas sobre a abscissa indicam a fase de escuro do ciclo circadiano. As linhas verticais pontilhadas paralelas à ordenada delimitam de forma didática a fase do ciclo estral, a saber: estrus, diestrus 1, diestrus 2 e proestrus.

Em termos de reguladores hipotalâmicos, sabe-se que os neurônios GnRH não apresentam receptor para estrógeno (ER) do tipo alfa ($ER\alpha$) ou receptor para progesterona (PR) (Hrabovszky et al. 2000; Fox et al. 1990), os quais são responsáveis pelo controle das funções reprodutivas e fertilidade (Wintermantel et al. 2006; Glidewell-Kenney et al. 2007). Desta forma, a maioria dos efeitos estrogênicos sobre os neurônios GnRH ocorre indiretamente, através de neurônios sensíveis ao estradiol que se projetam até os neurônios GnRH. Nesse contexto, destacam-se os neurônios produtores do neuropeptídeo kisspeptina, codificado pelo gene *Kiss1*, que em roedores estão localizados majoritariamente nos núcleos anteroventral periventricular (AVPV) e arqueado (ARC) do hipotálamo, e são responsivos aos esteroides gonadais (Smith, Cunningham, et al. 2005; Smith, Dungan, et al. 2005). A ação central da kisspeptina é atualmente considerada essencial para o estabelecimento da puberdade e manutenção da atividade do eixo HHG em inúmeras

espécies, incluindo humanos (Seminara et al. 2003; De Roux et al. 2003; Pinilla et al. 2012). Isto se deve ao potente efeito estimulatório da kisspeptina sobre a atividade dos neurônios GnRH (Irwig et al. 2004; Messenger et al. 2005; Han et al. 2005; Keen et al. 2008) e, conseqüentemente, sobre a secreção de LH (Gottsch et al. 2004; Navarro et al. 2005; Dhillon et al. 2005; Shahab et al. 2005). As duas populações de neurônios kisspeptina são reguladas de forma diferenciada pelo estradiol, pois o mesmo estimula a expressão do gene Kiss1 no AVPV, enquanto a inibe no ARC (Smith, Cunningham, et al. 2005; Smith, Dungan, et al. 2005). Esta regulação diferencial pelo estradiol tem embasado a hipótese que prevê a existência de duas populações funcionalmente distintas de neurônios kisspeptinérgicos, i.e., os neurônios do AVPV, que estariam relacionados ao mecanismo de retroalimentação positiva, e os neurônios do ARC, relacionados ao mecanismo de retroalimentação negativa dos esteroides ovarianos sobre a secreção de LH. De fato, evidências experimentais indicam uma importante participação dos neurônios kisspeptinérgicos do AVPV na gênese do pico de LH induzido por esteroides ovarianos (Smith et al. 2006; J Clarkson et al. 2008). Os neurônios do ARC por sua vez têm sido relacionados à geração do padrão pulsátil de liberação de GnRH/LH (Lehman, Coolen, and Goodman 2010) e evidências recentes em camundongos indicam que a atividade intrínseca destes neurônios, de fato, corresponde ao gerador de pulso de GnRH hipotalâmico (Jenny Clarkson et al. 2017). Mutações disfuncionais no gene Kiss1 ou de seu receptor cognato Kiss1r causam insuficiência de secreção de gonadotrofinas e infertilidade em humanos e modelos animais (Seminara et al. 2003; De Roux et al. 2003).

2.4 Funcionamento dos testículos

Os testículos são órgãos reprodutivos masculinos essenciais para a produção de espermatozoides e hormônios sexuais, como a testosterona. A morfologia dos testículos é altamente organizada, composta por estruturas tubulares conhecidas como túbulos seminíferos, onde ocorre a espermatogênese. De acordo com Hess et al. (2013), foi descrita a morfologia detalhada do desenvolvimento testicular em camundongos. O estudo mostrou que, desde o nascimento até a fase adulta, ocorrem alterações significativas na organização dos túbulos seminíferos, que estão relacionadas à maturação do sistema reprodutor.

Os testículos abrigam vários tipos celulares essenciais para a função reprodutiva masculina. Entre eles, as células de Leydig são responsáveis pela síntese e secreção de testosterona. Em um estudo publicado por Rebourcet et al. (2017), os autores demonstraram que as células de Sertoli também desempenham um papel crucial na regulação da microcirculação testicular e na modulação das concentrações plasmáticas de testosterona em camundongos adultos. Essas células de suporte fornecem um microambiente adequado para o desenvolvimento dos espermatozoides e estão intimamente envolvidas na formação da barreira hemato-testicular, que protege as células germinativas da exposição a substâncias estranhas. A produção hormonal nos testículos é regulada por complexas interações entre o sistema hipotalâmico-hipofisário e as células testiculares. O GnRH estimula a liberação de LH e hormônio folículo estimulante (FSH) hipofisários. O LH atua nas células de Leydig, estimulando a síntese de testosterona, enquanto o FSH tem um papel importante na regulação do desenvolvimento dos espermatozoides. Um estudo realizado por Liu et al. (2018) investigou a interação entre GnRH e a proteína ativina nas células de Sertoli, mostrando que a ativina regula a resposta das células de Sertoli à estimulação do GnRH, desempenhando um papel importante na modulação da função testicular.

Além da sua função reprodutiva, os testículos também desempenham um papel endócrino crucial na regulação do desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias nos machos. A testosterona é o principal hormônio androgênico secretado pelos testículos e é responsável pelo desenvolvimento de características sexuais masculinas, como crescimento muscular, engrossamento da voz e crescimento de pelos faciais. Segundo Camats-Tarruella et al. (2018), foram investigadas as implicações clínicas de distúrbios do desenvolvimento sexual em indivíduos com genitália ambígua. Através do estudo foi identificada a importância da produção adequada de testosterona pelos testículos na diferenciação sexual normal e no desenvolvimento das características masculinas.

3. HIPÓTESE CENTRAL

A informação temporal fornecida pela melatonina materna no período gestacional e/ou perinatal participa na organização e desenvolvimento do eixo HHG da prole adulta.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ausência de melatonina de origem materna sobre a função reprodutiva da prole adulta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a regularidade do ciclo estral;

Avaliar as concentrações plasmáticas de LH em fêmea;

Avaliar a morfologia testicular;

Avaliar as concentrações de LH e testosterona em machos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 21 ratas fêmeas e 3 ratos machos provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA) da UFMG (CEUA-UFMG número 220-2022). 14 ratas fêmeas do experimento foram submetidas a cirurgia de pinealectomia (PINX), destas, 7 ratas receberam melatonina diluída na água de maneira a garantir uma dose de 0,1 mg/kg da rata. Após 30 dias, todas as ratas (controle, PINX, PINX+MEL) foram expostas aos machos para o acasalamento, em forma de rodízio, de tal forma a garantir que os 3 machos acasalassem com fêmeas de todos os grupos experimentais. A presença de espermatozoide na vagina foi o parâmetro utilizado para o sucesso no acasalamento, sendo o marco inicial da prenhez. A reposição com melatonina continuou durante a prenhez na dose de 0,2 mg/Kg (2X a dose inicial) até o início da terceira semana, quando a dose foi triplicada em relação a inicial. Após o parto a dose de reposição com melatonina voltou para valores pré-gestacionais (0,1 mg/kg), os quais permaneceram durante toda a lactação. O período de lactação foi de 21 dias. Os filhotes foram separados das mães e mantidos em caixas coletivas até a sexagem, quando a ninhada foi normalizada para 4 fêmeas e 4 machos, os quais seguiram o período de lactação.

5.2 Cirurgia de Pinealectomia

Vinte e uma ratas fêmeas clinicamente saudáveis foram submetidas à anestesiada dissociativa com cloridrato de xilazina a 2% (10mg/kg/IM) (Anasedan(r)) e cloridrato de cetamina (75mg/kg/IM) (Vetanarcol(r)), mantidas sob respiração espontânea. As ratas Wistar foram posicionadas em decúbito ventral sob cama cirúrgica adaptada com seus membros em extensão. Procedeu-se à tricotomia com lâmina de aço inoxidável e à assepsia da área dorsal da cabeça com digluconato de clorexidina a 2% (Handex(r)) e solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. Com um micromotor (Motor de Suspensão Beltec Mini) de baixa rotação (RPM 15.000) e uma broca odontológica de aço PM 03 acoplada a um mandril, realizou-se a craniotomia. Retirou-se um fragmento circular da calota de aproximadamente 4mm de diâmetro, tendo

como ponto central de referência o lambda, ou seja, a união da sutura sagital com a sutura lambdoidea. Com o uso de uma tesoura cirúrgica reta romba 12cm, procedeu-se a uma secção do vaso entre os dois nós e, logo após, o nó próximo à confluência foi flexionado para visualização e retirada da glândula pineal. Em seguida, o fragmento ósseo foi recolocado sem fixação e recoberto com pele suturada em pontos simples com fio.

5.3 Cruzamento

Três ratos machos adultos foram adicionados as caixas onde estavam distribuídas as fêmeas dos três grupos experimentais (Controle, Pinx e Pinx+Mel). Foram mantido regime de harém, no qual cada um dos ratos foi mantido na caixa de em um grupo por uma semana, e ao fim desta semana os ratos eram transferidos para uma nova caixa de outro grupo experimental. Foram realizado o esfregaço vaginal das ratas das caixas onde haviam machos, todos os dias, afim de se identificar o dia em que tivera acontecido o cruzamento. A confirmação foi feita a partir da identificação de espermatozoides no fluído obtido por meio do esfregaço. Os cruzamentos foram realizados por três semanas, após este período, os machos foram retirados das caixas e as ratas foram alocadas individualmente.

5.4 Suplementação de Melatonina

Conforme descrito em estudos anteriores (Steyn et al., 2013) a suplementação de melatonina (1,0 mg/kg de peso corporal) foi adicionada à água de beber, exclusivamente durante a fase escura no zeitgeber time 13 (ZT13), ou seja, as 20 horas do horário de Brasília. A retirada da água com a suplementação de melatonina foi realizada no ZT23 (6 horas da manhã) e durante a fase clara, os animais foram mantidos com água sem suplementação. A concentração na solução de água potável foi corrigida diariamente, utilizando-se o volume ingerido da noite anterior. A suplementação de melatonina foi realizada a partir de uma semana após a cirurgia de pinealectomia das ratas, e foi mantida durante o cruzamento, gestação e até o fim da lactação da prole. Este protocolo de melatonina foi feito para mimetizar os níveis fisiológicos de melatonina e já foi utilizado em vários experimentos realizados anteriormente utilizando-se do mesmo protocolo (nível plasmático de pico de melatonina de 150 pg/ml).

5.5 Procedimento experimental na prole feminina

5.5.1 Esfregaço vaginal

Para o acompanhamento do ciclo estral foram feitas coletas diárias de secreção vaginal em solução fisiológica. As amostras foram observadas ao microscópico óptico (aumento de 10X) e discriminadas de acordo a predominância de tipos celulares. Amostras com predominância de leucócitos, células nucleadas e células cornificadas foram classificadas como as fases de diestro, proestro e estro respectivamente. O acompanhamento do ciclo estral através do esfregaço vaginal das ratas iniciou-se aos 2 meses de idade e ocorreu por pelo menos 3 semanas. Nesta idade, a média \pm EPM do peso das ratas controle, PINX e PINX-mel foi, respectivamente, de $211,6 \pm 6,95$ g, $214,2 \pm 3,37$ g e $211,0 \pm 4,50$. Estes valores não diferiram entre si. As ratas dos 3 grupos experimentais foram eutanásias por decapitação em guilhotina na fase do proestro. Após a eutanásia, o sangue foi coletado para análise de LH e estradiol por ELISA, e os ovários foram obtidos para análise morfométrica.

5.6 Procedimento experimental na prole masculina

Um grupo de filhotes machos ($n = 6$) de cada grupo experimental foi eutanasiado por meio de decapitação em guilhotina aos 2 meses de idade para pesagem dos testículos, da vesícula seminal e epidídimo e do cálculo do índice somatogonadal. Além disso, nos testículos foram realizadas análises morfométricas. O sangue foi recolhido para as análises de LH e testosterona pelo método de ELISA.

5.6.1 Análise morfométrica dos testículos

O volume líquido dos testículos foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o valor relativo ao peso da túnica albugínea, que em ratos equivale a 6,5% da massa testicular. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; Lara et al 2018), o volume do testículo foi expresso em peso líquido do testículo. A partir do peso total dos testículos também calculou-se o índice gonadossomático (IGS) $[(\text{massa total dos testículos} / \text{massa corporal} \times 100)]$. Posteriormente, as gônadas foram fixadas por imersão em glutaraldeído 4% v/v em tampão fosfato 0,05M e também em paraformaldeído (PFA) 4% v/v, por 24 horas à 4 oC. Após desidratação

em sequência crescente de álcoois, os órgãos fixados em glutaraldeído foram incluídos em resina glicol metacrilato, sendo obtidas secções de 4 μm de espessura, coradas com azul de toluidina 1% borato de sódio e destinadas aos estudos histomorfométricos. Os testículos fixados em PFA, após desidratação e diafanização, foram incluídos em Paraplast® dos quais foram obtidas secções com 5 μm . As lâminas foram montadas com Entellan (Merck) e analisadas ao microscópio óptico Olympus BX60.

5.6.2 Parâmetros morfométricos das células de Leydig

Nas secções obtidas dos testículos foram realizadas as análises dos parâmetros das células de Leydig. O cálculo do volume individual das células de Leydig foi realizado empregando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma. Posteriormente, o diâmetro nuclear médio destas células foi obtido com o auxílio de ocular micrométrica (10x) acoplada à objetiva de 100x, o que resultou em aumento final de 1000x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, sendo escolhidos aqueles com contorno mais arredondado possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir dos dados obtidos e aplicando-se as fórmulas descritas a seguir, foram calculados o volume nuclear, o volume citoplasmático e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

$$V_{nuclear} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

onde, $V_{nuclear}$ = volume nuclear

R = raio nuclear (diâmetro nuclear/2)

π = 3,1416

$$V_{citoplasmático} = \frac{\%cit. \times Vn}{\%nuc}$$

onde, $V_{citoplasmático}$ = volume citoplasmático

$\%cit$ = porcentagem de citoplasma

Vn = volume nuclear

$\%nuc$ = porcentagem de núcleo

$$V_{celular} = Vn + V_{cit}$$

onde, $V_{celular}$ = volume celular

Vn = volume nuclear

V_{cit} = volume citoplasmático

Conhecendo-se o volume das células de Leydig e a proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, o volume total (mL) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo de cada animal.

5.6.3 Dosagem de LH

As concentrações plasmáticas de LH foram avaliadas pelo método de ELISA desenvolvido no laboratório do Prof. Raphael Escorsim Szawka. Resumidamente, utilizou-se uma placa de 96 poços (microplaca 9018, Corning; St. Louis, MI, EUA), as quais foi realizada a pré-adsorção com o 50 μ L de anticorpo de captura em PBS 0,01M e incubado overnight a 4 oC (1:500 LH: anti- bovine LH β monoclonal, 518B7, UC Davis). A seguir, os poços foram incubados com 200 μ L de solução de bloqueio (leite em pó 5% em PBS-T) por um período de 120 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados cinco vezes a cada três minutos com PBS-T. As placas foram então incubadas com 50 μ L de amostras e curva padrão de LH. A curvas padrão foi feita a partir de diluições seriadas do padrão de LH (RP-3, AFP718B, NIDDK-NHPP), com o primeiro ponto da curva igual a 5 ng/mL e o ultimo igual a 0,010 ng/mL. Após 24 h de incubação em temperatura ambiente, os poços foram incubados com 50 uL dos anticorpos de

detecção por 24 h a 40°C (LH: rabbit anti-rat LH, AFP240580Rb, NIDDK-NHPP, 1:40.000). Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 50 µL do anticorpo secundário (horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG, P044801-2, Dako Pathology Solutions, 1: 2.000) diluído em 50% PBS-T e 50% de solução de bloqueio durante 90 minutos. Por fim, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de solução de orto-fenileno-diamina (o-Phenylenediamine- OPD, SigmaAldrich, P1526/Ref. 615-28-1) na concentração de 2 mg/mL diluído em tampão citrato (0,02% de peróxido de hidrogênio, pH: 5,0) durante 45 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido clorídrico (3 mol/L). A leitura óptica foi realizada com leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, EUA), em comprimento de onda de 490 nm. O comprimento de 650 nm foi utilizado para correção do background. As concentrações de LH nas amostras foram definidas a partir da interpolação com os valores de densidade óptica obtida da curva padrão de LH por regressão não-linear.

5.6.4 Dosagem de Testosterona

A dosagem de testosterona foi realizada no sangue obtido da prole masculina aos 2 meses de idade pelo Kit comercial de ELISA (DRG – International, EIA1559). Todas as amostras foram dosadas numa mesma placa. A leitura óptica foi realizada com leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, EUA), em comprimento de onda de 450 nm e 650 nm. O comprimento de 650 nm foi utilizado para correção de background. As concentrações de testosterona nas amostras foram definidas a partir da interpolação com os valores de densidade óptica obtida da curva padrão (menor valor do padrão: 0,2 ng/mL e maior valor 16,0 ng/mL) por regressão não-linear. Amostras de ratos castrados tratados ou não com di-hidrotestosterona (DHT) e de ratos castrados tratados com testosterona foram incluídas no ensaio como controles para valores baixos e altos de testosterona, respectivamente. Os valores encontrados nestes controles foram 0,20 ng/mL, 0,35 ng/mL, 4,97 ng/mL, respectivamente.

6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos foram testados quanto a normalidade e homoscedasticidade utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Fisher, respectivamente. As médias das variáveis foram comparadas por ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey ou por ANOVA de duas vias seguida por teste de Sidak, conforme apropriado. O tratamento estatístico aplicado aos dados foi feito pelo programa GraphPad Prism 8.0. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ e os valores representados como média \pm erro padrão da média, com exceção dos resultados obtidos de LH. Os resultados das concentrações plasmáticas de LH foram apresentados como medianas num gráfico tipo violino, onde a densidade (ou frequência dos dados) dos valores obtidos pôde ser apreciada.

6.1 Resultados e Discussões

Não foram observadas variações no peso corporal das ratas durante o experimento (Figura 4A). A ocorrência de partos pela manhã foi semelhante entre os grupos controle e PINX. Partos no período da tarde foram observados somente no grupo PINX-MEL (Figura 4B). Uma semana após o parto, foi realizada a sexagem dos animais e procedeu-se à padronização das ninhadas para oito filhotes por mãe, sendo 4 machos e 4 fêmeas. O número de filhotes encontrados depois do parto não diferiu entre os grupos (Figura 5A), nem tão pouco o peso da ninhada total (Figura 5B) e o peso na ninhada normalizada por 8 filhotes (Figura 5C).

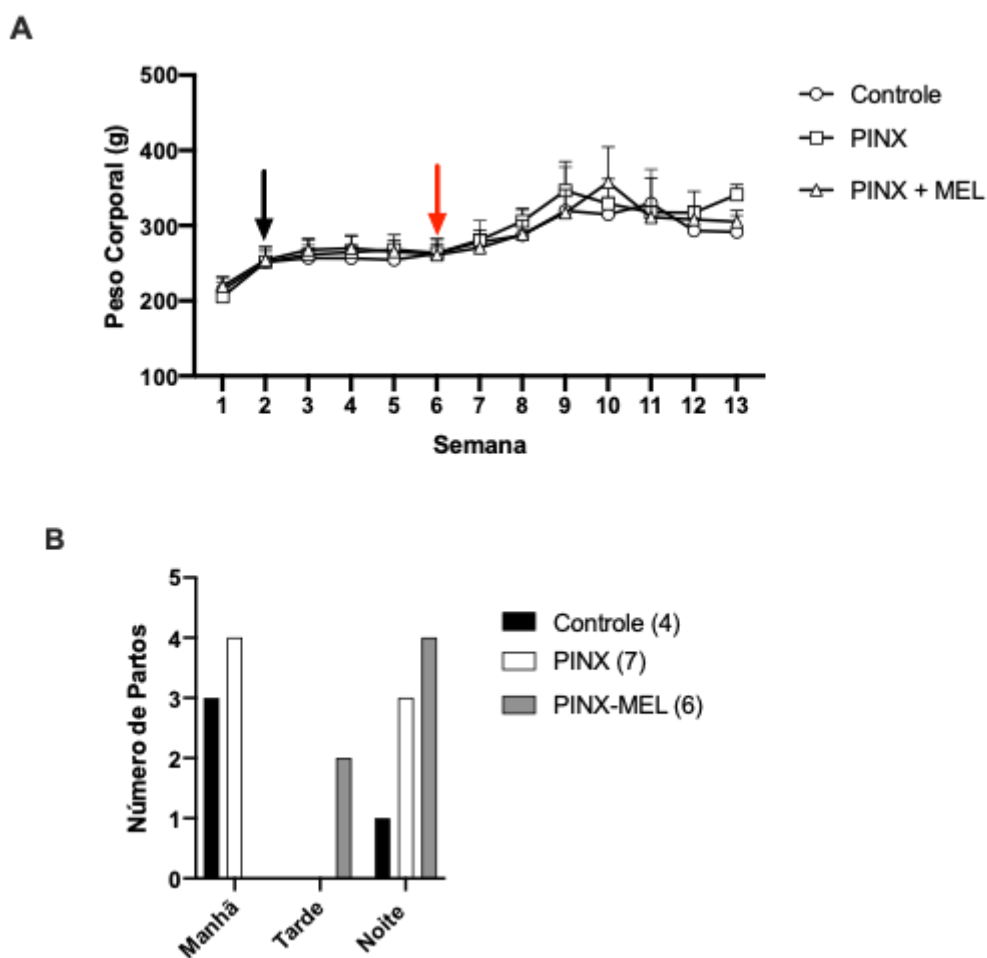


Figura 4 – Acompanhamento do peso corporal das mães controle, das mães submetidas à remoção da pineal (PINX) e das mães submetidas à remoção da pineal com reposição de melatonina (PINX + MEL). (Painel A) A seta vermelha indica o início dos acasalamentos. (Painel B) Número de partos por período do dia.

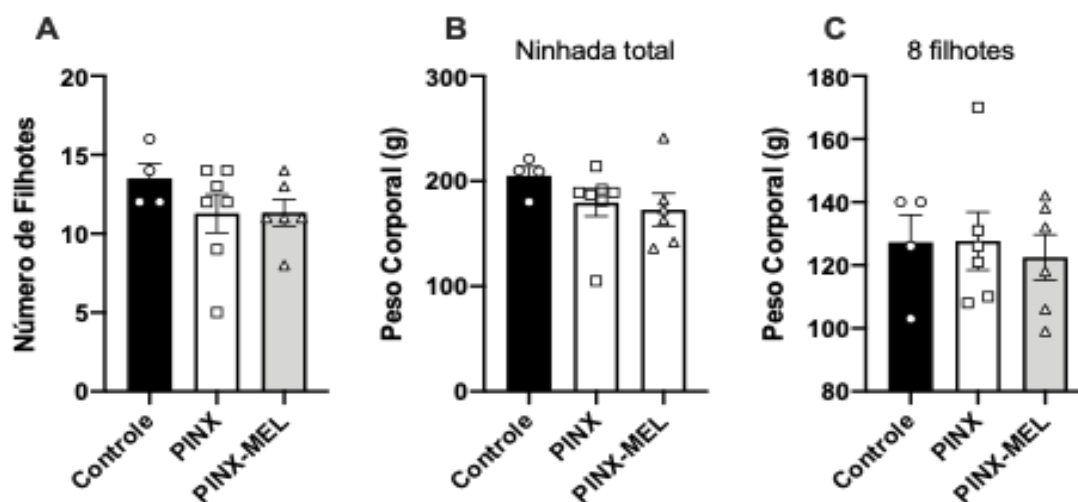


Figura 5 – Número de filhotes contados após o parto (painel A) e peso da ninhada com todos os filhotes (painel B). Peso da ninhada após normalização por 8 filhotes (painel C).

A análise da frequência de proestro, estro e diestro em cada grupo revelou que nos animais do grupo controle foi observada a ocorrência das fases proestro e estro foi de aproximadamente 25% das amostras, enquanto a frequência de diestro foi de aproximadamente o dobro. Este resultado indica que, neste grupo, há regularidade do ciclo estral, uma vez que o ciclo de roedores é marcado por 2 dias de esfregaço vaginal com presença de leucócitos, caracterizando a fase de diestro (Smith et al 1975). Já nos grupos PINX e PINX-MEL, observou-se uma menor frequência de proestro quando comparada ao grupo controle (Figura 6A). Além disso, o grupo PINX mostrou uma frequência maior de estro e uma menor frequência de diestro em relação ao grupo controle (Figura 6A). Estes resultados indicam falta de regularidade no ciclo estral tanto no grupo PINX quanto no grupo PINX-MEL. Não foram detectadas diferenças nas concentrações plasmáticas de LH entre os grupos controle, PINX e PINX-MEL (Figura 6B). Apesar disso, foi observado uma maior dispersão nos resultados de LH nos grupos PINX e PINX-Mel. A variação em torno da média dos valores de LH apresentado pelos grupos controle, PINX e PINX-Mel foi, respectivamente, de 19,22 %, 60,38 %, 77,09 %. Sabe-se que, o pico pré-ovulatório de LH ocorre numa janela temporal governada pelo ciclo circadiano (de la Iglesias and Schwartz, 2006). No proestro, os valores de pico para este hormônio ocorrem cerca de 1 a 2 horas antes do início da fase escura (Poletini et al 2003, Christian and Moenter 2010). Desde que, as coletas de sangue no presente estudo ocorreram entre às 17:00 e 17:30 h do dia do proestro. Aventamos a possibilidade de que as ratas que apresentaram valores de LH muito abaixo em relação aos valores observados nas ratas controle, apresentaram valores de pico em outros horários. Alternativamente, estas ratas podem não ter apresentado um pico de LH. Por outro lado, se excluirmos os valores de LH abaixo dos valores do controle, as concentrações plasmáticas de LH ficam mais elevadas nos grupos PINX e PINX-MEL e vice-versa (Figura 6B). A determinação das concentrações de LH plasmática ao longo da tarde do proestro por meio de coleta seriada pode esclarecer esta questão. De forma interessante, o peso uterino das ratas PINX e PINX-MEL foi menor do que o controle (Figura 6C). Juntos, estes resultados sugerem um comprometimento no desenvolvimento do eixo gonadal de ratas nascidas de mães PINX, o que pode ser a causa das alterações funcionais observada no presente estudo. Além disso, os resultados mostraram que a reposição com melatonina não foi capaz de reestabelecer as alterações induzidas pela PINX materna sobre a prole feminina adulta.

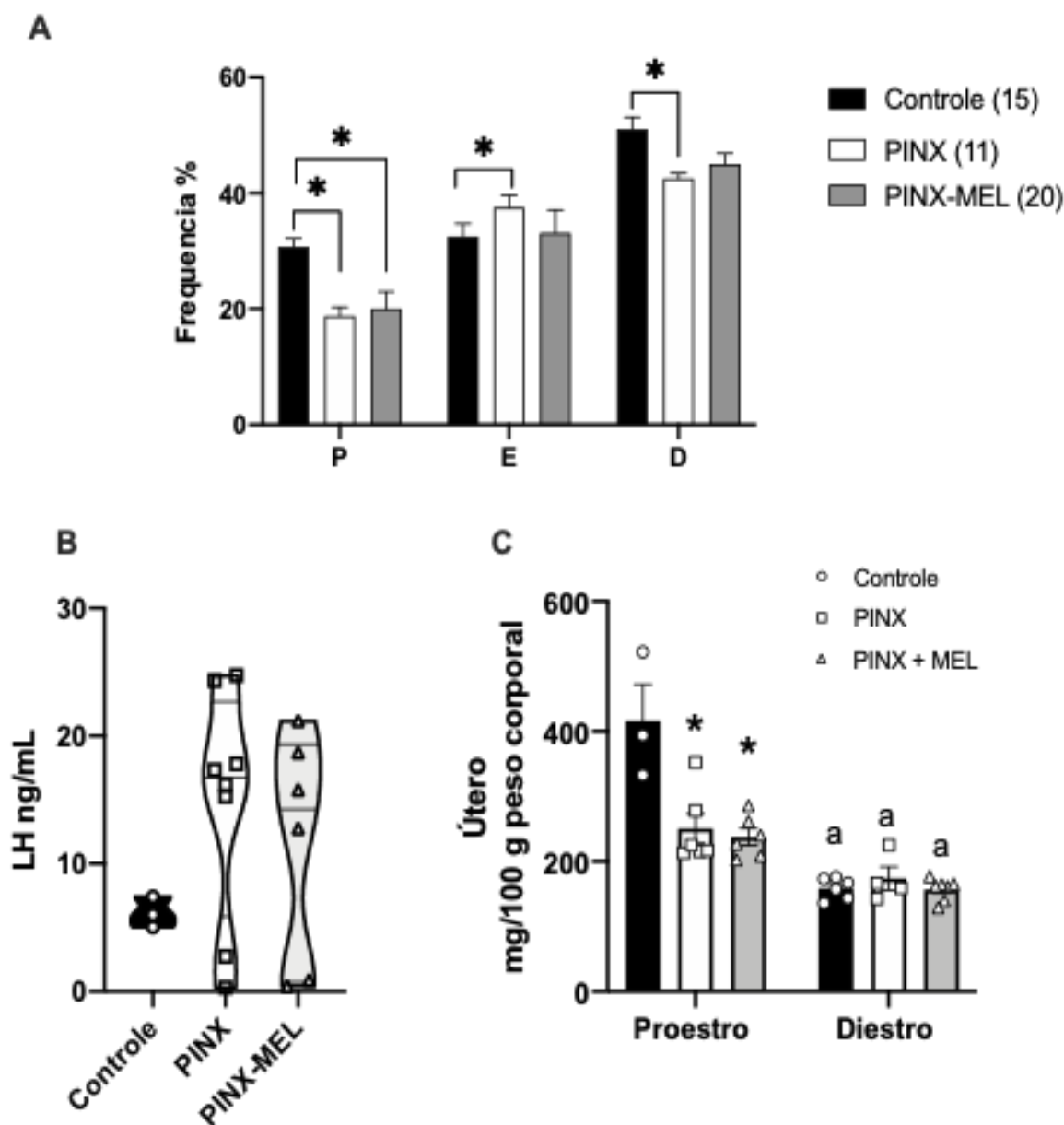


Figura 6 – Porcentagem do número de esfregaços vaginais característicos das fases de proestro (P), estro (E) e diestro (D) em relação ao número total de dias observados nos grupos controle, pinealectomizadas (PINX) e PINX tratadas com melatonina (MEL) durante a gestação e lactação (Painel A). Mediana das concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH) de ratas em proestro eutanasiadas entre 17:00 e 18:00 h (Painel B), com representação em sino para facilitar a visualização da dispersão dos resultados. Peso uterino (mg/100 g de peso corporal) nos grupos experimentais durante as fases de proestro e diestro (Painel C). * $p < 0,05$, Two-Way ANOVA seguida do teste de Sidak para comparações entre grupos experimentais (Controle \times PINX \times PINX+MEL). Letras diferentes indicam diferença estatística em comparações entre fases do ciclo estral (proestro \times diestro) dentro de um mesmo grupo experimental, analisadas por teste t pareado ou One-Way ANOVA seguida do teste de Sidak, conforme apropriado.

O peso líquido dos testículos, da vesícula seminal, do epidídimo assim como o IGS não diferiu entre os grupos experimentais conforme mostrado nos gráficos da Figura 7.

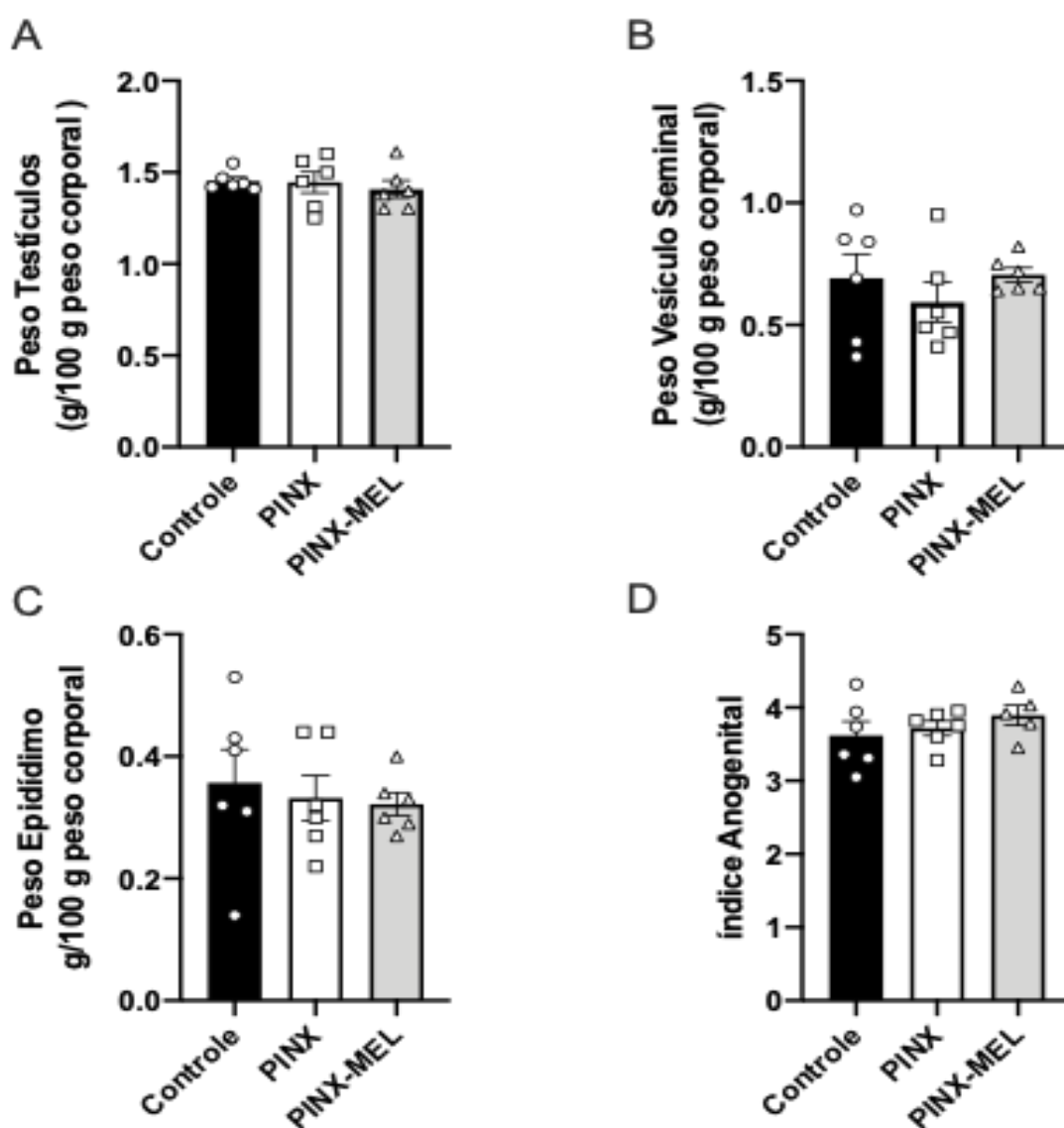


Figura 7 – Peso dos órgãos reprodutores e índice anogenital de filhotes de mães dos grupos controle, pinealectomizadas (PINX) e PINX tratados com melatonina (MEL) durante a gestação e a lactação. Não houve diferença entre os parâmetros apresentados. One-Way Anova seguida por teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar deste resultado, a análise morfométrica dos testículos mostrou um aumento no volume celular e citoplasmático das células de Leydig (Figura 8A e 8B) na prole PINX. A reposição com melatonina reverteu este aumento (Figura 8A e 8B). Além disso, os filhotes de mães PINX mostrou uma redução no número de células de Leydig tanto por testículo como por grama de testículo (Figura 8C e 8D). A reposição com melatonina parcialmente reverteu este fenótipo, uma vez que estes números foram maiores nos filhotes de PINX-MEL comparado aos filhotes de PINX, mas ainda sim, menores do que aos do controle (Figura 8C e 8D).

As alterações morfológicas observadas nos testículos podem refletir as diferenças nas concentrações plasmáticas de LH encontradas entre os grupos. Filhotes de PINX e PINX-MEL mostraram menores concentrações de LH quando comparados aos filhotes de mães controles (Figura 8E).

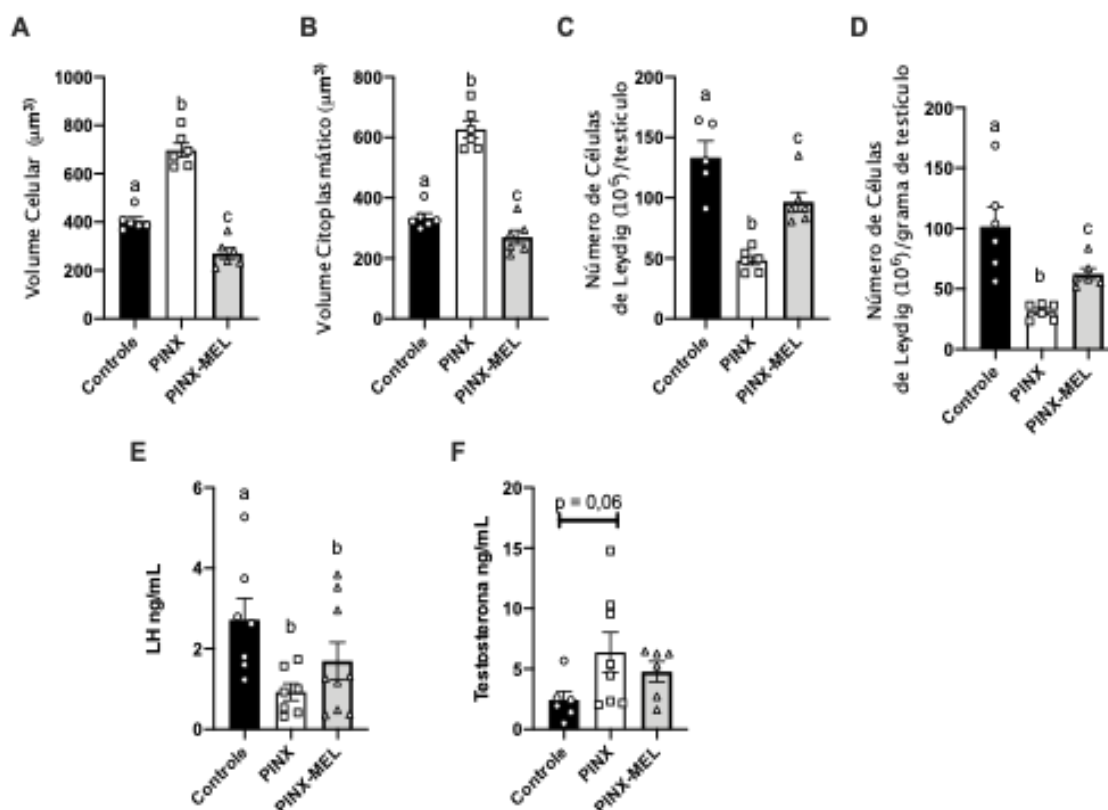


Figura 8 – Volume celular, citoplasmático, número das células de Leydig de filhotes de mães dos grupos controle, pinealectomizadas (PINX) e PINX tratados com melatonina (MEL) durante a gestação e a lactação (A-D). Concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH) e de testosterona avaliadas nos mesmos filhotes (E-F). Letras diferentes mostram diferenças entre grupos. One-Way Anova seguida por teste de Tukey ($p < 0,05$).

De forma congruente às baixas concentrações de LH no grupo PINX, observamos um número reduzido de células de Leydig. Dados da literatura mostram que o tratamento crônico (por 2 semanas) com LH aumenta o número de células de Leydig em ratos adultos, e que ao contrário, a deprivação de LH pode levar a uma redução do número de células de Leydig (Mendis-Handagama et al 1998). Além disso, o LH é responsável pela manutenção da ultraestrutura destas células. Por exemplo, já foi demonstrado que tratamento com LH aumenta o número de retículo endoplasmático liso (REL) (Wing et al 1984). A manutenção da ultraestrutura das células de Leydig pode ser importante para garantir a homeostase testicular e manter uma produção hormonal adequada. O LH é responsável por aumentar a produção e

liberação de testosterona pelas células de Leydig, agindo em enzimas chaves da esteroidogênese (Dym et al 1977; Ewing et al 1983). Neste sentido, é contra intuitivo os valores de testosterona encontrado na prole PINX, os quais parecem estar maiores do que os valores encontrados nos animais controle ($p = 0,06$) (Figura 8F). Dessa forma, aventamos que a PINX pode ter promovido alterações durante o desenvolvimento, afetando as vias da esteroidogênese testicular, levando a possíveis alterações nas concentrações de hormônios esteróides na vida adulta. Estes hormônios por sua vez poderiam explicar os valores de LH encontrados nas ratas do grupo PINX, uma vez que, por meio de retroalimentação negativa, a testosterona inibe a liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e de LH hipofisário (Moenter et al 2020). Os valores de LH na prole PINX-Mel não foi observada diferença se comparada aos outros grupos, enquanto que na testosterona do grupo PINX-Mel foi observada diferença quando comparada as proles dos grupos controle, mas não do grupo PINX (Figura 8E e 8F). A reorganização nas células de Leydig pode ser decorrente de alterações induzidas pela PINX materna durante o desenvolvimento, o que levou a um número reduzido destas células nos adultos, os quais de forma compensatória passam a secretar mais testosterona. Esta relação invertida entre número de células e volume celular já foi previamente descrita em outros modelos experimentais (Oliveira et al 2020 a,b). O aumento de volume celular e citoplasmático (hipertrofia) observado na prole PINX reforça um efeito compensador entre número de células e um possível aumento da testosterona. Isto porque o citoplasma celular tem importante relação com a síntese de esteroides, uma vez que é onde reside o REL, organela responsável pelas etapas finais da esteroidogênese testicular (Zirkin e Papadopoulos, 2018). Assim, a hipertrofia (aumento de volume) pode refletir um aumento de REL favorecendo a esteroidogênese. Faz se necessário avaliar as enzimas da esteroidogênese para se testar essas possibilidades. Uma outra possibilidade seria a de que na prole PINX tenha ocorrido alterações durante o desenvolvimento no eixo hipotálamo-hipófise levando a uma baixa capacidade secretória de LH na fase adulta, como observado no presente estudo. Sabe-se que existem duas grandes populações de células de Leydig nos testículos, as células fetais e as células adultas. De forma interessante, as principais diferenças entre estas populações celulares reside na velocidade de diferenciação destas células e na responsividade ao LH. As fetais se diferenciam de forma rápida e independente do LH hipofisário (principalmente durante a fase fetal), enquanto que, as adultas se

diferenciam de forma lenta e dependente do LH hipofisário (Zirkin and Papadopoulos 2018). Em ratos, o pool de células de Leydig observadas na fase adulta é composto majoritariamente por células adultas e pouquíssimas células fetais (Kerr and Knell 1988). Importante, apesar de possivelmente compartilharem a mesma célula progenitora (Barsoum et al 2013), as células adultas não derivam das células fetais (Habert et al 2001; Shima et al 2012). As células adultas derivam de uma célula progenitora do interstício testicular que não tem capacidade esteroidogênica e expressa receptores para LH (Ge et al 2006). Dessa forma, o reduzido número de células de Leydig pode refletir as baixas concentrações de LH observadas nos filhotes PINX, em função de um menor recrutamento das células progenitoras.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, a presente dissertação de mestrado abordou o impacto da privação uterina e na lactação (PINX) de melatonina e da reposição com melatonina sobre o desenvolvimento do eixo gonadal em ratas. Os resultados obtidos indicam que a PINX materna afetou a regularidade do ciclo estral na prole feminina adulta, com uma diminuição na frequência de proestro e aumento na de estro. Além disso, a PINX resultou em alterações morfológicas nos testículos da prole masculina, incluindo um aumento no volume celular e citoplasmático das células de Leydig, juntamente com uma redução no número dessas células por testículo. A reposição com melatonina reverteu parcialmente as alterações observadas.

As evidências sugerem que a PINX pode ter induzido alterações durante o desenvolvimento, afetando o eixo hipotálamo-hipófise e/ou as vias da esteroidogênese testicular, resultando em redução nas concentrações de LH e em mudanças na morfologia das células de Leydig. O possível aumento compensatório da testosterona pode estar relacionado ao processo de hipertrofia das células de Leydig. No entanto, é necessário realizar estudos adicionais para investigar as enzimas envolvidas na esteroidogênese e a regulação do eixo hipotálamo-hipófise.

Essas descobertas são de grande relevância para a compreensão dos efeitos da PINX materna sobre a prole e podem fornecer insights sobre possíveis disfunções reprodutivas e hormonais na vida adulta decorrentes de cronorruptura materna. Além disso, os resultados destacam o papel complexo e multifatorial da melatonina na modulação do desenvolvimento gonadal e sugerem a necessidade de pesquisas futuras para aprofundar nossa compreensão sobre os mecanismos envolvidos nas respostas hormonais e morfológicas observadas. A compreensão desses processos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas potenciais para o tratamento de disfunções reprodutivas e hormonais relacionadas ao eixo gonadal.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* , v. 74, p. 246–260, 2012.
- AMARAL, F. G. D.; CIPOLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab* , v. 62, n. 4, p. 472-479, 2018.
- ATTANASIO, A.; RAGER, K.; GUPTA, D. Ontogeny of Circadian Rhythmicity for Melatonin, Serotonin, and N - Acetylserotonin in Humans. *J. Pineal Res.* , v. 1, n. 3, p. 251–259, 1986.
- BARSOUM, I. B. et al. Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *FASEB J* , v. 27, n. 7, p. 2657–2666, 2013.
- BERSON, D. M.; DUNN, F. A.; TAKAO, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* , v. 295, n. 5557, p. 1070–1073, 2002.
- BUBÉNIK, G. A. et al. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Neurosignals* , v. 7, n. 4, p. 195-219, 1998.
- BUHR, E. D.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol* , p. 3–27, 2013.
- BUIJS, R. M. et al. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* , v. 11, n. 5, p. 1535–1544, 1999.
- BUIJS, R. M.; VAN EDEN, C. G.; GONCHARUK, V. D.; KALSBECK, A. The biological clock tunes the organs of the body: Timing by hormones and the autonomic nervous system. *Journal of Endocrinology* , 2003.
- CAMATS-TARRUELLA, N.; FERNÁNDEZ-CANCIO, M.; AUDI, L. Clinical implications of the molecular heterogeneity of 46,XY disorders of sex development. *Int J Mol Sci.* , v. 19, n. 10, p. 3037, 2018.
- CHRISTIAN, C. A.; MOENTER, S. M. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev.* , v. 31, n. 4, p. 544-577, 2010.
- CHUNG, K. et al. Evaluating the role of exogenous luteinizing hormone in poor responders undergoing in vitro fertilization with gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril* , v. 84, n. 2, p. 313–318, 2005.
- CLAUSTRA, B.; LESTON, J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* , v. 61, n. 2-3, p. 77-84, 2015.
- CLARKSON, J. et al. Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , v. 114, n. 23, p. 6112-6117, 2017.
- CLARKSON, J. et al. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* , v. 28, n. 34, p. 8691–8697, 2008.
- DE LA IGLESIA, H. O.; SCHWARTZ, W. J. Minireview: Timely ovulation: Circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* , 2006.
- DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003.

- DE TOLEDO, L. H. S. et al. Modeling the influence of nighttime light on melatonin suppression in humans: Milestones and perspectives. *Journal of Photochemistry and Photobiology* , v. 16, p. 100199, 2023.
- DHILLO, W. S. et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* , v. 90, n. 12, p. 6687–6691, 2005.
- DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu. Rev. Physiol.* , v. 72, p. 517–549, 2010.
- DYM, M.; RAJ, H. G. M. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol Reprod* , v. 17, n. 5, p. 676–698, 1977.
- EWING, L. L.; ZIRKIN, B. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res* , v. 39, p. 599–631, 1983.
- EVERETT, J. W.; SAWYER, C. H. A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* , v. 47, n. 3, p. 198–218, 1950.
- FERNANDEZ, R. C. et al. Fixed or Rotating Night Shift Work Undertaken by Women: Implications for Fertility and Miscarriage. *Semin. Reprod. Med.* , v. 34, n. 5, p. 308–317, 2016.
- FERREIRA, D. S. et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. *PLoS One* , v. 7, n. 6, p. e38795, 2012.
- FOX, S. R. et al. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* , v. 51, n. 3, p. 276–283, 1990.
- GE, R. S. et al. In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , v. 103, n. 8, p. 2719–2724, 2006.
- GLIDEWELL-KENNEY, C. et al. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* , v. 104, n. 20, p. 8173–8177, 2007.
- GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* , v. 90, n. 3, p. 1063–1102, 2010.
- GOTTSCH, M. L. et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* , v. 145, n. 9, p. 4073–4082, 2004.
- HABERT, R. et al. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* , v. 179, n. 1-2, p. 47–74, 2001.
- HAN, S. K. et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* , v. 25, n. 50, p. 11349–11356, 2005.
- HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews* , v. 94, n. 4, p. 1079–1102, 2014.
- HERBISON, A. E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews Endocrinology* , v. 12, n. 8, p. 452–463, 2016.
- HESS, R. A. et al. Morphological changes in the testis of mice from birth to adulthood. *Reproduction* , v. 145, n. 4, p. 463–473, 2013.

- HRABOVŠKY, E. et al. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* , v. 141, n. 9, p. 3506–3509, 2000.
- ILLNEROVÁ, H. et al. Melatonin rhythm in human milk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* , v. 77, n. 3, p. 837–839, 1993.
- IRWIG, M. S. et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* , v. 80, n. 4, p. 264–270, 2004.
- JIMENEZ-JORGE, S. et al. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J Pineal Res.* , v. 42, n. 3, p. 240-246, 2007.
- KEEN, K. L. et al. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* , v. 149, n. 10, p. 5251–5257, 2008.
- KENNAWAY, D. J. et al. Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* , v. 75, n. 2, p. 367–370, 1992.
- KERR, J. B.; KNELL, C. M. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development.* , v. 103, n. 3, p. 535-544, 1988.
- KNUTSSON, A. Health disorders of shift workers. *Occup Med* , v. 53, n. 2, p. 103–108, 2003.
- LABYAK, S. et al. Effects of shiftwork on sleep and menstrual function in nurses. *Heal. Care Women Int.* , v. 23, n. 6-7, p. 703–714, 2002.
- LARA, N. L. M. et al. Testis Physiology—Overview and Histology. In: SKINNER, M. K. (Ed.). *Encyclopedia of Reproduction* . 2. ed. Oxford: Academic Press, 2018. v. 1. p. 105–116.
- LEHMAN, M. N. et al. Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* , v. 151, n. 8, p. 3479–3489, 2010.
- LEVINE, J. E. Chapter 26 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Orgs.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* . San Diego: Academic Press, 2015. p. 1199–1257.
- LIU, Z. et al. Regulation of testicular function by GnRH and activin. *Asian J Androl.* , v. 20, n. 3, p. 272–278, 2018.
- LOHSTROH, P. N. et al. Bone resorption is affected by follicular phase length in female rotating shift workers. *Env. Heal. Perspect.* , v. 111, n. 5, p. 618–622, 2003.
- MAURY, E. et al. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res* , v. 106, n. 3, p. 447–462, 2010.
- MENDIS-HANDAGAMA, S. M. et al. The effect of chronic luteinizing hormone treatment on adult rat Leydig cells. *Tissue Cell* , v. 30, n. 1, p. 64-73, 1998.
- MESSAGER, S. et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , v. 102, n. 5, p. 1761–1766, 2005.
- MOENTER, S. M. et al. Core aspects of systemic estradiol negative and positive feedback in the reproductive neuroendocrine system. *Journal of neuroendocrinology* , v. 32, n. 1, p. e12724, 2020.

- MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* , v. 42, n. 1, p. 201–206, 1972.
- MOTTA-TEIXEIRA, L. C. et al. The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. *Horm. Behav.* , v. 106, p. 129–141, 2018.
- NAVARRO, V. M. et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* , v. 146, n. 4, p. 156–163, 2005.
- OHTA, H. et al. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* , v. 8, n. 2, p. 267–269, 2005.
- OLIVEIRA, C. F. et al. Comparative testis structure and function in three representative mice strains. *Cell Tissue Res.* , v. 382, n. 2, p. 391–404, 2020.
- PARTCH, C. L. et al. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* , v. 24, n. 2, p. 90–99, 2014.
- PILORZ, V. et al. The role of the circadian clock system in physiology. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* , v. 470, n. 2, p. 227–239, 2018.
- PINILLA, L. et al. Kisspeptins and reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* , v. 92, n. 3, p. 1235–1316, 2012.
- POLETINI, M. O. et al. A method to study preovulatory surges of gonadotropins. *Brain Research Protocols* , v. 12, n. 1, p. 41–48, 2003.
- POLETINI, M. O. et al. How Non-photoc Cues for the Circadian Time System Matter in Healthy Aging. In: JAGOTA, A. (ed.) *Sleep and Clocks in Aging and Longevity . Healthy Ageing and Longevity*, v. 18. Springer, Cham, p. 165–181, 2023.
- PROVENCIO, I. et al. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* , v. 415, n. 6871, p. 493, 2002.
- RALPH, M. R. et al. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* , v. 247, n. 4945, p. 959–963, 1990.
- REBOURCET, D. et al. Sertoli Cells Modulate Testicular Vascular Network Development, Structure, and Function to Influence Circulating Testosterone Concentrations in Adult Male Mice. *Endocrinology* , v. 158, n. 6, p. 1669–1683, 2017.
- REID, K. J.; ABBOTT, S. M. Jet lag and shift work disorder. *Sleep Medicine Clinics* , v. 10, n. 3, p. 381–392, 2015.
- SALAZAR, E. R. et al. Gestational chronodisruption leads to persistent changes in the rat fetal and adult adrenal clock and function. *J. Physiol.* , v. 596, n. 14, p. 2883–2900, 2018.
- SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N. Engl. J. Med.* , v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 2003.
- SHAHAB, M. et al. Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , v. 102, n. 6, p. 2129–2134, 2005.
- SHIMA, Y. et al. Identification of an enhancer in the Ad4BP/SF-1 gene specific for fetal Leydig cells. *Endocrinology* , v. 153, n. 1, p. 417–425, 2012.
- SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by

- norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews* , v. 55, n. 2, p. 209–251, 2003.
- SMITH, J. T. et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* , v. 146, n. 7, p. 2998-3006, 2005.
- SMITH, J. T. et al. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neurosci.* , v. 26, n. 33, p. 8652–8660, 2006.
- SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* , v. 146, n. 8, p. 3639-3645, 2005.
- SMITH, M. S. et al. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* , v. 96, n. 1, p. 219–226, 1975.
- SPIGA, F. et al. HPA axis-rhythms. *Compr Physiol* , v. 4, n. 3, p. 1273–1298, 2014.
- SPICHIGER, C. et al. Gestation under chronic constant light leads to extensive gene expression changes in the fetal rat liver. *Physiol. Genomics* , v. 47, n. 7, p. 268–278, 2015.
- STEYN, F. J. et al. Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology* , v. 154, n. 12, p. 4939–4945, 2013.
- SU, Y. et al. The role of feeding rhythm, adrenal hormones and neuronal inputs in synchronizing daily clock gene rhythms in the liver. *Mol Cell Endocrinol* , v. 422, p. 125–131, 2016.
- SUJINO, M. et al. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.* , v. 13, n. 9, p. 770–773, 2003.
- TAKAYAMA, H. et al. Pineal gland (melatonin) affects the parturition time, but not luteal function and fetal growth, in pregnant rats. *Endocrine journal* , v. 50, n. 1, p. 37-43, 2003.
- TAMURA, H. et al. Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology* , v. 25, n. 3, p. 291-303, 2008.
- TECLEMARIAM-MESBAH, R. et al. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus - Pineal pathway. *J. Comp. Neurol.* , v. 406, n. 2, p. 171–183, 1999.
- VARCOE, T. J. Timing is everything: maternal circadian rhythms and the developmental origins of health and disease. *Journal of Physiology* , v. 596, n. 15, p. 3065–3073, 2018.
- VARCOE, T. J. et al. Maternal circadian rhythms and the programming of adult health and disease. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* , v. 314, n. 1, p. R123-R136, 2018.
- WING, T.-Y. et al. Effect of luteinizing hormone withdrawal on Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and steroidogenic reactions which convert pregnenolone to testosterone. *Endocrinology* , v. 115, n. 6, p. 2290–2296, 1984.
- WINTERMANTEL, T. M. et al. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* , v. 52, n. 2, p. 271–280, 2006.
- ZIRKIN, B.; PAPADOPOULOS, V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction* , v. 99, n. 1, p. 101-111, 2018.