

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**IMUNOMARCAÇÃO DE LEPTINA NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS E SUA
RELAÇÃO COM ESTRESSE, OBESIDADE E CICLO ESTRAL**

Doutorado

Millie de Oliveira Marchiori

Porto Alegre
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**IMUNOMARCAÇÃO DE LEPTINA NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS E SUA
RELAÇÃO COM ESTRESSE, OBESIDADE E CICLO ESTRAL**

Autora: Millie de Oliveira Marchiori

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação da Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner.

Porto Alegre, abril de 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Marchiori, Millie de Oliveira
IMUNOMARCAÇÃO DE LEPTINA NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS E
SUA RELAÇÃO COM ESTRESSE, OBESIDADE E CICLO ESTRAL /
Millie de Oliveira Marchiori. -- 2018.
86 f.
Orientadora: Dra Sandra Fiala Rechsteiner.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Profa Dra Beatriz Riet-Correa Rivero . 2.
Profa Dra Anelise Hammes Pimentel . 3. Profa Dra
Adriana Pires Neves . I. Rechsteiner, Dra Sandra
Fiala, orient. II. Título.

MILLIE DE OLIVEIRA MARCHIORI

**IMUNOMARCAÇÃO DE LEPTINA NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS E SUA
RELAÇÃO COM ESTRESSE, OBESIDADE E CICLO ESTRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação da Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner.

APROVADO POR:

Profa Dra Sandra Fiala Rechsteiner - UFPEL
Orientadora e Presidente da comissão

Profa Dra Beatriz Riet-Correa Rivero - UFRGS
Membro da Comissão

Profa Dra Anelise Hammes Pimentel - UFPEL
Membro da Comissão

Profa Dra Adriana Pires Neves - UNIPAMPA
Membro da Comissão

AGRADECIMENTO

À Deus, por ter colocado na minha vida pessoas essenciais para meu amadurecimento, crescimento pessoal e profissional, por ter me dado força para ultrapassar cada obstáculo que surgiu durante minha trajetória.

À minha família, por me ensinarem diariamente, através de exemplos, a ser uma pessoa melhor, por acreditarem em mim e na consistência dos meus sonhos.

Ao meu filho, João Francisco e meu marido, companheiro, amigo e confidente, Rodrigo Souza Ferreira, que em inúmeros momentos entenderam e compreenderam pacientemente a minha ausência.

À minha grande amiga, Lorena Amaral, pelo incentivo diário e inúmeras demonstrações de amizade.

À Dra Fabiana Moreira, por transmitir gentilmente um pouco do seu vasto conhecimento na área de imuno-histoquímica.

Aos responsáveis pelo laboratório Repropel, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), pelo empréstimo de materiais e pela cedência do local, para realização de parte do meu trabalho.

Ao Luis Augusto, Luis Otávio e toda equipe do laboratório de Histologia da UFPEL, por me ensinarem e auxiliarem no preparo das lâminas histológicas.

As minhas amigas e colegas Fernanda Pazinato, Camila Wendt e Bruna Suñe, por terem me ajudado, cada uma a sua maneira, na execução e realização do projeto.

À minha Orientadora, Dra Sandra Fiala Rechsteiner, pela oportunidade, paciência e por todo conhecimento transmitido ao longo desses quatro anos.

Ao Sr Alfredo Tavares, pelo empréstimo dos animais e confiança no meu trabalho.

À CAPES, pelo incentivo financeiro a pesquisa.

“You never know how far you can run unless you run”
Penny Chenery - Secretariat

RESUMO

Imunomarcção de leptina no endométrio de éguas e sua relação com estresse, obesidade e ciclo estral

Autora: Millie de Oliveira Marchiori

Orientadora: Sandra Fiala Rechsteiner

A leptina é um hormônio peptídico multifuncional, produzido principalmente pelo tecido adiposo, possuindo receptores (Ob-Rs) nos órgãos reprodutivos, hipotálamo e hipófise. Os glicocorticóides, como o cortisol, também influenciam diretamente a produção de leptina. A importância desses dois hormônios na atividade reprodutiva tem sido descrita por diversos autores, que observaram envolvimento de ambos, na melhoria dos índices reprodutivos, seja por sua influência direta no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, na maturação dos oócitos ou na preparação uterina para receber o conceito. No entanto, quando em excesso na circulação, podem influenciar negativamente o sistema reprodutivo. Marcadores como a leptina e seu receptor funcional de cadeia longa, estão sendo estudados no endométrio de espécies como humanos, bovinos e suínos, apresentando resultados que correlacionam a diminuição destes, com a infertilidade ou perda embrionária, porém até o momento não foi possível encontrar estudos que abordassem esse tema em equinos. Neste estudo foram avaliados: 1) a presença de leptina (Ob) e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio de éguas, observando a influência da obesidade e do ciclo estral nesses marcadores e 2) em uma condição de manejo adverso e estressante, a influência do cortisol intrafolicular, nos níveis de leptina no fluido folicular (FF) e nos marcadores de Ob e Ob-Rb no endométrio durante as fases do ciclo estral. Os resultados demonstraram que existe a presença da leptina e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio de equinos, com imunomarcção no epitélio luminal e glandular em todas as fases do ciclo estral avaliadas, apresentando, no entanto, uma marcação imunológica mais intensa nos Ob-Rb (142.68 ± 4.97 , $P < 0,0001$) no epitélio glandular durante o diestro em éguas de escore corporal moderado. Não foi possível observar a influência do aumento do cortisol intrafolicular (FF) nas variáveis avaliadas, pois o cortisol se manteve dentro dos valores fisiológicos para a espécie, no entanto pode-se verificar uma correlação positiva entre os níveis intrafoliculares de cortisol e leptina, estando o cortisol aumentado

(30.1 ± 0.07 ng/ml, $P < 0,05$) nos folículos mais próximos a ovulação. Pode-se perceber também, que a marcação imunológica do receptor de leptina no epitélio glandular foi mais intensa (144.52 ± 3.17 , $P < 0,0001$) nos animais que apresentavam folículos até 22 mm, estando a imunomarcção de ambos Ob e Ob-Rb correlacionado de forma negativa ($r: -0.7836$; $P < 0.0001$, $r: -0.7343$; $P < 0.0001$), com os níveis de cortisol no FF.

Palavras-chave: Leptina, cortisol, imuno-histoquímica, obesidade, estresse

ABSTRACT

Leptin immunostaining in the endometrium of mares and its relation with stress, obesity and estrous cycle

Author: Millie de Oliveira Marchiori

Adviser: Sandra Fiala Rechsteiner

Leptin is a multifunctional peptidic hormone, mainly produced by adipose tissue, having receptors (Ob-Rs) in the reproductive organs, hypothalamus and pituitary. Glucocorticoids, such as cortisol, also directly influence leptin production. The importance of these two hormones in reproductive activity has been described by several authors, who observed the involvement of both, in the improvement of reproductive indices, either by their direct influence on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, oocyte maturation or the uterine preparation to receive the concept. However, when in excess in circulation, they can negatively influence the reproductive system. Markers such as leptin and its long-chain functional receptor are being studied in the endometrium of species such as humans, cattle and pigs, presenting results that correlate the decrease of these with infertility or embryonic loss, but to date it has not been possible to find studies to address this issue in horses. In this study we evaluated: 1) the presence of leptin (Ob) and its receptor (Ob-Rb) in the endometrium of mares, observing the influence of obesity and estrous cycle on these markers and 2) in an adverse and stressful management condition, the influence of intrafollicular cortisol, leptin levels in the follicular fluid (FF), and the Ob and Ob-Rb markers in the endometrium during the estrous cycle phases. The results showed that leptin and its receptor (Ob-Rb) are present in the equine endometrium, with immunostaining in the luminal and glandular epithelium in all stages of the estrous cycle evaluated, however, showing a more intense immunological labeling in Ob -Rb (142.68 ± 4.97 , $P < 0.0001$) in the glandular epithelium during the diestrous in mares of moderate body score. It was not possible to observe the influence of intrafollicular cortisol (FF) on the variables evaluated, because cortisol remained within the physiological values for the species, however a positive correlation can be observed between intrafollicular cortisol and leptin levels, being the

cortisol increased (30.1 ± 0.07 ng/ml, $P < 0.05$) in the follicles closest to ovulation. It can also be noticed that the immunological labeling of the leptin receptor in the glandular epithelium was more intense (144.52 ± 3.17 , $P < 0.0001$) in the animals that presented follicles up to 22 mm, and the immunostaining of both Ob and Ob-Rb correlated negatively ($r: -0.7836$; $P < 0.0001$, $r: -0.7343$; $P < 0.0001$), with cortisol levels in FF.

Key Words: Leptin, cortisol, immunohistochemistry, obesity, stress

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática dos efeitos da leptina no eixo hipotalâmico-hipofisiário..... 23

Artigo 1. Imunomarcção de leptina e seu receptor no endométrio de éguas com diferentes escores corporais durante o ciclo estral

FIGURA 1. Micrografia de 40x do endométrio, demonstrando a imunomarcção de Ob-Rb no epitélio luminal e glândulas endometriais. EL: Epitélio Luminal e EG: Epitélio Glandular... 41

Artigo 2. Efeito do estresse social no perfil bioquímico folicular e marcadores endometriais

FIGURA 1 . Imunomarcção de Ob e Ob-Rb no epitélio glandular do endométrio de éguas. A) Marcação imunológica de Ob no epitélio glandular, durante o período pré-ovulatório (G3), B) Marcação imunológica de Ob-Rb no epitélio glandular, durante o período pré-ovulatório (G3) C) Controle negativo, ausência de imunomarcção no epitélio glandular endometrial. (Fotomicrografia de 40X)..... 59

LISTA DE TABELAS

Artigo 1. Imunomarcção de leptina e seu receptor no endométrio de éguas com diferentes escores corporais durante o ciclo estral

TABELA 1. Valores médios (\pm erro padrão da média) das modas das variáveis das imunomarcações nas glândulas endometriais de leptina e do receptor de leptina..... 42

TABELA 2. Valores médios (\pm erro padrão da média) das modas das variáveis imunomarcações do epitélio luminal de leptina e do seu receptor funcional..... 42

TABELA 3. Valores médios (\pm erro padrão da média) das variáveis peso corporal, espessura de gordura na base da cauda, espessura da crista do pescoço, triglicérides e leptina..... 43

Artigo 2. Efeito do estresse social no perfil bioquímico folicular e marcadores endometriais

TABELA 1. Valores médios (\pm erro padrão da média) das modas das imunomarcações* glandulares de leptina (Ob) e do receptor de leptina (Ob-Rb) no endométrio. 58

TABELA 2. Valores médios (\pm erro padrão da média) dos níveis de Leptina (ng/ml) e Cortisol (ng/ml) no fluido folicular. 59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AVP	Arginina Vasopressina
CBG	Globulina ligadora do cortisol
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CV	Coefficiente de Variação
DEX	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Escore Corporal
ECP	Espessura da Crista do Pescoço
EGBC	Espessura de Gordura na Base da Cauda
FF	Fluido Folicular
FSH	Hormônio Foliculo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GrN	Grupo de éguas com escore corporal Moderado
GrND	Grupo de éguas com escore corporal Moderado no Diestro
GrNE	Grupo de éguas com escore corporal Moderado no Estro
GrO	Grupo de éguas com escore corporal Obeso
GrOD	Grupo de éguas com escore corporal Obeso no Diestro
GrOE	Grupo de éguas com escore corporal Obeso no Estro
HE	Hematoxilina-Eosina
HHA	Hipotalâmico-Hipofisário-Adrenal
HHG	Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal
IG	Imunomarcção do Epitélio Glandular
IG-Ob	Imunomarcção do Epitélio Glandular da Leptina
IG-ObRb	Imunomarcção do Epitélio Glandular do Receptor da Leptina
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Imunomarcção do Epitélio Luminal
IL-Ob	Imunomarcção do Epitélio Luminal da Leptina
IL-ObRb	Imunomarcção do Epitélio Luminal do Receptor da Leptina
JAK	Janus Kinase
KDa	kilodaltons
LEP	Leptina
LH	Hormônio Luteinizante
MHz	Megahertz
NPV	Núcleo hipotalâmico paraventricular
NPY	Neuropeptideo Y
Ob	Marcador de Leptina
Ob-R	Marcador do Receptores de Leptina
Ob-Rb	Forma longa do receptor de Leptina
Ob-Re	Receptor solúvel de Leptina

P4	Progesterona
PC	Peso Corporal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E ₂
RIA	Radioimunoensaio
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SME	Síndrome Metabólica Equina
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
TAG	Triglicerídeos
17 β -HSD	17 beta-hidroxiesteróide desidrogenase
17-OHP	17 – alfa-hidroxiprogesterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. LEPTINA	19
2.1.1 Fatores que influenciam os níveis séricos de Leptina.....	20
2.1.2 Mecanismos de ação da Leptina na função reprodutiva.....	21
2.1.3 Leptina e alterações no ciclo estral	23
2.1.4 Leptina no fluido folicular.....	24
2.1.5 Leptina no endométrio.....	25
2.2. CORTISOL	26
2.2.1. Estresse na espécie equina.....	26
2.2.2. Mecanismo de liberação do Cortisol.....	28
2.2.3. Cortisol na reprodução	28
2.2.4. Mecanismo de ação na estimulação da síntese de leptina	31
3. ARTIGO 1	32
4. ARTIGO 2	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

Descrita em 1994 como a primeira adipocina, a leptina é um peptídeo de 16 kDa, que apresenta um cadeia composta por 167 aminoácidos (ZHANG et al., 1994; RESELAND et al., 2001), sendo sintetizada principalmente pelo tecido adiposo. Sob condições fisiológicas normais, atua junto ao seu receptor na regulação do peso corporal e no equilíbrio da função reprodutiva (KUMAR et al., 1998; FERREIRA-DIAS et al., 2005).

O mecanismo de ação da leptina ocorre via central e periférica, através da ativação de seus receptores, que apresentam pelo menos seis isoformas (Ob-R) com diferentes domínios citoplasmáticos, incluindo a forma longa (Ob-Rb) e a curta (Ob-Ra, c, e, d, f) (RIBEIRO et al., 2007). Porém, somente a forma longa do receptor (Ob-Rb) contém um domínio intracelular que é capaz de transmitir o sinal de ligação com a leptina para dentro da célula (TARTAGLIA et al., 1995).

Receptores (Ob-Rb) em equinos foram encontrados no hipotálamo, adenohipófise (BUFF et al., 2002), e órgãos do aparelho reprodutivo, como ovários (células luteínicas, fluido folicular e oócitos) (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013). Em algumas espécies como nos humanos (GONZÁLEZ et al., 2000), suínos (SMOLINSKA et al., 2007) e bovinos (THORN et al., 2007), a leptina e seu receptor são expressos também no endométrio e miométrio, durante as fases do ciclo estral. No entanto, em equinos, até o momento, não há estudos que comprovem a capacidade uterina de secretar leptina e/ou a presença de seus receptores no endométrio.

A ação da leptina na atividade reprodutiva ocorre devido a sua influência no eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal (HHG), apresentando um importante papel na regulação indireta da foliculogênese ovariana, por meio do controle do hormônio luteinizante (LH) e da secreção do hormônio foliculo estimulante (FSH) (GENTRY et al., 2002; FERREIRA-DIAS et al., 2005), agindo ainda no mecanismo que envolve a ovulação e luteinização folicular (ABDELNABY et al., 2016), bem como a maturação dos oócitos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2009).

No entanto, níveis plasmáticos elevados de leptina, juntamente com condições clínicas de obesidade, estão correlacionados com ciclos estrais alterados, devido a intervalos

interovulatórios aumentados (SESSIONS et al., 2004) com um período prolongado de aumento de progesterona sérica circulante (37 a 78 dias) (VICK et al., 2006), relacionado com a presença de corpo lúteo persistente e/ou a maior incidência de luteinização de folículos anovulatórios (MCCUE e SQUIRES, 2002), causados pela supressão ou inibição da ovulação em éguas obesas (MCCUE, 2000; VICK et al., 2006).

O aumento da concentração sérica de leptina em equinos está normalmente relacionado ao excesso de acúmulo de gordura corporal (BRAY, 1996; BUFF et al., 2002; GENTRY et al., 2002a), no entanto, outros fatores como o desequilíbrio hormonal (ROMERO e ZANESCO, 2006; MELO et al., 2011), idade (BUFF et al., 2002; GENTRY et al., 2004), disponibilidade alimentar (FITZGERALD e MCMANUS, 2000), período do dia (RADIN et al., 2009), estacionalidade (FITZGERALD e MCMANUS, 2000; FERREIRA-DIAS et al., 2005) e o estímulo realizado pela ação de glicocorticóides (GENTRY et al., 2002; CARTMILL et al., 2003), também podem influenciar nas concentrações séricas desse hormônio.

Nos mamíferos, os corticosteróides em geral desempenham um importante papel na estimulação da síntese de leptina pelo tecido adiposo (GENTRY et al., 2002a; CARTMILL et al., 2003), porém poucos autores publicaram artigos relacionando a interação desses dois importantes hormônios na espécie equina (CARTMILL et al., 2006).

O Cortisol é um hormônio da família dos esteróides, produzido pela parte superior da glândula supra-renal, cuja síntese é estimulada em situações de desequilíbrio da homeostase corporal, estando diretamente envolvido na resposta ao estresse, podendo em muitas espécies de mamíferos, como equinos (MALSCHITZKY et al., 2015), bovinos (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), ovinos (MACFARLANE et al., 2000) e mulheres (SAKETOS et al., 1993) influenciar negativamente a atividade reprodutiva, quando em excesso na circulação sanguínea.

Fatores estressantes para equinos, como altas temperaturas e umidade (OLIVEIRA et al., 2015), transporte prolongado (FAZIO et al., 2008; TATEO et al., 2012; THARWAT e SOBAYIL, 2014), o manejo ambiente/animal inadequado e a perda dos companheiros sociais (MALSCHITZKY et al., 2015), esforço físicos exacerbados ou a falta de treinamento adequado (MARC et al., 2000) podem elevar os níveis séricos de cortisol e consequentemente prejudicar o desempenho reprodutivo.

Portanto, ambos os hormônios influenciam direta ou indiretamente a função reprodutiva em equinos, estando suas concentrações séricas correlacionadas positivamente

com os níveis encontrados no fluido folicular (FF) (GASTAL et al., 2010; SCARLET et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi: a) verificar a presença de leptina e do seu receptor funcional (Ob-Rb) no endométrio e avaliar a influência da obesidade e das fases do ciclo estral nesses marcadores, b) avaliar em uma condição de manejo adverso e estressante, a influência do cortisolintrafolicular, nos níveis foliculares de leptina e nos marcadores de leptina e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio durante as fases do ciclo estral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LEPTINA

Descoberta pela equipe do Dr Jeffrey Friedman, na Universidade Rockefeller, em 1994, a leptina, do grego *leptos* (magro), é uma adipocitocina produto do gene (*Ob*) (KUMAR et al., 1998), que foi encontrada após clonarem o gene dessa substância isolada de camundongos obesos.

Secretada principalmente pelo tecido adiposo branco, localizado nas porções subcutâneas, a leptina pode ser sintetizada também, em menores quantidades, pelo estômago, placenta, ovários, células epiteliais da glândula mamária e tecido adiposo marrom (FRIEDMANN e HALAAS, 1998; BUFF et al., 2002; BERNE et al., 2004), sendo ainda sintetizada pelo tecido adiposo branco visceral, porém com menor expressão do RNAm (HUBE et al., 1996), apresentando níveis plasmáticos fortemente e positivamente correlacionados com a massa total de tecido adiposo corporal (BRAY, 1996 ; FITZGERALD e MCMANUS, 2000; GENTRY et al., 2002).

A ação da leptina ocorre mediante sua ligação aos seus receptores, os quais se apresentam nas formas curta (*Ob-Ra*, c, e, d, f) e longa (*Ob-Rb*) (RIBEIRO et al., 2007). No entanto, somente esta última é capaz de transmitir o sinal de ligação com a leptina para dentro da célula (TARTAGLIA et al., 1995), pois possui o segmento transmembrana, ligando-se a leptina, ainda em domínio extracelular, ocorrendo uma dimerização dos receptores, havendo a fosforilação em resíduos de tirosina pela *Janus kinase* - JAK2. Em domínio intracelular, a leptina passa a se ligar com aos Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição - STAT (3,5 e 6) (YAMASHITA et al., 1998), as quais fosforiladas também pela JAK2, se dissociam do seu receptor no citoplasma formando homo ou heterodímeros, os quais seguem para o núcleo, aonde vão se ligar a sequências específicas no DNA, para expressão de genes alvo e específicos (LIMA e CURI, 2008; CATUNDA et al., 2014).

A leptina pode circular ligada a receptores solúveis (Ob-Re), que têm por finalidade postergar a meia-vida deste hormônio na circulação sanguínea ou na forma livre, a qual é biologicamente a mais ativa (RIBEIRO et al., 2007).

Uma forte expressão do gene do receptor Ob-Rb é observada nos diversos núcleos hipotalâmicos que regulam a ingestão de alimentos e o controle do gasto energético (MERCER et al., 1996), sendo identificado também, através de técnicas como a imunohistoquímica ou reação em cadeia da polimerase (PCR), em tecidos do aparelho reprodutivo como adenohipófise (BUFF et al., 2002) e ovários (células luteínicas, fluido folicular e oócitos) (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013).

Considerada um hormônio multifuncional, a leptina regula além da homeostase corporal, a termogênese, angiogênese, funções neuroendócrinas e imunológicas, desempenhando também, importante papel no equilíbrio das funções reprodutivas, através da regulação da atividade ovariana, maturação oocitária, desenvolvimento e implantação embrionária, bem como no mecanismo de placentação (BARASH et al., 1996; CERVERO et al., 2005; VICK et al., 2006).

2.1.1 Fatores que influenciam os níveis séricos de Leptina

A adiposidade corporal é o fator que melhor se correlaciona com os níveis de leptina, uma vez que a expressão desse hormônio em animais reflete a quantidade de gordura e o tamanho dos adipócitos (FITZGERALD e MCMANUS, 2000; GENTRY et al., 2002a), servindo como um sinalizador do sistema nervoso central (SNC) sobre quantidade de energia armazenada, auxiliando o organismo na manutenção do equilíbrio homeostático. No entanto, em situações de jejum prolongado (mais de 48hs), os níveis de leptina diminuem independentemente do escore corporal dos animais (FITZGERALD e MCMANUS, 2000).

Alterações hormonais, como os níveis séricos de glicocorticóides e insulina, estimulam diretamente o adipócito na transcrição do gene da leptina (SALADIN et al., 1995). Outro fator que influencia nas concentrações dessa adipocitocina é a idade dos animais, uma vez que animais jovens possuem menor deposição de tecido adiposo, devido ao desenvolvimento corporal e com isso, menores níveis de leptina (BUFF et al., 2002; GENTRY et al., 2004).

Apresentando variação estacional, a leptina apresenta um padrão circadiano de secreção com picos ocorrendo durante o período noturno (RADIN et al., 2009), com a diminuição da concentração sérica desse hormônio, nos períodos anovulatórios do ciclo estral dos equinos, mesmo quando a condição corporal é mantida (FITZGERALD e MCMANUS, 2000; FERREIRA-DIAS et al., 2005). No entanto, as fêmeas que possuem níveis altos de leptina ($> 5\text{ng/ml}$) durante o inverno podem chegar a apresentar atividade ovariana cíclica durante o ano todo, enquanto as éguas que apresentam baixos níveis de leptina ($< 3\text{ng/ml}$) tendem a ser acíclicas neste período (GENTRY et al., 2002; FERREIRA-DIAS et al., 2005; WALLER et al., 2006).

2.1.2 Mecanismos de ação da Leptina na função reprodutiva

A principal ação da leptina no organismo é a sinalização do sistema nervoso central (SNC), induzindo a redução do consumo de alimentos, via supressão do apetite, promovendo a utilização das reservas de gordura e controlando a homeostase energética (BRAY, 1996; BUFF et al., 2002; CAVINDER et al., 2007). Exerce também, um papel metabólico, pois estimula a gliconeogênese e inibe a glicogenólise, além de facilitar o consumo de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina (ALMEIDA et al., 2009; MELO et al., 2011; RICCI e BEVILACQUA, 2012).

Em condições de armazenagem de reservas energéticas suficientes para reprodução, a leptina se torna disponível, manifestando efeito estimulatório direto no eixo HHG, ativando interreceptores de leptina nos neurônios, que provocam liberação de alfa-endorfinas, neuropeptídeo Y (NPY), bem como a sensibilização de regiões do cérebro, sensíveis a glicose, as quais influenciam a secreção de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) estimulando sua síntese de forma dose dependente (CUNNINGHAM et al., 1999; CAVINDER et al., 2007; PÉREZ-PÉREZ et al., 2015) (Figura 1).

Na hipófise, a leptina estimula a secreção de LH e FSH (BARASH et al., 1996; BUDAK et al., 2006; CAVINDER et al., 2007), havendo também um efeito luteotrófico nas gônadas, através da modulação da atividade secretora de progesterona (P4) e prostaglandina E_2 (PGE₂), de forma dose dependente (GALVÃO et al., 2014).

Dessa forma, além do estímulo direto no SNC, a leptina na espécie equina, participa também de funções periféricas que envolvem o sistema reprodutivo, influenciando o

crescimento folicular, ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo, maturação oocitária, bem como a modulação do fluxo sanguíneo uterino antes e depois da ovulação (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; GALVÃO et al., 2014; ABDELNABY et al., 2016).

Em outras espécies de mamíferos, a leptina desempenha um importante papel na atividade reprodutiva, atuando na modulação da esteroidogênese ovariana em ruminantes (KENDALL et al., 2004), mulheres (MOSCHOS et al., 2002), suínos (BARB et al., 2004) e roedores (DUGGAL et al., 2000), na regulação do desenvolvimento dos folículos ovarianos e desenvolvimento do corpo lúteo em suínos (SPICER, 2001; SMOLINSKA et al., 2013) e bovinos (SARKAR et al., 2010), na maturação de oócitos em mulheres (CIOFFI et al., 1997), bovinos (BOELHAUVE et al., 2005) e suínos (CHAPPAZ et al., 2008), no desenvolvimento embrionário em suínos (CRAIG et al., 2005), bovinos (MAILLARD et al., 2010), búfalos (PANDA et al., 2017), e ovinos (HERRID et al., 2006) e na prevenção do efeito do estresse térmico e nutricional nas funções das células do ovário de suínos (SIROTKIN, 2010).

No entanto, quando em excesso na circulação, principalmente em situações de acúmulo excessivo de gordura corporal, a leptina em equinos, pode influenciar negativamente a função reprodutiva, alterando o ciclo estral, havendo intervalos interovulatórios aumentados (SESSIONS et al., 2004), com um período prolongado de aumento de progesterona sérica circulante (37 a 78 dias) (VICK et al., 2006), relacionado com a presença de corpo lúteo persistente e/ou a maior incidência de luteinização de folículos anovulatórios (MCCUE e SQUIRES, 2002), causados pela supressão ou inibição da ovulação (CARNEVALE et al., 2000; VICK et al., 2006).

Em humanos, os elevados níveis de leptina influenciam negativamente a função ovariana e/ou o desenvolvimento e a viabilidade embrionária, estando correlacionados com elevados índices de massa corporal e maior prevalência de infertilidade (DEMIR et al., 2007).

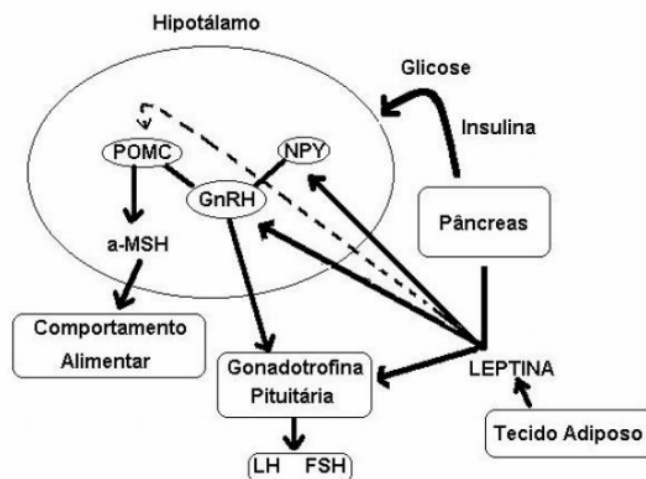


FIGURA1. Representação esquemática dos efeitos da leptina no eixo hipotalâmico-hipofisário.
Fonte: WILLIAMS et al., (2002)

2.1.3 Leptina e alterações no ciclo estral

Apesar dos diversos estudos que comprovam a ação direta e indireta da leptina nas funções reprodutivas, ainda são poucos e contraditórios os estudos publicados que avaliam a influência da leptina durante as fases do ciclo estral em equinos. AboEl-Maaty et al. (2013), observaram em éguas da raça Árabe, que a leptina sérica não apresenta variações durante as fases do ciclo estral observadas (estro, fase lútea dia 7 e 14 e o 14º dia de prenhez), no entanto, em 2016, Abdelnaby e colaboradores, observaram nesta espécie, um aumento significativo das concentrações de leptina, observadas a partir do D - 5 até o D 0 (ovulação) do ciclo estral, seguido por uma diminuição significativa das concentrações desse hormônio, do dia da ovulação até o D 9 do diestro.

Segundo este autor, o aumento da leptina circulante durante o estro, ocorreu devido à ação da leptina na regulação não apenas do fluxo sanguíneo uterino durante o ciclo estral, mas também na preparação do útero para receber o futuro embrião após a ovulação. A presença de receptores de leptina em células foliculares e o aumento da leptina sérica durante o período de maturação do folículo dominante e ovulação sugerem um papel da leptina durante a ovulação e ações regulatórias diretas sobre o folículo em desenvolvimento.

Em outras espécies de mamíferos, como em bovinos (GARCIA et al., 2002) e nas mulheres (HARDIE,1997), as concentrações de leptina apresentam um aumento inverso ao observado em equinos, manifestando pico plasmático durante o diestro, havendo uma diminuição nos seus níveis durante a fase lútea tardia e o começo da fase folicular.

2.1.4 Leptina no fluido folicular

Em 2010, Gastal e colaboradores, observaram que a concentração de leptina presente no FF de éguas, correlacionava-se de forma positiva com os níveis séricos e com a condição do escore corporal. Na sequência, Sessions-Bresnahan e Carnevale (2014) realizaram um estudo, cuja hipótese era que éguas com Síndrome Metabólica Equina (SME), teriam um ambiente folicular alterado quando comparadas a indivíduos normais, afetando a regulação gênica no folículo e maturação do oócito. Os resultados encontrados demonstraram que as concentrações de leptina foram altamente correlacionadas entre soro e FF, sendo observados menores níveis desse hormônio no FF do grupo controle do que no grupo SME, comprovando que animais que sofrem dessa síndrome apresentam distúrbios hormonais que podem prejudicar seu desempenho reprodutivo.

Em outras espécies, como humanos e bovinos, existe correlação entre a leptina intrafolicular e hormônios esteróides, como o estradiol. Em bovinos, Sarkar et al. (2010), observaram a expressão da leptina e de seu receptor durante diferentes estágios fisiológicos do ovário e perceberam uma maior expressão do RNAm do Ob-Rb nos folículos menores em relação aos maiores, os quais tem maiores quantidades de estradiol, indicando nessa espécie, uma relação inversa com esse hormônio (SOSA et al., 2010). Em mulheres, Moschos et al. (2002), observaram que as altas concentrações de leptina no ovário podiam suprimir a produção de estradiol e interferir no desenvolvimento do folículo dominante e maturação oocítica.

Em equinos, Lange-Consiglio et al. (2013), observando as concentrações de leptina sérica e intrafolicular durante o ciclo estral perceberam que não houve diferença nos níveis de leptina nos momentos do ciclo estral avaliados (estro e diestro), porém ainda são escassos os relatos publicados sobre tal tema nessa espécie.

2.1.5 Leptina no endométrio

A presença de leptina (Ob) no endométrio foi demonstrada em diversas espécies como mulheres, roedores, coelhas, leitoas e vacas (GONZÁLEZ et al., 2000; KAWAMURA et al., 2002; BOGACKA et al., 2006; SMOLINSKA et al., 2007; THORN et al., 2007;). Thorn et al., em 2007, constataram a presença de genes dos receptores curtos (Ob-Ra) e longos (Ob-Rb) no útero de novilhas, percebendo que existe um sistema de “*down-regulation*” após o tratamento com estradiol, sugerindo que a leptina tem um papel uterino, como descrito em humanos e ratos (ALFER et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2000; KAWAMURA et al., 2002).

Sosa et al. (2010), demonstraram pela primeira vez em bovinos, que a expressão do gene do receptor da leptina variava durante o ciclo estral, havendo uma maior expressão do Ob-R na fase lútea média-final, sugerindo que a alta sensibilidade à esse hormônio no ambiente uterino nos dias 12 e 19 do ciclo, pode ocorrer pela influência da leptina na preparação do ambiente uterino para uma eventual prenhez, além de indicar um possível envolvimento dos hormônios esteróides sexuais na sua regulação (THORN et al., 2007).

Em suínos, Moreira et al. (2014), observaram que a imunomarcagem do receptor de leptina no útero, era mais intensa no epitélio glandular quando os ovários dos animais estavam na fase lútea em relação a fase folicular e Wang et al. (2014), encontraram receptores para leptina principalmente no epitélio luminal e glandular do endométrio de porcas vazias.

Segundo Budak et al. (2006), a leptina encontrada na cavidade uterina pode ser oriunda de diferentes origens: a leptina produzida e secretada pelo tecido adiposo age no endométrio de maneira endócrina ou no caso de animais prenhes, a leptina de origem embrionária desempenharia seu papel de forma parácrina no endométrio. Além destas, a leptina pode ser produzida no útero, podendo exercer sua função de maneira autócrina. Estes achados sugerem que o endométrio também pode ser considerado um tecido alvo para ação da leptina nos animais, porém segundo os autores, os efeitos da leptina sobre a atividade reprodutiva ainda devem ser melhor esclarecidos.

Kitawaki et al. (2000) e Cervero et al. (2004) demonstraram a expressão do RNAm de receptores de leptina (Ob-Rb) no endométrio de mulheres, com um aumento da expressão deste na fase lútea. Alfer et al. (2000), perceberam uma deficiência desses receptores (Ob-R) no endométrio de mulheres subfêrteis. Segundo o autor, a leptina produzida no útero também atua no processo de implantação e desenvolvimento embrionário precoce, participando ainda, segundo Wendremaire et al. (2011), de mecanismos que atuam na inibição de contrações do

miométrio, apoptose e remodelação de células miometriais, além da transformação e diferenciação endometrial.

Nos equinos, até o momento, não foi possível encontrar artigos publicados que comprovem a presença de leptina e seu receptor funcional no endométrio. O que se observa em outras espécies, é que esse hormônio tem um importante papel na atividade reprodutiva, servindo como um marcador em humanos, em problemas de ordem reprodutiva, como a infertilidade.

2.2. CORTISOL

O cortisol é um hormônio produzido no córtex da adrenal a partir do colesterol, sendo classicamente utilizado em pesquisa para medir a resposta dos animais ao estresse, sendo este, o corticosteróide de maior predominância nesta espécie (BOTTOMS et al., 1972).

2.2.1. Estresse na espécie equina

O estresse é uma resposta fisiológica do organismo provocada por uma quebra do equilíbrio orgânico, também chamado de homeostase, onde existe uma resposta fisiológica ou comportamental contra o estímulo nocivo, condição adversa do meio ambiente ou do próprio organismo animal, a qual demanda uma capacidade adaptativa orgânica a tais situações (MOBERG, 2000; MAZIERO et al., 2012).

A presença de um agente estressor altera a homeostasia, desencadeando três principais reações biológicas: no comportamento, no sistema nervoso autônomo e no sistema neuroendócrino (MOBERG, 1987). A ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), é um mecanismo estimulatório, que culmina com a síntese e secreção de glicocorticóides (SAPOLSKY et al., 2000), predominantemente o cortisol na espécie equina, o qual em conjunto com as catecolaminas, irão provocar alterações metabólicas visando mobilizar e fornecer energia para o organismo, através da lipólise, da glicogenólise e da degradação de proteínas, dando subsídios para que o corpo possa restabelecer o equilíbrio (GONZÁLEZ e SILVA, 2003).

Em níveis fisiológicos, o cortisol está envolvido diretamente na diferenciação e maturação dos tecidos corporais (SCHMID et al., 1995), inclusive no âmbito reprodutivo, mas em excesso, como nos casos de estímulo de síntese por agentes estressores ou pela administração exógena inadequada, atua de forma negativa no sistema reprodutivo (DEBUS et al., 2002).

A resposta ao estresse depende da intensidade e duração do agente estressor (DOBSON e SMITH, 2000), podendo este ser considerado agudo ou crônico. O estresse agudo é considerado o estresse que tem uma duração breve (segundos, minutos ou até algumas horas) e o estresse prolongado é contínuo (não repetido), e dura muito mais tempo (dias, semanas ou meses).

Segundo Grandin (1997), os animais podem apresentar as seguintes formas de estresse: psicológico (novidade, medo, frustração) ou estresse físico (contenção, manejo, fome, sede, fadiga, injúria, temperaturas extremas); além disso, a linhagem genética também altera a susceptibilidade ao estresse.

O estresse denominado social ocorre quando os vínculos e ordens sociais, como dominância e alteração na densidade populacional são interrompidas, predispondo a redução do bem-estar (FRASER, 1992). Os vínculos formados entre os indivíduos da espécie equina são muito estáveis e permanecem por anos (DIERENDONCK et al., 2004), pois estes animais costumam viver em bandos de no máximo 20 indivíduos (TAROUCO et al., 2009), com uma hierarquia social clara e bem estabelecida (MILLS e NANKERVIS, 1999).

A influência do estresse social vem sendo estudada na espécie equina. Irvine e Alexander (1994, 1998), observaram que o estresse social aumentou imediatamente o cortisol plasmático em equinos recém-chegados a um local novo e a ativação aguda do eixo HHA persistiu na segunda semana, demonstrando que os cavalos não se acostumaram aos procedimentos.

Malschitzky et al. (2015) realizaram um estudo retrospectivo do registro do histórico ginecológico de 1206 éguas, durante dez temporadas reprodutivas, com o intuito de avaliar o efeito da redução de situações estressantes sobre o desempenho reprodutivo das éguas. Em conclusão, os autores observaram que as estratégias de manejo destinadas a reduzir o estresse social, puderam diminuir as perdas gestacionais e a quantidade média de ciclos por prenhez, melhorando o desempenho reprodutivo em éguas.

2.2.2. Mecanismo de Liberação do Cortisol

O principal método para verificar o grau de estresse em equinos é através da aferição sérica de cortisol (TERLOUW et al., 1997), que em equinos se encontra na circulação em quantidades fisiológicas entre 2,9 e 6,6 mg/dL (DUGAT et al., 2010).

A síntese de glicocorticóides contribui para aumentar a resistência do organismo contra ameaças, pois estes possuem ação anti-inflamatória e atuam promovendo a gliconeogênese hepática, aumentando a glicose sanguínea e estimulando a lipólise, mecanismos estes, utilizados para incrementar a energia para o metabolismo celular (CUNNINGHAN, 2004; GONZÁLES e SILVA, 2003).

Frente a agentes estressores, ocorre ativação do eixo HHA, onde o núcleo hipotalâmico paraventricular (NPV), libera Arginina Vasopressina (AVP) e o Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), que atuam sobre a adenohipófise estimulando a liberação de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), o qual é liberado na corrente sanguínea, agindo sobre as zonas fasciculada e reticular do córtex da adrenal, secretando glicocorticóides em grandes quantidades, como o cortisol (CUNNINGHAN, 2004; RIVIER e VALE et al., 1984).

A regulação do eixo HHA é regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa (*feedback* negativo) pelos glicocorticóides, que atuam sobre o hipotálamo, inibindo a liberação de CRH, e na adenohipófise, inibindo a secreção de ACTH (DOBSON e SMITH, 2000).

2.2.3. Cortisol na reprodução

Quando em níveis fisiológicos, o cortisol tem papel fundamental no desenvolvimento dos tecidos reprodutivos, bem como na sua manutenção (SCHMID et al., 1995). A influência dos glicocorticóides a nível gonadal pode ocorrer de forma indireta, através da inibição do eixo HHG ou de forma direta, por meio de receptores de glicocorticóides presentes no ovário, podendo atuar de forma negativa na função reprodutiva durante períodos de hiperatividade adrenal (GONZÁLES e SILVA, 2003).

Nos equinos, os ovários expressam receptores de glicocorticóides, porém não possuem as enzimas necessárias para a síntese de cortisol (OMURA e MOROHASHI, 1995), o qual é

transportado através da circulação sanguínea, ligada às proteínas plasmáticas e apenas uma pequena porção circula na forma livre e não vinculada. A globulina ligadora do cortisol (CBG) é a principal transportadora desse glicocorticóide, apresentando alta afinidade com a molécula de cortisol e com progestágenos, como a progesterona e a 17 alfa-hidroxi-progesterona (17-OHP) (DUNN et al., 1981; ANDERSEN, 2002).

Os folículos ovarianos modulam a atividade biológica do cortisol através da produção de progesterona e 17-OHP que, dentro do folículo, atingem níveis que deslocam o cortisol de suas proteínas de ligação, em particular a CBG, tornando-a disponível para ação biológica e regulando a expressão das enzimas 11 β hidroxisteróide desidrogenase (tipo 1 e tipo 2), que se opõem à ação uma da outra, onde a 11 β -HSD tipo 2 predominantemente inativa cortisol para cortisona, enquanto 11 β -HSD tipo 1 inverte essa reação (TETSUKA et al., 1997).

Além desses dois mecanismos, Hammond et al. (1990, 1997) propuseram que as enzimas proteolíticas geradas para que o oócito seja liberado do folículo, liberem CBG durante o processo de lise e causem a liberação de cortisol, aumentando a quantidade da fração livre no folículo pré-ovulatório. Segundo Andersen (2002), a concentração de cortisol livre no FF pré-ovulatório de mulheres, atinge níveis dez vezes superiores aos valores correspondentes no soro.

Em humanos e roedores (HILLIER e TETSUKA, 1998; YONG et al., 2000) foram observadas maiores concentrações de cortisol nos folículos pré-ovulatórios, sugerindo que o cortisol possa funcionar para reduzir a reação inflamatória que ocorre em conexão com a ovulação, num mecanismo que modula a reação inflamatória induzida pelo pico de LH na parede folicular, de forma independente dos níveis sistêmicos deste glicocorticóide, promovendo cicatrização rápida da ferida, deixada pela ruptura folicular. Além disso, pode proteger o oviduto da invasão por leucócitos, participando também, das complexas interações entre os diferentes tipos de prostaglandina, permitindo a fertilização e desenvolvimento precoce do embrião (ANDERSEN, 2002; ACOSTA et al., 2005; MALSCHITZKY et al., 2015).

Em mulheres, uma concentração de cortisol no FF maior foi observada em folículos que produziram um oócito fertilizado e implantado, quando comparado com folículos cujo oócito fertilizado não implantou (KEAY et al., 2002).

Estudos realizados na espécie equina por Scarlet e colaboradores (2015, 2017), demonstraram pela primeira vez o envolvimento de glicocorticóides no crescimento folicular e maturação de oócitos. Segundo os autores, uma maior concentração de cortisol foi observada nos folículos pré-ovulatórios < 25mm, não sendo observado no entanto, o aumento

da expressão da 11 β -HSD1 nos folículos dessa categoria, diferentemente dos resultados encontrados em bovinos, onde Tetsuka et al. (2010) observaram que a expressão de 11 β -HSD1 aumentava com a progressão da maturação folicular, enquanto a expressão do RNAm de 11 β -HSD2 nas células da granulosa eram baixas e permaneciam praticamente inalteradas.

No entanto, apesar das benéficas influências do cortisol na função reprodutiva, quando em excesso na circulação, este desempenha um papel negativo nessa atividade. O aumento plasmático desse corticosteróide seja ele motivado por um agente estressor (IRVINE e ALEXANDER, 1994; ALEXANDER e IRVINE, 1998; BERGHOLD et al., 2007), ou pela administração inadequada desse princípio ativo (ASA e GINTHER, 1982), leva a alterações na função do eixo HHG, através da inibição e/ou redução da liberação de GnRH pelo hipotálamo e conseqüentemente, diminuição da secreção de LH e FSH, pela hipófise, prejudicando a secreção de esteróides gonadais, o desenvolvimento folicular e a ovulação. Como consequência das alterações no eixo HHG, ocorrem falhas na ovulação, diminuição do desempenho reprodutivo, podendo ainda estar relacionado à maior incidência de perdas embrionárias (ASA et al., 1980; ASA e GINTHER, 1982; FERRIS e MCCUE, 2010; ALEXANDER e IRVINE, 2011).

Em outras espécies de mamíferos, a elevação plasmática nos níveis de cortisol também afeta negativamente a função reprodutiva, levando a inibição da secreção de gonadotrofinas em ovinos (MACFARLANE et al., 2000; BREEN et al., 2005; BREEN e KARSCH, 2006), suínos (DANIELSEN e VESTERGAARD, 2001) e bovinos (DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), interferindo nesta espécie, na dinâmica folicular (alterando os folículos no início do estágio antral e causando prejuízo no folículo subsequente) (GUZELOGLU et al., 2001), alterando o mecanismo ovulatório, reduzindo a qualidade do oócito e do embrião, modificando o ambiente uterino (WILSON et al., 1998; DE RENSIS e SCARAMUZZI, 2003) e diminuindo a probabilidade da implantação do embrião (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999). Sendo, no entanto, as respostas orgânicas dependentes da intensidade e/ou duração do agente estressor ou da dose e frequência do corticosteróide administrado.

2.2.4. Mecanismo de ação na estimulação da síntese de leptina

Existe um consenso entre diversos estudos em humanos (MIELL et al., 1996; JANSSEN et al., 1998; LEE e FRIED, 2006), roedores (ZAKRZEWSKA et al., 1999) e equinos (CARTMILL et al., 2003), de que os glicocorticóides, em especial o cortisol, estimulam a biossíntese e secreção de leptina no tecido adiposo.

Elimam et al. (1998), estudaram a relação em humanos entre níveis endógenos de cortisol e leptina, bem como os efeitos agudos e crônicos de uma baixa dose de dexametasona (DEX) nos níveis plasmáticos de leptina em voluntários do sexo masculino saudáveis e concluíram que os glicocorticóides, mesmo dentro do intervalo fisiológico de referência para a espécie, regulam os níveis plasmáticos de leptina.

Em equinos, Cartmill et al. (2003), observaram que a administração de dexametasona, em diferentes doses e vias de administração, estimulam a secreção de leptina. O efeito da dexametasona nos níveis de leptina pode ser devido a uma influência direta sobre a produção desse hormônio nas células adiposas, estimulando a transcrição do gene da leptina. Esta visão é suportada pelo efeito direto de estimulação dos glicocorticóides na expressão do RNAm de leptina e secreção *in vitro* (MURAKAMI et al., 1995; WABITSCH et al., 1996) e pela presença de um receptor de glicocorticóides, elemento promotor do gene OB no tecido adiposo (MURAKAMI et al., 1995; GONG et al., 1996).

Portanto, torna-se claro, que ambos os hormônios, leptina e cortisol, atuam de forma direta e indireta na função reprodutiva, interferindo negativamente, quando em excesso e/ou desequilíbrio na circulação. Em outras espécies como bovinos (SOSA et al., 2010), esses dois marcadores variam durante o ciclo estral, agindo possivelmente na preparação do útero para uma eventual prenhez. Em humanos, os receptores de leptina estão expressos em menor quantidade em mulheres com sobrepeso e níveis de leptina elevados (UOTANI et al., 1999; OGIER et al., 2002), havendo segundo Alfer et al. (2000) uma ligação entre a diminuição de expressão de receptores de leptina e a infertilidade. A presença de leptina e seu receptor (Ob-Rb) ainda não foi estudada no endométrio da espécie equina demonstrando a importância desse estudo, que teve por objetivo verificar a influência do perfil hormonal, ciclo estral e do escore corporal nesses marcadores no endométrio equino.

3. ARTIGO 1

Imunomarcção de leptina e seu receptor no endométrio de éguas com diferentes escores corporais durante o ciclo estral

Millie de Oliveira Marchiori^{1,2*}, Fabiana Moreira³, Luis Augusto Cruz², Fernanda Maria Pazinato³, Bruna dos Santos Suñe Moraes³, Sandra FialaRechsteiner²

1-Programa de Pós-graduação em Medicina Animal:equinos - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul – Brasil;

2- HISTOREP – Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal De Pelotas – RS – Brasil

3-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal De Pelotas – RS – Brasil

*millievet@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de leptina (Ob) e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio de éguas, avaliando a influência da obesidade e do ciclo estral nessas citocinas. Foram utilizadas 20 éguas, divididas em 2 grupos: GrN: grupo de éguas com escore corporal (EC) moderado (EC = 6) e GrO grupo de éguas gordas/obesas (EC =8/9). Os animais foram selecionados com base na escala de escore corporal e monitorados através do peso (PC) e observações ultrassonográficas da espessura de gordura na base da cauda (EGBC) e na crista do pescoço (ECP). Os animais de ambos os grupos foram submetidos à coleta de sangue, para análise de triglicerídeos e leptina, além da extração de um fragmento do endométrio no 8º dia após a ovulação e durante o estro, momento em que a égua apresentava um folículo de 35mm e o útero, características clínicas e ultrassonográficas de estro. As amostras foram encaminhadas para imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpos policlonais anti-leptina e seu receptor. Na IHQ foi verificado que houve imunomarcção de Ob e Ob-Rb no epitélio luminal (IL) e glandular (IG), nos dois momentos avaliados em todos os grupos. Foi verificada uma imunomarcção mais intensa de Ob-Rb no IG durante o diestro, em ambos os grupos (GrN e GrO). A marcação de Ob no epitélio glandular entre estro e diestro, diferiu apenas nas éguas do GrO. Quando o GrN e o GrO foram comparados, foi observada uma maior imunomarcção no GrN, tanto para Ob como Ob-Rb. Como observado nas glândulas endometriais, no epitélio luminal, também se verificou uma maior imunomarcção do receptor de leptina durante o

diestro, e quando os grupos foram comparados, houve uma marcação mais intensa no GrN, durante o diestro. As análises bioquímicas demonstraram que não houve diferença nos níveis séricos de triglicérides e leptina nos grupos e períodos avaliados, havendo, no entanto, diferença nos padrões morfométricos de PC, EGBC e ECP entre os grupos. Não foram observadas alterações no período do ciclo estral ou distúrbios clínicos, nos animais examinados. Os resultados confirmam a presença de leptina e seu receptor funcional de cadeia longa no endométrio equino, havendo uma imunomarcagem de Ob-Rb mais intensa durante o diestro em éguas de escore corporal moderado.

Palavras-Chave: leptina, endométrio, equinos, obesidade

Leptin and its receptor immunostaining on the endometrium of mares with different body scores during the estrous cycle

Abstract

The objective of this study was to evaluate the presence of leptin (Ob) and its receptor (Ob-Rb) in the endometrium of mares, evaluating the influence of obesity and estrous cycle on these cytokines. Twenty mares were used, divided into 2 groups: GrN: group of mares with moderate body score (EC = 6) and group of fat/obese mares (EC = 8/9). The animals were selected based on the body score scale and monitored by weight (PC) and ultrasonographic observations of the fat thickness at the base of the tail (EGBC) and at the neck crest (ECP). The animals of both groups were submitted to blood collection for triglycerides and leptin analysis, in addition, a sample of the endometrium was collected on the 8th day after ovulation and during estrus, when the mare showed a 35mm ovarian follicle and the uterus, with clinical and ultrasonographic features of estrus. The samples were processed to immunohistochemistry (IHC) with anti-leptin polyclonal antibodies and their receptor. In the IHQ it was verified that there was an immunolabeling of Ob and Ob-Rb in the luminal epithelium (IL) and glandular epithelium (IG), in the moments evaluated in all groups. More intense expression of Ob-Rb in the IG was observed during the diestrus in both

groups (GrN and GrO). The labeling of Ob in the glandular epithelium between estrus and diestrus, differed only in the mares of GrO. When GrN and GrO were compared, a greater expression was observed in GrN for both Ob and Ob-Rb. As observed in the endometrial glands, in the luminal epithelium, there was also a greater immunolabeling of the leptin receptor during the diestrus, and when the groups were compared, there was a more intense labeling in the GrN, during the diestrus. The biochemical analysis showed that there was no difference in the serum levels of triglycerides and leptin in the groups and periods evaluated, but there were differences in the morphometric patterns of PC, EGBC and ECP between the groups. No changes were observed in the estrous cycle period or clinical disorders in the animals examined. The results confirm the presence of leptin and its long-chain functional receptor in the equine endometrium, with a more intense Ob-Rb immunolabeling during diestrus in mares of moderate body score.

Key words: Leptin, endometrium, horses, obesity

INTRODUÇÃO

A leptina é uma proteína hormonal com peso molecular de 16-kDa, composta por 167 aminoácidos (ZHANG et al., 1994), produzida principalmente pelo tecido adiposo subcutâneo (GUERRE-MILLO, 2006). Atua na regulação do apetite (CHILLIARD et al., 2001), em todo balanço energético corporal e na função reprodutiva. A expressão do marcador de leptina (Ob) e do seu receptor (Ob-Rb) foi observada em diversos tecidos do corpo, demonstrando que este hormônio tem ação multisistêmica (CHELIKANI et al., 2003).

Os receptores de leptina pertencem à classe de receptores de citocinas I, e se apresentam com seis isoformas conhecidas, classificadas em longa (Ob-Rb), curta (Ob-Ra, c, d, f) e solúvel (Ob-Re). Porém somente a forma longa do receptor (Ob-Rb), contém um domínio intracelular que é capaz de transmitir o sinal de ligação com a leptina para dentro da célula (TARTAGLIA et al., 1995).

Nos equinos, a forma longa do receptor tem sido encontrada em muitos órgãos, incluindo hipotálamo, adenohipófise (BUFF et al., 2002), ovários (células foliculares, líquido folicular e células luteínicas), bem como em oócitos imaturos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013), sendo dessa forma responsável por atividades biológicas distintas, tanto a nível central, como periférico (MERCER et al., 1996).

Em algumas espécies, como suínos, a leptina também é expressa no endométrio e miométrio, durante o ciclo estral, desempenhando papel importante na função reprodutiva (SMOLINSKA et al., 2007). Em mulheres, Moschos et al. (2002), observaram que a leptina produzida no endométrio atua no processo de implantação e desenvolvimento embrionário precoce, participando do processo de transformação e diferenciação endometrial (ALFER et al., 2000). Segundo Budak et al. (2006), a leptina presente no endométrio pode agir de 3 formas, autócrina, parácrina e endócrina. Em equinos, até o presente momento, não foi possível encontrar artigos publicados que confirmassem a presença de Ob e Ob-Rb no endométrio.

A ação da leptina na atividade reprodutiva ocorre devido a sua influência no eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal (HHG), apresentando um importante papel na regulação indireta da foliculogênese ovariana, por meio do controle do hormônio luteinizante e da secreção do hormônio folículo estimulante (GENTRY et al., 2002; FERREIRA-DIAS et al., 2005), agindo ainda, no mecanismo que envolve a ovulação e luteinização folicular (ABDELNABY et al., 2016), bem como a maturação dos ovócitos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2009).

No entanto, níveis plasmáticos elevados de leptina, juntamente com condições clínicas de obesidade, estão correlacionados com ciclos estrais alterados, devido a intervalos interovulatórios aumentados (SESSIONS et al., 2004) com um período prolongado de aumento de progesterona sérica circulante (37 a 78 dias) (VICK et al., 2006), relacionados com a presença de corpo lúteo persistente e/ou a maior incidência de luteinização de folículos anovulatórios (MCCUE e SQUIRES, 2002), causados pela supressão ou inibição da ovulação em éguas obesas (MCCUE, 2000; VICK et al., 2006).

Com o intuito de verificar o grau de adiposidade desses animais, técnicas subjetivas aliadas à avaliação ultrassonográfica da base da cauda e a espessura da adiposidade na crista do pescoço, podem ser utilizadas a campo, facilitando a identificação de animais predispostos a alterações metabólicas e reprodutivas (JOHNSON, 2002; TREIBER et al., 2006).

Outro método indicador do *status* energético em equinos é a quantificação sérica de triglicerídeos (FRANK et al., 2006). Vários estudos (JOHNSON et al., 2009; THATCHER et al., 2008; WYSE e MCNIE, 2008) tem sido publicados sobre a incidência de obesidade em equinos, demonstrando ser este um problema em potencial na espécie.

Este aumento no índice de animais obesos é reflexo dos novos métodos de criação desses animais, sendo muitos deles alimentados com rações inadequadas para o intervalo nutricional ao qual são geneticamente adaptados e o tipo de atividade que praticam, causando um aumento dramático na incidência de obesidade e doenças metabólicas (DUGDALE et al., 2011). Foi proposto que os cavalos modernos herdaram genes que evoluíram para apoiar um estilo de vida fisicamente ativo e que a domesticação contribui para o risco de doença crônica (JOHNSON et al., 2009; MORLEY e MURRAY, 2014).

Sabe-se que o excesso de armazenamento de gordura corporal é um fator predisponente para diversos distúrbios clínicos, metabólicos e reprodutivos. Portanto, torna-se relevante avaliar a influência da obesidade no ciclo estral e no ambiente uterino da égua.

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de leptina e seu receptor no endométrio de equinos e verificar a influência da obesidade e do ciclo estral nesses marcadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

O estudo foi realizado em uma propriedade localizada no município de Pedras Altas (La -31.7325, Lo -53.5849, 31°43'57" S, 53°35'6" O), na região da campanha meridional do Rio Grande do Sul, durante os meses de setembro a dezembro de 2015. Foram utilizadas 20 éguas da raça Crioula, sem cria ao pé, com idades variando de 6 a 10 anos.

As éguas foram categorizadas conforme a condição corporal, que foi avaliada por um mesmo observador treinado através do sistema de avaliação da condição corporal (EC) originalmente descrito por HENNEKE et al. (1983) e modificado por KOHNKE (1992) que inclui uma escala de 9 pontos, sendo o EC 1 (muito magro) e o EC 9 (extremamente gordo). Além da condição corporal, a medida da gordura subcutânea na base da cauda (EGBC) (GENTRY et al., 2004), a espessura da crista do pescoço (ECP) e o peso corporal (PC) foram obtidas.

As éguas com EC 6 (moderado), compuseram o grupo controle (GrN) e as que apresentaram EC 8 e 9 (gordas ou obesas), formaram o grupo obeso (GrO). Os animais pertencentes a este estudo estavam em distinto manejo nutricional, sendo 10 fêmeas do GrN no manejo extensivo em campo nativo (bioma pampa) e 10 fêmeas do GrO, em campo nativo melhorado, onde houve a correção de acidez e fertilidade do solo, e a implantação de capim do Gênero *Cynodon*, recebendo também, alimento concentrado (Fibra Bruta (máx) 100g/kg, Proteína Bruta (mín) 120g/kg, Energia Digestível (3.300kcal)), duas vezes ao dia, totalizando 1,5% do peso vivo.

A EGBC foi avaliada através de um aparelho ultrassonográfico da marca SIUI, com frequência variando entre 5.0 a 7.5MHz e sonda linear, medindo a região da base da cauda, especificamente 7,62 cm cranial a base da cauda e 5 cm lateral, com a sonda posicionada transversalmente a linha média (GENTRY et al., 2004).

As estimativas de depósito de gordura na região da crista do pescoço foram obtidas através da identificação do ligamento nugal, o qual serviu como limite ventral da medida. A altura da crista do pescoço foi medida na porção média do comprimento total do pescoço (medida aferida da base da orelha até a porção mais alta da cernelha), estando este em posição relaxada a um ângulo de aproximadamente 45°. Estabelecida a porção média, o ligamento nugal foi localizado com o auxílio do aparelho ultrassonográfico, e uma fita métrica

posicionada dorsalmente ao ligamento nugal até a porção final do pescoço (CARTER et al., 2009).

As éguas selecionadas foram submetidas a exame clínico, ginecológico e ultrassonográfico transretal, a fim de identificar possíveis anormalidades no trato reprodutivo. Além disso, foi realizada uma avaliação bacteriológica, através do lavado uterino de baixo volume, e histopatologia do endométrio, a fim de descartar éguas cujo endométrio apresentava alterações moderadas a graves, segundo classificação descrita por Kenney e Doig (1986).

As éguas foram monitoradas diariamente através da palpação transretal e ultrassonografia, a fim de observar o desenvolvimento da onda folicular para identificar o momento ideal de coleta dos dados. A primeira coleta foi realizada durante o diestro, especificamente no oitavo dia após a ovulação e a segunda coleta foi feita no estro, quando o folículo dominante atingia um diâmetro de 35 mm e o útero apresentava características clínicas e ultrassonográficas compatíveis com esta fase.

No momento de cada coleta, os animais tiveram o PC, EC, EGBC e ECP avaliados, para monitorar possíveis mudanças no padrão corporal durante o seguimento do estudo.

Diante da distribuição dos animais e das análises de imunomarcção realizadas, os grupos foram montados da seguinte forma: **GrNE**: Grupo de éguas de escore corporal moderado no estro, **GrND**: Grupo de éguas de escore corporal moderado no diestro, **GrOE**: Grupo de éguas gordas/obesas no estro, **GrOD**: Grupo de éguas gordas/obesas no diestro, **IG-Ob**: Imunomarcção glandular da leptina, **IG-ObRb**: Imunomarcção glandular do receptor de leptina, **IL-Ob**: Imunomarcção do epitélio luminal da leptina, **IL-ObRb**: Imunomarcção do epitélio luminal do receptor de leptina.

Coleta das amostras

No dia anterior ao momento identificado para coleta das amostras, as éguas ficavam em jejum alimentar de 8 horas e na primeira hora da manhã, eram realizadas as coletas de sangue, através da punção externa da veia jugular, para análise sérica de leptina e triglicérides. Logo após esse procedimento, os animais eram submetidos à nova avaliação ginecológica e na sequência era feita a coleta de secreção endometrial através da lavagem uterina (apenas no estro) e a biópsia uterina, além da pesagem (em balança manual para animais de grande porte), avaliação do escore corporal, juntamente com a ultrassonografia da base da cauda e a avaliação da espessura da crista do pescoço.

O exame de cultura endometrial foi realizado durante o estro, através do lavado uterino em baixo volume (300 ml) com Ringer Lactato. Após a recuperação da amostra em um tubo Falcon de 50 ml, as amostras foram resfriadas e encaminhadas para o laboratório em 12 horas, para então ser realizada a centrifugação e a retirada do sobrenadante, sendo semeada apenas a porção final do líquido residual.

As biópsias endometriais foram realizadas com o auxílio de uma pinça de Yeoman. O material coletado foi fixado em paraformaldeído 4% em PBS durante 24-48hs. No laboratório de histopatologia as amostras foram submetidas à desidratação, diafanização e inclusão em parafina líquida (Paraplast®, Sigma, USA), cortadas em micrótomo e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) ou processadas para a técnica de imuno-histoquímica.

Avaliação de Leptina Sérica e Triglicerídeos

A coleta de 15ml de sangue foi realizada, após antissepsia prévia, através de punção externa da veia jugular utilizando sistema de tubos estéreis Vacutainer® sem anticoagulantes. As amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas a 1300 x g durante 15 minutos para separação de soro.

O material coletado foi congelado à -20°C para posterior avaliação de triglicerídios pelo método Enzimático (Triglicerídios – Labtest Diagnóstica S.A) e Leptina sérica pela técnica de Radioimunoensaio (RIA) kit de RIA de leptina multiespécies 125I (Catálogo num.: XL-85K), disponível comercialmente (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA), como descrito por Pelleymounter et al. (1995). O coeficiente de variação (CV) intra e inter-ensaio dos dois controles foram 2% e 8% e 6% e 7%, respectivamente.

Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi realizada em cortes de 5 µm obtidos em micrótomo automático e distendidos em lâminas impregnadas com parafina líquida (Paraplast®, Sigma, USA). Para a realização da técnica foram utilizados anticorpos primários policlonais (Ob A-20, Santa Cruz Biotechnology, C.A. USA): anticorpo anti-leptina Ob (A-20, SC-842 - rabbit) em diluição 1:500 o anticorpo anti-receptor da leptina OB-Rb (H-300 - rabbit), em diluição de 1:100. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com o Hydrogen Peroxide Block (kit Spring Bioscience, Biogen) e a recuperação antigênica em solução de citrato pH 6,0, em calor úmido sob pressão. O bloqueio da marcação inespecífica foi realizado com o Protein Block (kit

Spring Bioscience, Biogen) e para a diluição dos anticorpos foi utilizada albumina sérica bovina (BSA) à 1,5%.

Após a adição dos anticorpos primários, as lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. Logo após, foi adicionado um conjugado de anticorpo secundário-HRP, sendo as lâminas instiladas com o Kit Spring Reveal Complement® (10 min) e Kit Spring Reveal Conjugado® (15min) (kit LSAB - Dako K0690 Corporation, CA, USA). A incubação foi realizada a temperatura ambiente em câmara úmida tampada. A reação foi revelada por meio da adição de solução de diaminobenzidina-peroxidase (DAB® - peroxidase, Corporation CA, USA), acrescentada em tempo padrão para cada um dos cortes. Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Mayer filtrada por 1 minuto e as lamínulas foram fixadas com resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA)

Classificação e análise das estruturas selecionadas

Foram avaliadas nas amostras de endométrio as glândulas endometriais e o epitélio luminal, descritos na literatura em outras espécies como principais sítios de atuação da leptina e seu receptor.

As imagens analisadas foram capturadas por câmara digital (Moticam 5.0MP) acoplada a um microscópico de campo claro (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan) utilizando a objetiva de 40X. Foram capturados 5 campos contendo 10 estruturas em cada aumento. No total, foram avaliadas cerca de 2000 glândulas endometriais. As análises foram realizadas a partir do software ImageJ® utilizando-se o aplicativo 16-bit Histograma para a obtenção do valor de moda para cada área selecionada. Este aplicativo utiliza uma escala de 0 a 255, onde 0 indica maior intensidade de marcação e 255 indica ausência de marcação.

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os valores das modas, de cada uma das análises das estruturas classificadas, foram submetidos ao teste de ANOVA e realizada comparação de médias através do teste de Tukey pelo software *Statstix*® (2008). Para todas as análises estatísticas diferenças com $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

RESULTADOS

Nas avaliações de IHQ foram observadas marcações Ob e Ob-Rb no epitélio luminal e glandular em todos os momentos do ciclo estral analisados (Figura 1).

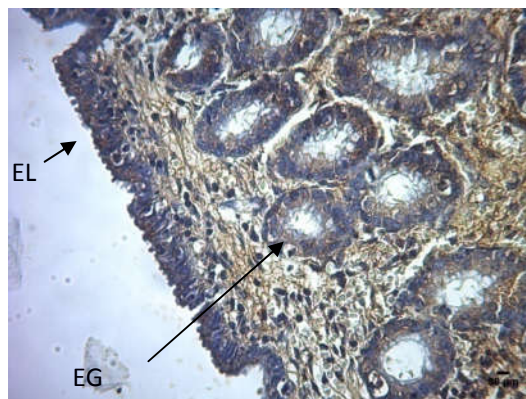


FIGURA 1. Micrografia de 40x do endométrio, demonstrando a imunomarcagem de Ob-Rb no epitélio luminal e glândulas endometriais. EL: Epitélio Luminal e EG: Epitélio Glandular.

Nas análises da imunomarcagem de leptina nas glândulas endometriais se verificou que no GrN não houve diferença na intensidade de marcação durante os períodos do ciclo estral avaliados, porém no GrO houve uma maior intensidade de marcação durante o diestro. Quando os períodos analisados foram comparados entre os grupo de éguas do GrN e GrO, houve diferença na imunomarcagem durante o estro, sendo mais intensa no GrN (Tabela 1).

Nas análises de imunomarcagem glandular com o receptor de leptina, houve em ambos os grupos (GrN e GrO) uma intensidade maior na imunomarcagem durante o diestro e quando os períodos do ciclo estral foram comparados entre os grupos, houve diferença entre as médias em ambos períodos avaliados, sendo mais intensa a marcação nas éguas do GRN (Tabela 1).

TABELA 1. Valores médios (\pm erro padrão da média) das modas das variáveis das imunomarcações* nas glândulas endometriais de leptina e do receptor de leptina.

GRUPOS	IG-Ob	IG-ObRb
GrNE	162.09 \pm 0.39A	147.19 \pm 0.71aA
GrND	163.60 \pm 4.88	121.70 \pm 3.71bC
GrOE	176.59 \pm 2.97aB	166.70 \pm 1.18cB
GrOD	166.04 \pm 1.38b	133.57 \pm 2.73dD

Médias seguidas por letras minúsculas e maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$). Letras minúsculas representam as diferenças estatísticas dentro de cada grupo e letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos (GrN x GrO).

*0: marcação intensa; 255: sem marcação

GrNE: Grupo de éguas de escore corporal moderado no estro, **GrND:** Grupo de éguas de escore corporal moderado no diestro, **GrOE:** Grupo de éguas gordas/obesas no estro, **GrOD:** Grupo de éguas gordas/obesas no diestro, **IG-Ob:** Imunomarcação glandular de leptina, **IG-ObRb:** Imunomarcação glandular do receptor de leptina.

Como observado nas glândulas endometriais, no epitélio luminal, também se verificou uma maior imunomarcação do receptor de leptina durante o diestro no GrN. Quando os grupos foram comparados (GrND e GrOD) na imunomarcação de Ob-Rb, houve uma marcação mais intensa no grupo de EC moderado e quando Ob foi considerado entre os grupos, a marcação foi mais intensa no GrNE (Tabela 2).

TABELA 2. Valores médios (\pm erro padrão da média) das modas das variáveis imunomarcações* do epitélio luminal de leptina e do seu receptor funcional.

GRUPOS	IL-Ob	IL-ObRb
GrNE	166.80 \pm 2.72A	164.8044 \pm 2.56a
GrND	170.92 \pm 5.38	142.68 \pm 4.97bA
GrOE	183.80 \pm 3.16B	168.47 \pm 0.90
GrOD	176.96 \pm 2.43	164.41 \pm 7.82B

Médias seguidas por letras minúsculas e maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$). Letras minúsculas representam as diferenças estatísticas dentro de cada grupo e letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos (GrN x GrO).

*0: marcação intensa; 255: sem marcação

GrNE: Grupo de éguas de escore corporal moderado no estro, **GrND:** Grupo de éguas de escore corporal moderado no diestro, **GrOE:** Grupo de éguas gordas/obesas no estro, **GrOD:** Grupo de éguas gordas/obesas no diestro. **IL-Ob:** imunomarcação do epitélio luminal com leptina, **IL-ObRb:** imunomarcação do epitélio luminal do receptor de leptina.

As variáveis morfométricas apresentaram diferença entre os grupos de éguas de EC moderado e obeso, não havendo diferença entre os períodos do ciclo estral analisados dentro de cada grupo (Tabela 3). Os níveis de leptina sérica e de triglicérides não apresentaram

diferença entre os períodos do ciclo estral nos grupos, e não diferiram entre éguas do GrN e do GrO.

TABELA 3. Valores médios (\pm erro padrão da média) das variáveis peso corporal, espessura de gordura na base da cauda, espessura da crista do pescoço, triglicerídeos e leptina.

GP	PC (Kg)	EGBC (mm)	ECP(cm)	TAG (mg/dL)	LEP(ng/mL)
GrNE	391.33 \pm 7.88a	6.56 \pm 0.39a	4.41 \pm 0.10a	27.26 \pm 2.45	5.8 \pm 0.07
GrND	383.20 \pm 6.76a	6.60 \pm 0.35a	4.18 \pm 0.06a	28.07 \pm 3.07	5.4 \pm 0.05
GrOE	476.71 \pm 5.13b	15.73 \pm 1.07b	6.5 \pm 0.33b	30.04 \pm 4.43	7.7 \pm 0.06
GrOD	478.40 \pm 4.79b	15.43 \pm 1.75b	6.62 \pm 0.40b	34.46 \pm 3.39	6.6 \pm 0.05

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$).

GrNE: Grupo de éguas de escore corporal moderado no estro, **GrND:** Grupo de éguas de escore corporal moderado no diestro, **GrOE:** Grupo de éguas gordas/obesas no estro, **GrOD:** Grupo de éguas gordas/obesas no diestro, **PC:** Peso Corporal, **EGBC:** Espessura de gordura na base da cauda, **ECP:** Espessura da crista do pescoço, **TAG:** Triglicerídeos, **LEP:** Leptina.

DISCUSSÃO

A diferença nas variáveis morfométricas observadas em nosso estudo entre os grupos de EC moderado e obesas vem ao encontro do que a literatura referencia, o peso corporal, a espessura de gordura na base da cauda e a espessura da crista do pescoço se correlacionam positivamente com as alterações no escore corporal (KEARNS et al., 2006; CAVINDER et al., 2007).

Não houve diferença nos níveis séricos de triglicerídeos e leptina entre os grupos de éguas com diferentes escores corporais. Esses resultados podem ser justificados pelo fato de que os animais obesos presentes nesse estudo, apresentavam os valores de TAG e LEP dentro de um padrão de normalidade fisiológica, não havendo uma diferença suficientemente grande no acúmulo de gordura corporal entre as éguas dos dois grupos, capaz de promover uma elevação significativa nos níveis dessas suas variáveis, sendo estas mantidas, portanto, dentro dos valores de referência (TAG: 4-44mg/dL; LEP <10,0 ng/ml)(GONZÁLES e SILVA, 2006; WALLER et al., 2006).

Nas análises dos níveis de leptina sérica durante o ciclo estral, não foram observadas diferenças no padrão de secreção nos períodos avaliados. O resultado encontrado em nosso estudo concorda com as observações realizadas por AbolEl-Maaty et al. (2013), os quais avaliaram os níveis de leptina sérica durante o estro e diestro em éguas da raça Árabe e observaram que não houve diferença entre os períodos avaliados, embora tenham verificado

uma correlação positiva entre os níveis séricos de leptina e estradiol ($r = 0.58$, $p < 0.025$). Cavinder et al. (2007), avaliando a leptina sérica em éguas pós-parto em diferentes estágios do ciclo estral (estro e diestro) e distinta condição corporal (normais e obesas), também não observaram diferenças entre os grupos nos momentos avaliados.

No entanto, Abdelnaby et al. (2016) perceberam maiores níveis de leptina sérica em éguas entre o dia -5 da ovulação até o dia da ovulação (dia 0), sugerindo que essa elevação acompanharia o aumento do fluxo sanguíneo no corpo uterino, havendo dessa forma, uma influência da leptina na regulação do fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo da égua.

Em outras espécies, como em bovinos e humanos, foram observadas diferenças nos níveis de leptina sérica durante o ciclo estral. Em bovinos, Garcia et al. (2002) observaram que a leptina sérica tendeu a decrescer durante a fase lútea tardia e começo da fase folicular, não sendo observadas diferenças no restante das fases do ciclo estral. Nas mulheres, as concentrações sanguíneas de leptina se correlacionam com as concentrações de progesterona durante o ciclo menstrual, coincidindo com o pico de concentração de ambos os hormônios na fase lútea (HARDIE, 1997).

Alterações na intensidade das imunomarcações de leptina e seu receptor nas glândulas endometriais durante o ciclo estral, também estão documentados na literatura em algumas espécies. Em equinos, até o presente momento, não foram encontradas publicações sobre a presença de imunomarcadores de leptina e seu receptor no endométrio. Neste estudo, percebemos que houve uma imunomarcação de Ob no epitélio glandular mais intensa durante o diestro, porém tal resultado foi verificado apenas no GrO. No entanto, quando Ob-Rb foi avaliado, pode-se perceber uma marcação imunológica celular mais intensa durante o diestro, em ambos os grupos. As mesmas tendências puderam ser percebidas na marcação imunológica de leptina e seu receptor no epitélio luminal.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os observados por Sosa et al. (2010), em bovinos, os quais demonstraram pela primeira vez que a expressão do gene do receptor da leptina variava durante o ciclo estral, indicando um possível envolvimento dos hormônio esteróides sexuais na sua regulação. Os autores observaram que a expressão do receptor foi maior durante a fase lútea, sugerindo que a alta sensibilidade à leptina no ambiente uterino nos dias 12 e 19 do ciclo estral, pode ocorrer pela influência da leptina na preparação do ambiente uterino para uma eventual prenhez.

Em suínos, a imunomarcação do receptor de leptina no útero é mais intensa no epitélio glandular quando os ovários dos animais estavam na fase lútea ($p < 0,05$) em relação à fase folicular (MOREIRA et al., 2014). Kitawakiet al. (2000) e Cervero et al. (2004) também

relatarem maior expressão do RNAm dos receptores de leptina (Ob-Rb) no endométrio de mulheres durante a fase luteal.

Quando os grupos foram comparados de acordo com o EC, houve uma marcação imunológica mais intensa nos animais de EC moderado. Tal resultado corrobora com os encontrados em humanos, onde a expressão da forma longa do receptor de leptina na placenta, mais especificamente no sinciciotrofoblasto e estroma viloso, foi significativamente menor nas mulheres obesas (FARLEY et al., 2010), resultado este, que confirma os dados publicados por Ogier et al. (2002), os quais perceberam uma expressão menor do receptor de leptina em mulheres que apresentavam níveis de leptina mais elevados. Segundo os autores, esses achados podem ser justificados pelo fato de a leptina exercer uma regulação negativa em seu receptor, ocorrendo uma situação análoga a de resistência a leptina. Estudos *in vitro*, comprovaram que a exposição a leptina induz uma regulação negativa dos receptores de leptina Ob-Ra e Ob-Rb, nas linhagens celulares avaliadas (UOTANI et al., 1999).

Tais resultados, corroboram com o observado por Wang et al. (2014) em suínos, que perceberam que a leptina pode auto-regular o seu receptor de cadeia longa, tanto positivamente como negativamente, dependendo do *status* fisiológico do animal, tipo e função dos tecidos envolvidos.

A expressão da leptina e de seu receptor no endométrio de equinos, ainda deve ser melhor elucidada. A participação desse hormônio na preparação uterina para gestação e fixação embrionária é bastante sugestiva. Muitos estudos em diferentes espécies relatam a participação da leptina no fluxo sanguíneo endometrial, na transformação e diferenciação uterina (ALFER et al., 2000), apoptose celular, e receptividade endometrial, estando presente em algumas espécies como suínos e roedores, em maior intensidade nos locais de implantação embrionária (MOREIRA et al., 2014; YOON et al., 2005).

CONCLUSÃO

Neste estudo foi comprovado a presença de leptina e seu receptor funcional no endométrio de equinos, sendo observada marcação no epitélio glandular e luminal, em todos os momentos do ciclo estral avaliados. Pode-se perceber que a imunomarcação do Ob-Rb foi mais intensa durante o diestro, independente do escore corporal, no entanto, apresentou-se de forma mais destacada no grupo de EC moderado, sugerindo que em éguas obesas, da mesma forma como ocorre em mulheres com sobrepeso, os receptores de leptina podem ser regulados negativamente pela leptina, sendo, portanto, expresso em menores quantidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABY EA, EL-MAATY A, RAGAB RSA, SEIDA AA. Assessment of Uterine Vascular Perfusion During the Estrous Cycle of Mares in Connection to Circulating Leptin and Nitric Oxide Concentrations. **J Equine Vet Sci** 39; 25–32, 2016.

ABOEL-MAATY AM, SHATA FYH, GABR FI, MAHMOUD MB-E. Leptin, Insulin Like growth factor-I, Nitric oxide, thyroid and ovarian hormones in serum of early pregnant and cyclic Arab mares with or without clinical endometritis. **SJIF** 2 (4); 2013.

ALFER J, MULLER-SCHOTTLE F, CLASSEN-LINKE I, VON RANGO U, HAPPEL L, BEIER-HELLWIG K, RATH W, BEIER HM. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. **Mol Hum Reprod** 6; 595–60, 2000.

BUDAK E, FERNÁNDEZ SÁNCHEZ M, BELLVER J, CERVERÓ A, SIMÓN C, PELLICER A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. **Fertil Steril** 85 (6); 1563-1581, 2006.

BUFF PR, DODDS AC, MORRISON CD, WHITLEY NC, MCFADIN EL, DANIEL JA. Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. **J Anim Sci** 80 (11); 2942-2948, 2002.

CARTER RA, GEOR RJ, BURTON STANIAR W, CUBUITT TA, HARRIS PA. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. **Vet J** 179; 204–10, 2009.

CAVINDER CA, VOGELSANG MM, GIBBS PG, FORREST DW, SCHMITZ DG. Endocrine Profile Comparisons of Fat Versus Moderately Conditioned Mares Following Parturition. **J Equine Vet Sci** 27 (2); 72-97, 2007.

CERVERO A, HORCAJADAS JA, MARTIN J, PELLICER A, SIMO NC. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. **J Clin Endocrinol Metabol** 89; 2442–2451, 2004.

CHELIKANI PK, GLIMM DR, KENNELLY JJ. Short communication: tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **J Dairy Sci** 86; 2369–2372, 2003.

CHILLIARD Y, BONNET M, DELAVALD C, FAULCONNIER Y, LEROUX C, DJIANE J, BOCQUIER F. 2001. Leptin in ruminants: gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domest Anim Endocrinol** 21; 271–295, 2001.

DUGDALE AH, CURTISG C, CRIPPS PJ, HARRIS PA, ARGO CM. Effects of season and body condition on appetite, body mass and body composition in ad libitum fed pony mares. **Vet J** 190 (3); 329–37, 2011.

FARLEY DM, CHOI J, DUDLEY DJ, et al. Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity. **Placenta** 31 (8); 718-724, 2010.

FERREIRA-DIAS G, CLAUDINO F, CARVALHO H, AGRÍCOLA R, ALPOIM-MOREIRA J, SILVA JR. Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, bodyweight and immune status. **Dom Anim End** 29; 203-213, 2005.

FORHEAD AJ, FRENCH J, IKIN P, et al. Relationship between plasma insulin and triglyceride concentrations in hypertriglyceridaemic donkeys. **Res Vet Sci** 56; 389–392, 1994.

FRANK N, ELLIOTT SB, BRANDT LE, KEISLER DH. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. **J Am Vet Med Assoc** 228 (9); 1383-1390, 2006.

GARCIA MR, AMSTALDEN M, WILLIAMS SW, STANKO RL, MORRISON CD, KEISLER DH, WILLIAMS GL. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **J Anim Sci** 80 (8); 2158-2167, 2002.

GENTRY LR, THOMPSON DL, GENTRY GT, DAVIS KA, GODKE RA, CARTMILL JA. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **J Anim Sci** 80 (10); 2695-2703, 2002.

GENTRY LR, THOMPSON DL, GENTRY GT, et al. The Relationship Between Body Condition Score and Ultrasonic Fat Measurements in Mares of High Versus Low Body Condition. **J Equine Vet Sci** 377 (24); 198-203, 2004.

GUERRE-MILLO M. Adipose tissue secretory function: Implication in metabolic and cardiovascular complications of obesity. **J Soc Biol** 37–43, 2006.

HARDIE L, TRAYHURN P, ABRAMOVICH D, FOWLER P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. **Clin Endocrinol** 47; 101-106, 1997.

HENNEKE DR, POTTERGD, KRIEDER JL, YEATES BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Vet J** 379 (15); 371–372, 1983.

JOHNSON PJ. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. **Vet Clin North Am Equine Pract** 18; 271–293, 2002.

JOHNSON PJ, WIEDMEYER CE, MESSER NT, GANJAM VK. Medical implications of obesity in horses—lessons for human obesity. **J Diabetes Sci Technology** 3 (1); 163–74, 2009.

KEARNS CF, MCKEEVER KH, ROEGNER V, BRADY SM, MALINOWSKI K. Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. **Vet J** 172 (3); 460-465, 2006.

KENNEY RM, DOIG PA. **Equine endometrial biopsy**. In Morrow, D.A. (Hrsg.): Current therapy in theriogenology 2. W.B. Saunders, Comp., Philadelphia, 1986. 723-729 p.

KITAWAKI J, KOSHIBA H, ISHIHARA H, KUSUKI I, TSUKAMOTO K, HONJO H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab** 85; 1946-1950, 2000.

KOHNKE J. **Feeding and Nutrition: The Making of a Champion**. Australia. Birubi Pacific, Pymble, 1992. 163-166 p.

LANGE-CONSIGLIO A, DELL'AQUILA ME, FIANDANESE N, AMBRUOSI B, CHOYS, BOSI G, ARRIGHI S, LACALANDRA GM, CREMONESI F. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. **Reprod Biol Endocrinol**. 7; 113, 2009.

LANGE-CONSIGLIO A, ARRIGHI S, FIANDANESE N, POCAR P, ARALLA M, BOSI G, BORROMEO V, BERRINI A, MEUCCI A, DELL'AQUILA ME, CREMONESI F. Follicular fluid leptin concentrations and expression of leptin and leptin receptor in the equine ovary and in-vitro-matured oocyte with reference to pubertal development and breeds. **Reprod Fertil Dev** 25; 837-846, 2013.

MCCUE P. **Diagnosis of ovarian abnormalities**. In 'Recent Advances in Equine reproduction'. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. 17-Oct-2000.

MCCUE PM, SQUIRES EL. Persistent anovulatory follicles in the mare. **Theriogenology** 58; 541-543, 2002.

MERCER JG, HOGGARD N, WILLIAMS LM, LAWRENCE CB, HANNAH LT, TRAYHURN P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett** 387; 113-6, 1996.

MOREIRA F, GHELLER SM, MONDADORI RG, VARELA JÚNIOR AS, CORCINI CD, LUCIA T JR. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus, uterus and ovaries of Swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reprod Domest Anim** 49 (6); 1074-8, 2014.

MORLEY SA, MURRAY JA. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. **J Equine Vet Sci** 34; 842-853, 2014.

MOSCHOS S, CHAN JL, MANTZOROS CS. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril** 77 (3); 433-44, 2002.

OGIER V, ZIEGLER O, MEJEAN L, NICOLAS JP, STRICKER-KRONGRAD A. Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord** 26 (4); 496-503, 2002.

PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, BAKER MB, HECHT R, WINTERS D, BOONE T, COLLINS F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science** 28; 269 (5223):540-3, 1995.

RAMSAY TG. Porcine leptin inhibits lipogenesis in porcine adipocytes. **J Anim Sci** 81; 3008–17, 2003.

SESSIONS DR, REEDY S E, VICK M M, MURPHY B A, FITZGERALD B P. Development of a model for inducing transient insulin resistance in the mare: Preliminary implications regarding the estrous cycle. **J Anim Sci** 82; 2321–2328, 2004.

SMOLINSKA N, SIAWRYS G, KAMINSKI T, PRZALA J. Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs. **J Physiol Pharmacol** 58; 563–581, 2007.

SOSA C, CARRIQUIRY M, CHALARC C, CRESPI D, SANGUINETTI C, CAVESTANY D, MEIKLE A. Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. **Anim Reprod Sci** 122; 208–214, 2010.

TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMP LA, CLARK FT, DEEDS J. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell** 83; 1263–1271, 1995.

THATCHER CD, PLEASANT RS, GEOR RJ, ELVINGER F, NEGRIN KA, FRANKLIN J, GAY L, WERE SR. Prevalence of obesity in mature horses: an equine body condition study. **J Anim Physiol An** 92(2); 222, 2008.

TREIBER KH, KRONFELD DS, GEOR RJ. Insulin Resistance in Equids: Possible Role in Laminitis. **J Nutr** 136(7); 2094S-22098, 2006.

UOTANI S, BJORBAEK C, TORNOE J, FLIER JS. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. **Diabetes** 48; 279 – 286, 1999.

VICK MM, SESSIONS DR, MURPHY BA, KENNEDY EL, REEDY SE, FITZGERALD BP. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: Effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. **Reprod Fertil Dev** 18; 609–617, 2006.

WALLER CA, DONALD L, THOMPSON Jr. DL, CARTMILL JA, STORER WA, HUFF NK. Reproduction in high body condition mares with high versus low leptin concentrations. **Theriogenology** 66; 923-928, 2006.

WANG H, FU J, WANG A. Expression of obesity gene and obesity gene long form receptor in endometrium of Yorkshire sows during embryo implantation. **Mol Biol Rep** 41; 1597–1606, 2014.

WYSE C, MCNIE K. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. **Vet Rec** 162; 590–1, 2008.

YOON SJ, CHA KY, LEE KA. Leptin receptors are downregulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. **Mol Cell Endocrinol** 232; 27–35, 2005.

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 372; 425-32, 1994.

4. ARTIGO 2

Influência do cortisol e leptina do fluido folicular nos marcadores de leptina no endométrio.

Millie de Oliveira Marchiori^{12*}, Luis Otávio Centeno², Fernanda Maria Pazinato³,
Sandra Fiala Rechsteiner²

1-Programa de Pós-graduação em Medicina Animal:equinos - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul – Brasil;

2- HISTOREP – Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal De Pelotas – RS – Brasil

3-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal De Pelotas – RS – Brasil
*millievet@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar em uma condição de manejo adverso e estressante, a influência do cortisol intrafolicular, nos níveis foliculares de leptina e nos marcadores de leptina (Ob) e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio durante diferentes fases do ciclo estral. Foram coletados 36 tratos reprodutivos (o útero e seus respectivos ovários), oriundos de éguas sem raça definida, abatidas em frigorífico, e agrupadas em uma condição predisponente ao estresse social, apresentando escore corporal considerado moderado (EC=06) e idade variando entre 05 e 10 anos. Os grupos foram distribuídos conforme a dimensão do maior folículo encontrado em cada trato reprodutor, ficando assim divididos: 08 éguas no G1 (13-22mm), 11 éguas G2 (25-34mm) e 17 éguas G3 (35-45mm). O líquido do maior folículo foi extraído para avaliação de leptina e cortisol, e dois fragmentos uterinos foram retirados e encaminhados para avaliação histopatológica e para realização da técnica de imunohistoquímica, com anticorpos policlonais anti-leptina e seu receptor. Não houve influência do cortisol intrafolicular nas variáveis avaliadas, provavelmente porque os níveis de cortisol mantiveram-se dentro dos valores fisiológicos para a espécie, apesar da condição ambiental adversa. No entanto, pode-se verificar uma correlação positiva entre os níveis intrafoliculares de cortisol e leptina, havendo uma elevação, dentro dos valores de referência, nos níveis de cortisol ($30.1 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$, $P < 0,05$) nos folículos mais próximos a ovulação. Pode-se perceber também, que a marcação imunológica do receptor de leptina foi mais intensa (144.52 ± 3.17 ,

P<0,0001) nos animais que apresentavam folículos até 22 mm, estando ambos Ob e Ob-Rb correlacionados de forma negativa (r: -0.7836; P < 0.0001, r:-0.7343; P < 0.0001), com os níveis de cortisol no fluido folicular.

Palavras-Chave:Cortisol, leptina, estresse, endométrio

Influence of cortisol and leptin the follicular fluid on leptin markers in the endometrium.

Abstract

The objective of this study was to evaluate in a hostile and stressful handling condition, the influence of intrafollicular cortisol in follicular levels of leptin and leptin markers (ob) and its receptor (OB-Rb) in the endometrium during different stages of the estrous cycle..Thirty six reproductive tracts (the uterus and in ovaries) were collected from mixed breed mares in an abattoir, grouped in a predisposing condition to social stress, with good body condition (06) and aged between 5-10 years. The groups were divided according to the size of the largest follicle found in each reproductive tract: 08 mares in G1 (13-22mm), 11 mares G2 (25-34mm) and 17 mares G3 (35-45mm). The largest follicle fluid was extracted for evaluation of cortisol and leptin, and two uterinefragments were removed and sent for histopathological evaluation and immunohistochemical technique using anti-leptin polyclonal and its receptor. There was no influence of intrafollicular cortisol on the variables evaluated, probably because cortisol levels remained within the physiological values for the species, despite the adverse environmental condition. However, a positive correlation was demonstrated between intrafollicular cortisol and leptin, with an increase within the reference values, in cortisol levels (30.1 ± 0.07 ng/ml, P <0.05) in the folliclesnear ovulation. It can also be noticed that the immunological labeling of the leptin receptor was more intense (144.52 ± 3.17 , P <0.0001) in animals with follicles up to 22 mm, both ob and Ob-Rb correlating negatively (r: -0.7836; P <0.0001, r: -0.7343; P <0.0001), with cortisol levels in follicular fluid.

Key Words: Cortisol, leptin. stress, endometrium

INTRODUÇÃO

Considerado o glicocorticóide mais potente do organismo, o cortisol é um dos principais fatores que intermedeiam efeitos supressores do estresse nas funções reprodutivas (BOTTONS et al., 1972). Interações entre os eixos hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) são normalmente benéficas, pois mantêm um equilíbrio de liberação hormonal, que reflete positivamente na atividade reprodutiva. No entanto, em situação de desequilíbrio da homeostase corporal, como nos casos de stress agudo ou crônico, a ativação do eixo HHA resulta na elevação dos níveis séricos de cortisol, o qual em excesso na circulação, atua de forma negativa no eixo HHG, inibindo a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, conseqüentemente, diminuindo a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) (ASA e GINTHER, 1982), alterando o efeito estimulatório das gonadotrofinas (RIVIER e RIVEST, 1991; PEREIRA, 2005), interferindo nas ações dos esteróides ovarianos nos tecidos alvo (ASA e GINTHER, 1982; FERRIS e MCCUE, 2010).

O estresse é definido como o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e desequilíbrio da homeostasia. Situações de estresse como o transporte prolongado (FAZIO et al., 2008), a perda do ambiente normal e dos companheiros sociais (ALEXANDER e IRVINE, 1998; MALSCHITZKY et al., 2015), esforço físico (KELLEY et al., 2011), podem influenciar negativamente a atividade reprodutiva na criação de equinos, devido ao aumento das concentrações séricas de cortisol (>100-150ng/ml) (KEDZIERSKI e CYWINSKA, 2014).

Em outras espécies, como mulheres (RABIN et al., 1990), roedores (SMITH et al., 1971), ovelhas (MACFARLANE et al., 2000) e bovinos (MANN, 2001), a influência negativa do cortisol na reprodução também foi observada.

Apesar dos inúmeros estudos que abordam a influência do estresse na reprodução em mamíferos, poucos são os artigos publicados avaliando a ação do cortisol no fluido folicular (FF). Scarlet et al. (2017), observaram que o cortisol presente no FF de equinos, se correlaciona com os níveis séricos deste hormônio, provavelmente devido ao fato de que o cortisol nessa espécie, não ser produzido pelos ovários (OMURA e MOROHASHI, 1995), chegando aos folículos ovarianos através da circulação sanguínea, onde é em grande parte ligado à globulina de ligação dos corticosteróides (CBG) (GAYRARD et al., 1996; SCARLET et al., 2017).

Segundo Scarlet et al. (2017), quando em níveis fisiológicos normais, o cortisol presente no FF auxilia na diminuição do processo inflamatório durante a ovulação e na maturação do oócito.

Outro hormônio que possui influência na reprodução de equinos é a leptina, a qual é produzida principalmente pelo tecido adiposo subcutâneo, havendo um estímulo direto dos corticosteróides na estimulação de sua síntese (GENTRY et al., 2002; CARTMILL et al., 2003). No entanto, a elevação plasmática do cortisol não é sempre refletida por um aumento simultâneo da leptina circulante, em equinos essas elevações podem ser independentes (GORDON et al., 2007; STORER et al., 2007; VAN WEYENBERG et al., 2008).

A leptina, codificada pelo gene OB, é uma proteína sinalizadora, uma vez que tem como principal função transmitir ao cérebro informação sobre as reservas de gordura corporal, possuindo também diversas funções metabólicas e reprodutivas (ZHANG et al., 1994; BARASH et al., 1996; VICK et al., 2006).

O mecanismo de ação da leptina (Ob-R) ocorre através de sua ligação aos receptores específicos, os quais se apresentam em seis diferentes isoformas, porém apenas a forma longa do receptor, Ob-Rb, um receptor transmembrana, é capaz de efetivar transdução de sinal para as células específicas (HAKANSSON et al., 1998; MOREIRA et al., 2014).

Receptores para leptina em equinos são encontrados em diversos tecidos, incluindo hipotálamo, adenohipófise (BUFF et al., 2002) e ovários (fluido folicular, células luteínicas e oócitos imaturos) (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013). Nos seres humanos (GONZÁLEZ et al., 2000), suínos (SMOLINSKA et al., 2007; MOREIRA et al., 2014) e bovinos (THORN et al., 2007), a leptina e seu receptor também foram encontrados em tecidos do aparelho reprodutivo, incluindo o endométrio, mais especificamente na porção glandular e no epitélio luminal.

A leptina tem um papel regulador no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal quando se encontra na circulação sanguínea em concentrações fisiológicas normais (<10,0 ng/mL) (WALLER et al., 2006; FERREIRA-DIAS et al., 2005), porém quando em excesso, pode apresentar uma ação negativa no sistema reprodutivo, estando correlacionada com aumento do período interovulatório (SESSIONS et al., 2004) e maior incidência de folículos anovulatórios (VICK et al., 2006), interferindo no potencial reprodutivo.

Níveis séricos de leptina se correlacionam positivamente com as concentrações intrafoliculares (GASTAL et al., 2010), e elevados níveis desse hormônio, causados pelo estímulo de glicocorticóides ou por fatores que promovem sua síntese, como o acúmulo excessivo de gordura corporal, podem ocasionar também em outras espécies, um

desequilíbrio da função reprodutiva, sendo observado em mulheres, alterações na esteroidogênese dos ovários e no processo de luteinização (CIOFFI et al., 1997; TAMER e SENTURK, 2009).

O objetivo do estudo foi avaliar em uma condição de manejo adverso e estressante, a influência do cortisol presente no fluido folicular, nos níveis de leptina intrafolicular e nos marcadores de leptina (Ob) e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio, durante diferentes fases do ciclo estral.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais e tratos reprodutivos

Foram coletados 60 tratos reprodutivos de equinos, compostos pelo útero e seus respectivos ovários, oriundos de um abatedouro na região sudoeste do Rio Grande do Sul, entre o período de novembro a janeiro de 2015. Os animais pertencentes a este estudo chegaram ao abatedouro, provenientes de diversos locais do estado do Rio Grande do Sul, em caminhões, ficando aleatoriamente distribuídos em piquetes durante 05 dias e 24 horas antes do abate, foram recolhidos para mangueiras de alvenaria, com a finalidade de jejum alimentar. Os animais pertencentes ao estudo foram previamente selecionados conforme o escore de condição corporal (EC) e a idade.

O EC foi avaliado por um mesmo observador treinado, através do sistema de avaliação da condição corporal (EC), originalmente descrito por HENNEKE et al. (1983) e modificado por KOHNKE (1992), que inclui uma escala de 9 pontos, sendo o EC 1 (muito magro) e o EC 9 (extremamente gordo). O sistema EC, segundo KOHNKE (1992), consiste na análise tátil e visual de seis regiões anatômicas do corpo (pescoço, cernelha, lombo, base da cauda, costelas, ombro). Para cada região é definida uma nota e através da média das seis pontuações se chega ao resultado final.

Apenas éguas com escore corporal moderado (EC 6) foram incluídas no projeto. Os animais escolhidos apresentavam idade que variava entre 05 a 10 anos, conforme dados do abatedouro de identificação individual dos animais.

O material coletado foi identificado com o número do animal e levado ao laboratório para avaliação macroscópica dos órgãos genitais. Das amostras que não apresentavam alterações macroscópicas, foi realizada a coleta para exame bacteriológico, através de swab ginecológico, preservado em meio “Stuart”, além de dois fragmentos do corpo do útero.

Um dos fragmentos foi colocado em solução de Bouin, para exame histopatológico prévio e seleção das amostras e a outra fração, fixada em paraformolaldeído 4% em PBS durante 24-48hs, para realização da técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

Foi realizada também, a medição dos folículos dos ovários correspondentes, através de um paquímetro e aspiração do líquido intrafolicular do maior folículo presente nos ovários, com o auxílio de uma agulha 0,80 x 25 mm e uma seringa de 5 ml.

Os tratos reprodutivos que apresentavam alterações macroscópicas, como gestação, coloração alterada e/ou presença de secreção purulenta, que apresentaram exame bacteriológico positivo ou que no exame histopatológico apresentavam endométrio com alterações moderadas a graves como: infiltrado difuso por neutrófilos, infiltrado mononuclear moderado, com ou sem formação de acúmulos linfóides e presença de lacunas linfáticas, fibrose focal moderada associada ou não com dilatação discreta ou moderada de algumas glândulas (de acordo com Kenney e Doig, 1986), foram retiradas do estudo.

Após a avaliação inicial, 36 amostras foram selecionadas, sendo estas distribuídas em 03 grupos conforme o tamanho folicular: 08 éguas no G1 (13-22mm), 11 éguas G2 (25-34mm) e 17 éguas G3 (35-45mm).

Processamento do Material

As amostras do FF foram centrifugadas durante 10 min a 1300 x g e o líquido folicular sobrenadante foi devidamente identificado, dividido em 02 eppendorfs, os quais foram conservados a temperatura de -20°C. As amostras foram encaminhadas para processamento em laboratório, com o intuito de quantificar os níveis intrafoliculares de leptina e cortisol.

Os fragmentos uterinos destinados a técnica de imuno-histoquímica foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS durante 24-48hs e processados primeiramente no laboratório de histopatologia, onde passaram pelo processo de desidratação, diafanização e inclusão em parafina líquida (Paraplast®, Sigma, USA).

Avaliação da Leptina e Cortisol do fluido folicular

Para aferir os níveis intrafoliculares de leptina foi realizada a técnica de Radioimunoensaio (RIA), kit de RIA de leptina multiespécies 125I (Catálogo: XL-85K), disponível comercialmente (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA), como descrito por PELLEYMOUNTER et al. (1995).

O Cortisol foi medido pela técnica de Quimioluminescência (CRUZ et al., 2012), kit comercializado pela Siemens[®], sendo utilizado o aparelho Immulite 1000[®]. As dosagens foram realizadas em duplicata. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio em ambas as análises foram inferiores a 10%.

Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi realizada em cortes de 5 µm obtidos em micrótomo automático e distendidos em lâminas impregnadas com parafina líquida (Paraplast[®], Sigma, USA). Para a realização da técnica, foram utilizados anticorpos primários policlonais (Ob A-20, Santa Cruz Biotechnology, C.A. USA): anticorpo anti-leptina Ob (A-20, sc-842 - rabbit) em diluição 1:500 e o anticorpo anti-receptor da leptina Ob-Rb (H-300 - rabbit), em diluição de 1:100. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com o Hydrogen Peroxide Block[®] (kit Spring Bioscience, Biogen) e a recuperação antigênica em solução de citrato pH 6.0, em calor úmido sob pressão. O bloqueio da marcação inespecífica foi realizado com o ProteinBlock[®] (kit Spring Bioscience, Biogen) e para a diluição dos anticorpos foi utilizado albumina sérica bovina (BSA) a 1,5%.

Após a adição dos anticorpos primários, as lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. Logo após, foi adicionado o anticorpo secundário, sendo as lâminas instiladas com o Kit Spring Reveal Complement[®] (10 min) e Kit Spring Reveal Conjugado[®] (15min) (kit LSAB - Dako K0690 Corporation, CA, USA). A incubação foi realizada a temperatura ambiente em câmara úmida tampada. A reação foi revelada por meio da adição de solução de diaminobenzidina-peroxidase (DAB[®] - peroxidase, Corporation CA, USA), acrescentada em tempo padrão para cada um dos cortes. Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Mayer[®] filtrada por 1 minuto e as lamínulas foram fixadas com resina sintética (Sigma Chemical Company[®], St. Louis, MO, USA).

Foram avaliadas nas lâminas do endométrio, as glândulas endometriais, descritas na literatura em outras espécies, como um dos principais sítios de atuação da leptina e seu receptor (LIN et al., 2001; SMOLINSKA et al., 2007; MOREIRA et al., 2014).

As imagens analisadas foram capturadas por câmera digital (Moticam 5.0MP) acoplada a microscópio de campo claro (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan) utilizando a objetiva de 40X. Foram capturados 5 campos contendo 10 estruturas glandulares em cada aumento. No total, foram avaliadas cerca de 1800 glândulas endometriais. As análises foram realizadas a partir do software Image J[®] utilizando-se o aplicativo 16-bit Histograma para a

obtenção do valor de moda para cada área selecionada. Este aplicativo utiliza uma escala de 0 a 255, onde 0 indica maior intensidade de marcação e 255 indica ausência de marcação, sendo este, um método eficaz para quantificar as alterações nas imunomarcações celulares (MOREIRA et al., 2014).

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os valores intrafolículos de leptina e cortisol, bem como das modas, de cada uma das estruturas classificadas, foram submetidos ao teste de ANOVA e realizada comparação de médias através do teste de Tukey pelo software *Statistix*® (2008). Para todas as análises estatísticas diferenças com $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

A Análise de Correlação de Pearson foi realizada a fim de estimar o grau de associação do cortisol no FF, com os níveis de leptina no FF e a intensidade da imunomarcação da leptina e seu receptor no endométrio.

RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstraram que houve imunomarcação para o receptor de leptina (Ob-Rb) no epitélio glandular nos três períodos do ciclo estral avaliados, havendo, no entanto, uma maior intensidade de imunomarcação de (Ob-Rb) (144.52 ± 3.17 , $P < 0,0001$) em éguas que apresentavam folículos de 13 a 22mm (Tabela 1).

TABELA 1. Valores médios (\pm erro padrão da média) das modas das imunomarcações* glandulares de leptina (Ob) e do receptor de leptina (Ob-Rb) no endométrio.

GRUPOS	Ob	Ob-Rb
G1:13 a 22mm (08)	162.43 \pm 3.07	144.52 \pm 3.17a
G2:25-34mm (11)	174.75 \pm 4.87	169.19 \pm 1.80b
G3:35-45 mm (17)	184.56 \pm 2.42	178.81 \pm 2.75b

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$).

*0: marcação intensa; 255: sem marcação

Na avaliação da imunomarcação celular para leptina, não foi observada diferença na intensidade de marcação (Tabela 1), apesar de estar presente no epitélio glandular em todos os

grupos avaliados. Na Figura 1, é possível visualizar as imagens das imunomarcações de Ob, Ob-Rb, e o controle (ausência de imunomarcação) no epitélio glandular, de um dos indivíduos analisados.

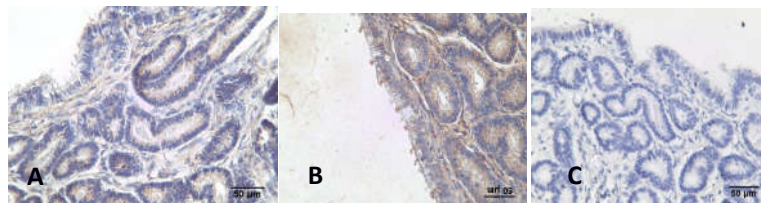


Figura 1. Imunomarcação de Ob e Ob-Rb no epitélio glandular do endométrio de éguas. A) Marcação imunológica de Ob no epitélio glandular, durante o período pré-ovulatório (G3), B) Marcação imunológica de Ob-Rb no epitélio glandular, durante o período pré-ovulatório (G3) C) Controle negativo, ausência de imunomarcação no epitélio glandular endometrial. (Fotomicrografia de 40X).

Os níveis intrafolículos de leptina não diferiram entre os três grupos, no entanto, os níveis de cortisol no FF, foram estatisticamente diferentes nos 03 grupos avaliados, sendo maiores (30.1 ± 0.07 ng/ml, $P < 0,05$) em éguas que apresentavam folículos entre 35-45 mm, pertencente ao G3, grupo de éguas com folículos pré-ovulatórios (Tabela 2), demonstrando um aumento gradativo à medida que os folículos aumentam de tamanho.

TABELA 2. Valores médios (\pm erro padrão da média) dos níveis de Leptina (ng/ml) e Cortisol (ng/ml) no fluido folicular.

GRUPOS	LEP (ng/ml)	CORTISOL (ng/ml)
G1:13 a 22mm (08)	2.87 ± 0.29	$15.2 \pm 0.13a$
G2:25-34mm (11)	3.16 ± 0.19	$20.5 \pm 0.21b$
G3:35-45 mm (17)	3.50 ± 0.08	$30.1 \pm 0.07.c$

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$).

Na correlação de Pearson, pode-se perceber uma forte associação entre a imunomarcação glandular de Ob e Ob-Rb ($r = 0.6435$; $P < 0.0001$) e entre os níveis de cortisol no FF e a marcação imunológica de Ob e Ob-Rb ($r = -0.7836$; $P < 0.0001$, $r = -0.7343$; $P < 0.0001$, respectivamente). Verificou-se também, uma correlação entre leptina e cortisol no FF ($r = 0.3928$, $P = 0.0177$) e leptina no FF e imunomarcação do Ob-Rb ($r = -0.4517$; $P = 0.0057$). Dessa forma, se torna claro que à medida que o cortisol aumenta, aumentam os níveis de leptina no FF, e quanto maiores os níveis no FF de cortisol, menor a intensidade de imunomarcação de leptina e seu receptor no endométrio.

DISCUSSÃO

Os níveis intrafoliculares de cortisol neste estudo, foram mais elevados em éguas que apresentavam folículos com diâmetro maiores, pertencendo ao grupo dos animais na fase pré-ovulatória (G3), (média±s.e.m.:G1: 15.2±0.13, G2: 20.5±0.21, G3: 30.1±0.07 ng/ml; $P < 0.01$). Estes resultados corroboram com dados publicados em equinos por Scarlet et al. (2017), os quais verificaram que as concentrações de cortisol no fluido folicular em éguas, eram maiores naqueles folículos que apresentavam diâmetro ≥ 25 mm. Segundo os autores, não foi verificado aumento nos níveis séricos de cortisol nesse período, concluindo que os mecanismos intrafoliculares que levam ao aumento do cortisol devem ser melhor elucidados.

São escassas as publicações a respeito da presença do cortisol no FF de equinos. Em outras espécies como em mulheres (HARLOW et al., 1997) e bovinos (ACOSTA, 2005), também foi observado um aumento da concentração de cortisol nos folículos pré-ovulatórios. Uma das formas do ovário modular a ação dos glicocorticóides nos folículos maduros, é através da ação das isoenzimas 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β -HSD), dos tipos 1 e 2, as quais desempenham um papel fundamental no controle da concentração local de cortisol no tecido, pois modificam a exposição ao cortisol por interconversão entre glicocorticóides ativos e inativos, onde a 11 β -HSD 2, inativa o cortisol, enquanto a 11 β -HSD 1, inverte esta reação, predominantemente convertendo cortisona em cortisol (MONDER e LAKSHMI, 1989; MICHAEL et al., 1997).

Em bovinos, a expressão de ambas enzimas foi detectada nas células da granulosa e da teca, no entanto, a expressão da 11 β -HSD tipo 1 aumentou nas células da granulosa com o aumento do diâmetro dos folículos, enquanto a 11 β -HSD tipo 2, permaneceu baixa e praticamente inalterada (ACOSTA et al., 2005).

Em humanos, a expressão dessas enzimas é influenciada pelos níveis plasmáticos de LH, havendo uma maior expressão de 11 β -HSD tipo 2, nos folículos antes da elevação nos níveis de LH na circulação, havendo na sequência, junto com o amadurecimento folicular, uma maior expressão de 11 β -HSD tipo 1, resultando em um aumento transitório de glicocorticóides no fluido folicular (YONG et al., 2000; TETKUSA et al., 1997).

Scarlet et al. (2017), observaram que a expressão gênica de 11 β -HSD 1 e 11 β -HSD 2, estava presente nas células da granulosa dos folículos de equinos, porém diferentemente do observado nas espécies citadas acima, não foi observado alterações na expressão das isoenzimas com o aumento do tamanho folicular. Os autores sugeriram, que o nível mínimo ou ausência das isoenzimas 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β -HSD), dos tipos 1 e 2,

nos folículos dominantes em equinos, permite fisiologicamente altos níveis de cortisol no FF *in vivo*, sugerindo um papel importante na maturação dos ovócitos e provavelmente também para mediação da reação inflamatória na parede folicular precedendo a ovulação (HILLIER e TETSUKA, 1998; ANDERSEN, 2002).

Segundo Hillier e Tetsuka (1998), Andersen (2002) e Acosta et al. (2005), maiores concentrações de cortisol nos folículo pré-ovulatório, sugerem que o cortisol possa funcionar para reduzir as reações inflamatórias que ocorrem em conexão com a ovulação, num mecanismo que modula a reação inflamatória induzida pelo pico de LH na parede folicular, de forma independente aos níveis sistêmicos deste glicocorticóide, promovendo cicatrização rápida da ferida, deixada pela ruptura folicular. Além disso, pode proteger o oviduto da invasão por leucócitos, participando também, das complexas interações entre os diferentes tipos de prostaglandina, permitindo a fertilização e desenvolvimento precoce do embrião.

Berghold et al. (2007) observaram o efeito do cortisol sistêmico durante o manejo dos exames ginecológicos e inseminações de rotina na temporada reprodutiva, através da análise dos níveis de metabólitos de cortisol nas fezes de 50 éguas, de 04 categorias distintas. Os animais foram submetidos à palpação retal, exame ultrasonográfico e inseminação artificial. Na avaliação dos resultados foi observado que este manejo atua como um fator estressante, pois aumentou os níveis de cortisol, principalmente nas éguas que não estavam acostumadas com esse tipo de manejo naquelas que viajaram e ficaram afastadas dos seus parceiros “sociais” habituais, não acarretando, no entanto, alterações negativas na fertilidade. No entanto, Malschitzky et al. (2015) realizaram um estudo retrospectivo do registro histórico ginecológico de 1206 éguas, durante dez temporadas reprodutivas, com o intuito de avaliar o efeito das mudanças de manejo, visando observar os efeitos da redução de situações estressantes sobre o desempenho reprodutivo das éguas. Em conclusão, observaram que as estratégias de manejo destinadas a reduzir o estresse social podem reduzir as perdas gestacionais e os ciclos médios por prenhez, melhorando o desempenho reprodutivo em éguas.

Asa e Ginther (1982) encontraram uma relação negativa do cortisol exógeno, através da administração de dexametasona, nas funções reprodutivas. Os autores observaram em equinos, que a administração de dexametasona (30mg/dia) bloqueou e retardou a ovulação, interferindo no crescimento de folículos acima de 20 mm, reduzindo também as concentrações máximas de LH. Kelley et al. (2011), observaram que éguas submetidas a exercícios físicos moderados (30 min – 6 dias/sem), apresentavam maiores níveis de cortisol

quando comparadas ao controle (6,29 ng/dL e 5,62 ng/dL, respectivamente), menores concentrações máximas de LH e uma dinâmica folicular ovariana alterada.

Nos mamíferos, os corticosteróides em geral desempenham um importante papel na estimulação da síntese de leptina pelo tecido adiposo (GENTRY et al., 2002; CARTMILL et al., 2003). Em nosso estudo, houve uma correlação positiva ($r = 0.3928$, $P = 0.0177$) entre os níveis de leptina e cortisol no FF. Tal resultado, corresponde ao encontrado por Cartmill et al. (2006), os quais observaram que a injeção endovenosa de 125, 62.5, 31.2, e 15.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /PV em éguas elevou significativamente ($P < 0.01$) os níveis plasmáticos de leptina no dia 0 (dia da administração da dexametasona), independente da dose.

Em um estudo *in vitro*, Kedzierski et al. (2017), verificaram que a incubação de tecido adiposo tratado com dexametasona, em diferentes concentrações, estimulava a produção de leptina pelos adipócitos, principalmente nos animais jovens. Isso pode ser explicado, segundo o autor, por uma diminuição da sensibilidade dos adipócitos ao cortisol com o passar dos anos, da mesma forma como encontrado em humanos (BOSCARO et al., 1998), ou em animais em treinamento físico adequado, onde o exercício continuado resultou em um *downregulation* na síntese de receptores de glucocorticóides (BONIFAZI et al., 2009; FRAGALA et al., 2011).

Em nosso estudo, não foram observadas alterações nos níveis intrafoliculares de leptina nos momentos do ciclo estral avaliados, igualmente ao publicado por Lange-Consiglio et al. (2013), os quais observaram 03 grupos de éguas com diferentes diâmetros foliculares (Grupo: $< 10\text{mm}$, Grupo: $11-20\text{mm}$, Grupo: $21-30\text{mm}$, Grupo: $> 30\text{mm}$) e ao analisarem a concentração de leptina sérica e intrafolicular, verificaram não haver diferença na concentração de leptina sérica e no fluido intrafolicular entre os grupos avaliados. Concluíram também, assim como Gastal et al. (2010), Sessions-Bresnahan e Carnevale (2014) e Session- Bresnahan et al. (2016), que existe uma correlação positiva entre os níveis séricos e intrafoliculares de leptina.

Em mulheres, as concentrações séricas e do FF de leptina estão altamente correlacionadas, servindo de marcador para o sucesso na reprodução assistida, onde mulheres com altos níveis de leptina intrafolicular, tiveram um grau de sucesso menor na fertilização *in vitro*, comparado com aquelas que apresentavam menores concentrações desse hormônio (SPICER et al., 1993).

Poucos são os estudos que correlacionam os níveis de leptina intrafolicular ao ciclo estral, no entanto, quando a leptina sérica é utilizada para tal fim, observam-se resultados paradoxais entre os autores. Lange-Consiglio et al. (2013), conforme descrito acima, não

encontraram diferença nos níveis séricos de leptina no decorrer dos períodos do ciclo estral observados. No entanto, Abdelnaby et al. (2016), perceberam maiores níveis de leptina sérica em éguas, entre o dia 05 antes da ovulação até o dia da ovulação (dia 0), sugerindo que essa elevação acompanharia o aumento do fluxo sanguíneo no corpo uterino. Dessa forma, há uma influência da leptina na regulação do fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo da égua.

Em níveis séricos ou foliculares adequados, dentro dos valores fisiológicos para a espécie, a leptina desempenha um importante papel na regulação indireta da foliculogênese ovariana, através do estímulo de produção do hormônio luteinizante e da secreção do hormônio folículoestimulante (BUFF et al., 2002), agindo no mecanismo que envolve a ovulação e luteinização folicular (ABDELNABY et al., 2016), bem como na melhoria da maturação dos ovócitos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2009).

Na análise imunológica celular do epitélio glandular no endométrio, se percebe uma imunomarcagem mais evidente do receptor de leptina em éguas que apresentavam folículos até 22 mm (144.52 ± 3.17 , $P < 0,001$), não havendo no entanto, diferença estatística nas imunomarcações de leptina, apesar de possuir marcação nos três momentos avaliados.

Em recente trabalho realizado pela nossa equipe, dados não publicados, foi observada a existência na espécie eqüina da marcação imunológica de Ob e Ob-Rb no endométrio de éguas de escore corporal normal *versus* obesas e a expressão desses marcadores no ciclo estral. Foi possível verificar a presença de leptina e seu receptor funcional no epitélio glandular e luminal durante o estro e diestro (8º dia após a ovulação), havendo uma maior expressão da marcação imunológica de Ob-Rb no epitélio glandular durante o diestro, em éguas de escore corporal normal.

Em outras espécies como bovinos e suínos, a expressão do receptor de leptina também foi maior durante a fase lútea (THORN et al., 2007; MOREIRA et al., 2014), sugerindo que a alta sensibilidade à leptina no ambiente uterino nesse período, pode ocorrer pela influência da leptina na preparação do ambiente uterino para uma eventual prenhez.

Em humanos, Cervero et al. (2004; 2006), observaram que os receptores de leptina parecem estar disponíveis o tempo todo no endométrio, mas precisam ser ativados. A expressão do RNAm do receptor de leptina no endométrio humano é mais intenso no período de implantação embrionária (KITAWAKI et al., 2000; CERVERO e SIMON, 2009), o que sugere um possível papel funcional da leptina na ativação desse processo, através de sua ligação ao seu receptor funcional (BARTEL et al., 2014).

Alfer et al. (2000), observou em um grupo de mulheres que apresentavam problemas de infertilidade, que havia uma diminuição da expressão de Ob-Rb no endométrio,

acompanhada de defeito na maturação endometrial, apresentando uma adequada concentração de hormônios séricos e expressão normal de receptores de hormônios esteróides no endométrio, correlacionando assim, a infertilidade a uma redução na expressão dos receptores funcionais para leptina e atribuindo a este fato, as alterações encontradas.

Apesar das amostras utilizadas serem oriundas de éguas que estavam em um ambiente adverso, imensamente estressante, não foi possível identificar níveis de cortisol no FF que excedessem os níveis fisiológicos descritos na literatura para a espécie (50ng/ml) (SCARLET et al., 2017), não sendo observado portanto, influência desse hormônio nos níveis de leptina e na resposta dos marcadores endometriais avaliados durante o ciclo estral. A utilização de peças anatômicas do aparelho reprodutivo oriundas de frigorífico serviu para facilitar a coleta de amostras com a finalidade de rastrear marcadores que possam melhorar o entendimento da influência de diferentes hormônios na função reprodutiva.

CONCLUSÃO

Não foi observado influência do aumento do cortisol intrafolicular nas variáveis avaliadas, pois o mesmo manteve-se dentro dos valores fisiológicos para a espécie. No entanto pode-se verificar uma correlação positiva entre os níveis intrafoliculares de cortisol e leptina, estando o cortisol em maiores níveis nos folículos pré-ovulatórios. Além disso, que a marcação imunológica do receptor de leptina foi mais intensa nos animais que apresentavam folículos até 22 mm, estando correlacionado de forma negativa com os níveis de cortisol no fluido folicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABY EA, EL-MAATY AMA, RAGAB RSA, SEIDA AA. Assessment of Uterine Vascular Perfusion During the Estrous Cycle of Mares in Connection to Circulating Leptin and Nitric Oxide Concentrations. **J Equine Vet Sci** 39; 25–32, 2016.

ACOSTA TJ, TETSUKA M, MATSUI M, SHIMIZU T, BERISHA B, SCHAMS D, MIYAMOTO A. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle in the cow. **J Reprod Dev** 51 (4); 483-489, 2005.

ALEXANDER SL, IRVINE CH. The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. **J Endocrinol** 157 (3); 425-32, 1998.

ALFER J, MULLER-SCHOTTLE F, CLASSEN-LINKE I, VON RANGO U, HAPPEL L, BEIER-HELLWIG K, RATH W, BEIER HM. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. **Mol Hum Reprod** 6; 595–60, 2000.

ANDERSEN CY. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. **J Endocrinol** 173; 211–7, 2002.

ASA C, GINTHER O. Glucocorticoid suppression of oestrus, follicles, LH and ovulation in the mare. **J Reprod Fert Suppl** 32; 247-251, 1982.

BARASH IA, CHEUNG CC, WEIGLE DS, REN H, KABIGTING EB, KUIJPER JL, CLIFTON DK, STEINER RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology** 137 (7); 3144-3147, 1996.

BARTEL C, TICHY A, WALTER I. Characterization of Foamy Epithelial Surface Cells in the Canine Endometrium. **Anat Histol Embryol** 43; 165–181, 2014.

BERGHOLD P, MOSTL E, AURICH C. Effects of reproductive status and management on cortisol secretion and fertility of oestrous horse mares. **Anim Reprod Sci** 102; 276–285, 2007.

BONIFAZI M, MENCARELLI M, FEDELE V, CECCARELLI I, PECORELLI A, GRASSO G, ALOISI AM, MUSCETTOLA M. Glucocorticoid receptor mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in high trained compared to low trained athletes and untrained subjects. **J Endocrinol Invest** 32; 816–20, 2009.

BOSCARO M, PAOLETTA A, SCARPA E, BARZON L, FUSARO P, FALLA F, SONINO N. Age-related changes in glucocorticoid fast feedback inhibition of adrenocorticotropin in man. **J Clin Endocrinol Metab** 83; 1380–3, 1998.

BOTTOMS GD, ROESEL OF, RAUSH FD, AKINS EL. Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. **Am J Vet Res** 33; 785-90, 1972.

BUFF PR, DODDS AC, MORRISON CD, WHITLEY NC, MCFADIN EL, DANIEL JA. Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. **J Anim Sci** 80 (11); 2942-2948, 2002.

CARTMILL JA, THOMPSON JR DL, GENTRY LR, PRUETT HE, JOHNSON CA. Effects of dexamethasone, glucose infusion, adrenocorticotropin, and propylthiouracil on plasma leptin concentrations in horses. **Domest Anim Endocrinol** 24; 1–14, 2003.

CARTMILL JA, THOMPSON DL, DEL VECCHIO RP, STORER WA, CROWLEY JC. Leptinsecretion in horses: Effectsofdexamethasone, genderand testosterone. **Domest Anim Endocrinol** 31; 197–210, 2006.

CERVERO A, HORCAJADAS JA, MARTIN J, PELLICER A, SIMON C. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. **J Clin Endocrinol Metab** 89; 2442–2451, 2004.

CERVERO A, DOMINGUEZ F, HORCAJADAS JOSE A, QUINONERO A, PELLICER A, SIMON C. The role of the leptin in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol** 18; 297–303, 2006.

CERVERO A, SIMON C. **Involvement of Leptin in the Endometrial Function**. Rehovot, Israel: The Hebrew University of Jerusalem, 2009.

CIOFFI JA, VAN BJ, ANTCZAK M, SHAFER A, WITTMER S, SNODGRASS HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. **Mol Hum Reprod** 3; 467–472, 1997.

CRAIG JA, ZHU H, DYCE PW, WEN L, LI J. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. **Mol Cell Endocrinol** 229; 141-147, 2005.

CRUZ IS, ROSA G, VALLE V, MELLO DB, FORTES M, DANTAS EHM. Efeitos agudos do treinamento concorrente sobre os níveis séricos de leptina e cortisol em adultos jovens sobrepesados. **Rev Bras Med Esporte**. 18 (2); 81-6, 2012.

FAZIO E, MEDICA P, ARONICA V, GRASSO L, FERLAZZO A. Circulating betaendorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. **Acta Vet Scand** 50; 1–7, 2008.

FERREIRA-DIAS G, CLAUDINO F, CARVALHO H, AGRÍCOLA R, ALPOIM-MOREIRA J, SILVA JR. Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, bodyweight and immune status. **Dom Anim End** 29; 203-213, 2005.

FERRIS RA, MCCUE PM. The effects of dexamethasone and prednisolone on pituitary and ovarian function in the mare. **Equine Vet J** 42; 438–443, 2010.

FRAGALA MS, KRAEMER WJ, MASTRO AM, DENEGAR CR, VOLEK JS, KUPCHAK BR, HÄKKINEN K, ANDERSON JM, MARESH CM. Glucocorticoid receptor expression on human B cells in response to acute heavy resistance exercise. **Neuroimmunomodulation** 18; 156–64, 2011.

GASTAL MO, GASTAL EL, BEG MA, GINTHER OJ. Short-term feed restriction decreases the systemic and intrafollicular concentrations of leptin and increases the vascularity of the preovulatory follicle in mares. **Theriogenology** 73; 1202–9, 2010.

GAYRARD V, ALVINERIE M, TOUTAIN PL. Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. **Domest Anim Endocrinol** 13; 35–45, 1996.

GENTRY LR, THOMPSON DL, JR., GENTRY GT, JR., DAVIS KA, GODKE RA, CARTMILL JA. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **J Anim Sci** 80 (10); 2695-2703, 2002.

GONZÁLEZ RR, CABALLERO-CAMPO P, JASPER M, MERCADER A, DEVOTO L, PELLICER A, SIMON C. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. **J Clin Endocrinol Metab**. 85 (12); 4883-8, 2000.

GORDON ME, MCKEEVER KH, BETROS CL, MANSO-FILHO HC. Exercise induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. **Vet J** 173; 532–40, 2007.

HARLOW CR. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. **Fert Steril** 68 (1); 48-53, 1997.

HAKANSSON ML, BROWN H, GHILARDI N, SKODA RC, MEISTER B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **J Neurosci** 18; 559-72, 1998.

HENNEKE DR, POTTERGD, KRIEDER JL, YEATES BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Vet J** 379 (15); 371–372, 1983.

HILLIER SG, TETSUKA M. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? **J Reprod Immunol** 39; 21–7, 1998.

KEDZIERSKI W, CYWINSKA A. The effect of different physical exercise on plasma leptin, cortisol, and some energetic parameters concentrations in Purebred Arabian horses. **J Equine Vet Sci** 34; 1059–63, 2014.

KEDZIERSKI W, ŁOPUSZYNSKI W, WYDRYCH J. Age- and Glucocorticoid-Dependent Leptin Release by Horse Adipose Tissue: In Vitro Study. **J Equine Vet Sci** 56; 104-109, 2017.

KELLEY DE, GIBBONSB JR, SMITHB R, VERNONB KL, PRATT-PHILLIPC SE, MORTENSENA CJ. Exercise affects both ovarian follicular dynamics and hormone concentrations in mares. **Theriogenology** 76; 615–622, 2011.

KENNEY RM, DOIG PA. **Equine endometrial biopsy**. In Morrow, D.A. (Hrsg.): Current therapy in theriogenology 2. W.B. Saunders, Comp., Philadelphia, 1986. 723-729 p.

KITAWAKI J, KOSHIBA H, ISHIHARA H, KUSUKI I, TSUKAMOTO K, HONJO H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab** 85; 1946–1950, 2000.

KOHNKE, J. **Feeding and Nutrition: The Making of a Champion**. Australia. Birubi Pacific, Pymble 163–166, 1992.

LANGE-CONSIGLIO A, DELL'AQUILA ME, FIANDANESE N, AMBRUOSI B, CHOYS, BOSI G, ARRIGHI S, LACALANDRA GM, CREMONESI F. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. **Reprod Biol Endocrinol**. 7; 113, 2009.

LANGE-CONSIGLIO A, ARRIGHI S, FIANDANESE N, POCAR P, ARALLA M, BOSI G, BORROMEO V, BERRINI A, MEUCCI A, DELL'AQUILA ME, CREMONESI F.

Follicular fluid leptin concentrations and expression of leptin and leptin receptor in the equine ovary and in-vitro-matured oocyte with reference to pubertal development and breeds. **Reprod Fertil Dev** 25; 837–846, 2013.

LIN J, BARB CR, KRAELING RR, et al. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biol Reprod** 64; 1614-1618, 2001.

MACFARLANE MS, BREEN KM, SAKURAI H, ET AL. Effect of duration of infusion of stresslike concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. **Anim Reprod Sci** 63; 167- 75, 2000.

MALSCHITZKY E, PIMENTEL AM, GARBADE P, JOBIM MIM, GREGORY RM, MATTOS RC. Management Strategies Aiming to Improve Horse Welfare Reduce Embryonic Death Rates in Mares. **Reprod Dom Anim** 50; 632–636, 2015.

MANN GE. Pregnancy rates during experimentation in dairy cows. **Vet J** 161; 301-5, 2001.

MERCER JG, HOGGARD N, WILLIAMS LM, LAWRENCE CB, HANNAH LT, TRAYHURN P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett** 387; 113-6, 1996.

MICHAEL AE, EVAGELATOU M, NORGATE DP, CLARKE RJ, ANTONIW JW, STEDMAN BA, BRENNAN A, WELSBY R, BUJALSKA I, STEWART PM, COOKE BA. Isoforms of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. **Mol Cell Endocrinol** 132; 43–52, 1997.

MONDER C, LAKSHMI V. 1989 Evidence for kinetically distinct forms of corticosteroid 11-hydroxysteroid dehydrogenase in rat liver microsomes. **J Steroid Biochem** 32; 77–83, 1989.

MOREIRA F, GHELLER SM, MONDADORI RG, VARELA JÚNIOR AS, CORCINI CD, LUCIA T JR. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus, uterus and ovaries of Swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reprod Domest Anim** 49 (6); 1074-8, 2014.

OMURA T, MOROHASHI K. Gene regulation of steroidogenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol** 53;19–25, 1995.

PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, BAKER MB, HECHT R, WINTERS D, BOONE T, COLLINS F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science** 28; 269 (5223):540-3, 1995.

PEREIRA C.C.J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2005. 195p.

PÉREZ-PÉREZ A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MAYMÓ J, DUEÑAS JL, VARONE C, SÁNCHEZ-MARGALET V. Role of leptin in female reproduction. **ClinChem Lab Med** 53 (1); 15–28, 2015.

RABIN DS, JOHNSON EO, BRANDON DD. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. **Biol Reprod** 42; 74- 80, 1990.

RIVIER C, RIVEST S. Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol Reprod** 45; 523-532, 1991.

SCARLET D, ILLE N, ERTL R, ALVES BG, GASTAL GDA, PAIVA SO, GASTAL MO, GASTAL EL, AURICH C. Glucocorticoid metabolism in equine follicles and oocytes. **Domest Anim Endocrinol** 59; 11-22, 2017.

SESSIONS DR, REEDY SE, VICK MM, MURPHY BA, FITZGERALD BP. Development of a model for inducing transient insulin resistance in the mare: Preliminary implications regarding the estrous cycle. **J Anim Sci** 82; 2321-2328, 2004.

SESSIONS-BRESNAHAN DR, CARNEVALE EM. The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. **J Anim Sci** 92; 1485-1494, 2014.

SESSIONS-BRESNAHAN DR, SCHAUER KL, HEUBERGER AL, CARNEVALE EM. Effect of Obesity on the Preovulatory Follicle and Lipid Fingerprint of Equine Oocytes. **Biol Reprod** 94 (1); 1-12, 2016.

SMITH ER, JOHNSON J, WEICK R, LEVINE S, DAVIDSON JM. Inhibition of the reproductive system in immature rats by intracerebral implantation of cortisol. **Neuroendocrinology** 8; 94-106, 1971.

SMOLINSKA N, SIAWRYS G, KAMINSKI T, PRZALA J. Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs. **J Physiol Pharmacol** 58; 563-581, 2007.

SPICER LJ, ALPIZAR E, ECHTERNKAMP SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **J Anim Sci** 71 (5); 1232-41, 1993.

STORER WA, THOMPSON DL JR, WALLER CA, CARTMILL JA. Hormonal patterns in normal and hyperleptinemic mares in response to three common feeding-housing regimens. **J Anim Sci** 85; 2873-2881, 2007.

TAMER EREL C, SENTURK LM. The impact of body mass index on assisted reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 21; 228-35, 2009.

TETSUKA M, THOMAS FJ, THOMAS MJ, ANDERSON RA, MASON JI, HILLIER SG. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab** 82; 2006-2009, 1997.

THORN SR, MEYER MJ, VAN AMBURGH ME, BOISCLAIR YR. Effect of estrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepubertal dairy heifers. **J Dairy Sci** 90; 3742-3750, 2007.

VAN WEYENBERG S, HESTA M, BUYSE J, PAPADOPOULOS GA, JANSSENS GPJ. Short-term effects of energy changes on plasma leptin concentrations and glucose tolerance in healthy ponies. **Vet J** 178; 233–237, 2008.

VICK MM, SESSIONS DR, MURPHY BA, KENNEDY EL, REEDY SE, FITZGERALD BP. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: Effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. **Reprod Fertil Dev** 18; 609–617, 2006.

WALLER CA, THOMPSON Jr. DL, CARTMILL JA, STORER WA, HUFF NK. Reproduction in high body condition mares with high versus low leptin concentrations. **Theriogenology** 66; 923-928, 2006.

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 372; 425-32, 1994.

YONG PY, THONG KJ, ANDREW R, WALKER BR, HILLIER SG. Development-related increase in cortisol biosynthesis by human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab** 85; 4728–4733, 2000.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível comprovar a presença de leptina e seu receptor funcional no endométrio de equinos, sendo observada marcação no epitélio glandular e luminal em todos os momentos do ciclo estral avaliados. A expressão do receptor de leptina foi mais intensa durante o diestro, estando diminuído em éguas obesas. Foi observado ainda, que os equinos apresentam níveis de cortisol intrafoliculares maiores, à medida que o folículo se aproxima do momento da ovulação, porém os níveis de cortisol se mantiveram dentro dos valores fisiológicos, mesmo quando os animais foram submetidos a uma situação de estresse físico. Não sendo possível observar, portanto, a influência da elevação do cortisol no fluido folicular, nos marcadores endometriais observados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABY EA, EL-MAATY A, RAGAB RSA, SEIDA AA. Assessment of Uterine Vascular Perfusion During the Estrous Cycle of Mares in Connection to Circulating Leptin and Nitric Oxide Concentrations. **J Equine Vet Sci** 39; 25–32, 2016.

ABOEL-MAATY AM, SHATA FYH, GABR FI, MAHMOUD MB-E. Leptin, Insulin Like growth factor-I, Nitric oxide, thyroid and ovarian hormones in serum of early pregnant and cyclic Arab mares with or without clinical endometritis. **ISIJ** 2(4); 2013.

ACOSTA TJ, TETSUKA M, MATSUI M, SHIMIZU T, BERISHA B, SCHAMS D, MIYAMOTO A. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle in the cow. **J Reprod Dev** 51 (4); 483-489, 2005.

ALEXANDER SL, IRVINE CH. The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroidbinding globulin capacity. **J Endocrinol** 157; 425–32, 1998.

ALEXANDER SL, IRVINE CHG. GnRH. In: McKinnon AO, Squires SL, Vaala WE, Varner DD (eds), **Equine Reproduction**. 2nd edn. Wiley Blackwell, WestSussex, 2011. 1608–1618 p.

ALFER J, MULLER-SCHOTTLE F, CLASSEN-LINKE I, VON RANGO U, HAPPEL L, BEIER-HELLWIG K, RATH W, BEIER HM. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. **Mol Hum Reprod** 6; 595–60, 2000.

ALMEIDA CAN, RAMOS APP, BRUNETTI IL, PEPATO MT, RICCO RG. Leptinemia de jejum em crianças e adolescentes eutróficos. **Rev Assoc Med Bras**. 55; 463-467, 2009.

ANDERSEN CY. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. **J Endocrinol** 173; 211–7, 2002.

ASA C, GINTHER O. Glucocorticoid suppression of oestrus, follicles, LH and ovulation in the mare. **J Reprod Fert Suppl** 32; 247-251, 1982.

ASA C, GOLDFOOT D, GARCIA M, GINTHER O. Sexual behavior in ovariectomized and seasonally anovulatory mares (*Equus caballus*). **Horm Behav**.14; 55-64, 1980.

BARASH IA, CHEUNG CC, WEIGLE DS, REN H, KABIGTING EB, KUIJPER JL, CLIFTON DK, STEINER RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology** 137(7); 3144-3147, 1996.

BARB CR, BARRETT JB, KRAELING RR. Role of leptin in modulating the hypothalamic-pituitary axis in the pig. **Domest Anim Endocrinol** 26; 201–214, 2004.

BARTEL C, TICHY A, WALTER I. Characterization of Foamy Epithelial Surface Cells in the Canine Endometrium. **Anat Histol Embryol** 43; 165–181, 2014.

BERGHOLD P, MOSTL E, AURICH C. Effects of reproductive status and management on cortisol secretion and fertility of oestrous horse mares. **Anim Reprod Sci** 102;276–285, 2007.

BERNE RM, LEVY MN, KOEPPEN BM, STANTON BA. **Fisiologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 1082 p.

BOELHAUVE M, SINOWATZ F, WOLF E, PAULA-LOPES FF. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. **Biol Reprod** 73; 737-744, 2005.

BOGACKA I, PRZAŁA J, SIAWRYS G, KAMINSKI T, SMOLINSKA N. The expression of short form of leptin receptor gene during early pregnancy in the pig examined by quantitative real time RT-PCR. **J Physiol Pharmacol** 57; 479-489, 2006.

BONIFAZI M, MENCARELLI M, FEDELE V, CECCARELLI I, PECORELLI A, GRASSO G, ALOISI AM, MUSCETTOLA M. Glucocorticoid receptor mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in high trained compared to low trained athletes and untrained subjects. **J Endocrinol Invest** 32; 816–20, 2009.

BOSCARO M, PAOLETTA A, SCARPA E, BARZON L, FUSARO P, FALLA F, SONINO N. Age-related changes in glucocorticoid fast feedback inhibition of adrenocorticotropin in man. **J Clin Endocrinol Metab** 83; 1380–3, 1998.

BOTTOMS GD, ROESEL OF, RAUSH FD, AKINS EL. Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. **Am J Vet Res.** 33; 785-90, 1972.

BRAY GA. Leptin and leptinomania. **The Lancet** 348; 140–141, 1996.

BREEN KM, BILLINGS HJ, WAGENMAKER ER, WESSINGER EW, KARSCHFJ. Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. **Endocrinology** 156; 2107-2115, 2005.

BREEN KM, KARSCH, FJ. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. **Front in Neuroendoc.** 27; 233-245, 2006.

BUDAK E, FERNÁNDEZ SÁNCHEZ M, BELLVER J, CERVERÓ A, SIMÓN C, PELLICER A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. **Fertil Steril** 85 (6); 1563-1581, 2006.

BUFF PR, DODDS AC, MORRISON CD, WHITLEY NC, MCFADIN EL, DANIEL JA. Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. **J Anim Sci** 80 (11); 2942-2948, 2002.

CARNEVALE EM, RAMIREZ RJ, SQUIRES EL, ALVARENGA A, VANDERWALL DK, MCCUE PE. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology** 54; 965-979, 2000.

CARTER RA, GEOR RJ, BURTON STANIAR W, CUBUITT TA, HARRIS PA. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. **Vet J** 179; 204–10, 2009.

CARTMILL JA, THOMPSON JR DL, GENTRY LR, PRUETT HE, JOHNSON CA. Effects of dexamethasone, glucose infusion, adrenocorticotropin, and propylthiouracil on plasma leptin concentrations in horses. **Domest Anim Endocrinol** 24; 1–14, 2003.

CARTMILL JA, THOMPSON DL, DEL VECCHIO RP, STORER WA, CROWLEY JC. Leptinsecretion in horses: Effects of dexamethasone, gender, and testosterone. **Domest Anim Endocrinol** 31; 197–210, 2006.

CATUNDA AGV, LIMA FRG, LIMA ICS, MACHADO AAC, GADELHA CRF, PEREIRA ES, MARTINS GA, CAMPOS ACN. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. **Rev. Bras Reprod Anim** 38 (1); 3-9, 2014.

CAVINDER CA, VOGELSANG MM, GIBBS PG, FORREST DW, SCHMITZ DG. Endocrine Profile Comparisons of Fat Versus Moderately Conditioned Mares Following Parturition. **J Equine Vet Sci** 27(2); 72-97, 2007.

CERVERO A, HORCAJADAS JA, MARTIN J, PELLICER A, SIMON C. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. **J Clin Endocrinol Metabol** 89; 2442–2451, 2004.

CERVERO A, HORCAJADAS JA, DOMINGUEZ F, PELLICER A, SIMON C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. **Reprod Biomed Online** 10; 217–223, 2005.

CERVERO A, DOMINGUEZ F, HORCAJADAS JOSE A, QUINONERO A, PELLICER A, SIMON C. The role of the leptin in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol** 18; 297–303, 2006.

CERVERO A, SIMON C. **Involvement of Leptin in the Endometrial Function**. Rehovot, Israel: The Hebrew University of Jerusalem, 2009.

CHAPPAZ E, ALBORNOZ MS, CAMPOS D, CHE L, PALIN MF, MURPHY BD, BORDIGNON V. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. **Domest Anim Endocrinol** 35 (2); 198-207, 2008.

CHELIKANI PK, GLIMM DR, KENNELLY JJ. Short communication: tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **J. Dairy Sci** 86; 2369–2372, 2003.

CHILLIARD Y, BONNET M, DELAVAUD C, FAULCONNIER Y, LEROUX C, DJIANE J, BOCQUIER F. 2001. Leptin in ruminants: gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domest. Anim. Endocrinol** 21; 271–295, 2001.

- CIOFFI JA, VAN BLERKOM J, ANTCZAK M. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. **Mol Hum Reprod** 3; 467–472, 1997.
- CRAIG JA, ZHU H, DYCE PW, WEN L, LI J. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. **Mol Cell Endocrinol** 229:141-147, 2005.
- CRUZ IS, ROSA G, VALLE V, MELLO DB, FORTES M, DANTAS EHM. Efeitos agudos do treinamento concorrente sobre os níveis séricos de leptina e cortisol em adultos jovens sobrepesados. **Rev Bras Med Esporte**. 18 (2); 81-6, 2012.
- CUNNINGHAM MJ, CLIFTON DK, STEINER RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol Reprod** 60; 216-222, 1999.
- CUNNINGHAM JG. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 350- 384, 2004.
- DANIELSEN V, VESTERGAARD EM. Dietary fibre for pregnant sows: effect on performance and behaviour. **Anim Feed Sci Technol** 90; 71-80, 2001.
- DE RENSIS F, SCARAMUZZI JR. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. **Theriogenology** 60; 1139- 1151, 2003.
- DEBUS N, BREEN KM, BARRELL GK, BILLINGS HJ, BROWN M, YOUNG EA, KARSCH FJ. Does cortisol mediate endotoxin-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone and gonadotropin-releasing hormone secretion? **Endocrinology** 143, 3748-3758, 2002.
- DEMIR B, GUVEN S, GUVEN ESG, ATAMER Y, GUNALP GS, GUL T. Serum leptin level in women with unexplained infertility. **J Reprod Immunol**.75 (2) 145-149, 2007.
- DIERENDONCK VMC, SIGURJONSDOTTIR H, COLENBRANDER L, THORHALLSDOTTIR AG. Differences in social behavior between late pregnant, post-partum and barren mares in a herd of Icelandic horses. **Appl Anim Behav Sci** 89, 283–297, 2004.
- DOBSON H, SMITH RF. What is stress, and how does it affect reproduction? **Anim Reprod Sci** 60/61; 743-752, 2000.
- DUGAT SL, TAYLOR TS, MATTHEWS NS, GOLD JR. 2011. Values for triglycerides, insulin, cortisol and ACTH in a herd of normal donkeys. **J Equine Vet Sci**. 30 (3):141-144, 2010.
- DUGDALEAH, CURTISGC, CRIPPSPJ, HARRIS PA, ARGO CM. Effects of season and body condition on appetite, body mass and body composition in ad libitum fed pony mares. **Vet J** 190 (3); 329–37, 2011.
- DUGGAL PS, VAN DER HOEK KH, MILFNER CR, RYAN NK, ARMSTRONG DT, MAGOFFIN DA, et al. The in Vivo and in Vitro Effects of Exogenous Leptin on Ovulation in the Rat. **Endocrinology** 141 (6); 1971–76, 2000.

DUNN JF, NISULA BC, RODBARD D. Transport of steroid hormones: binding of endogenous steroid to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. **J Clin Endocrin Metab** 53; 58–68, 1981.

ELIMAM A, KNUTSSON U, BRÖNNEGÅRD M, STIERNA P, ALBERTSSON-WIKLAND K, MARCUS C. Variations in glucocorticoid levels within the physiological range affect plasma leptin levels. **Eur J Endocrinol** 139:615–20, 1998.

FARLEY DM, CHOI J, DUDLEY DJ, et al. Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity. **Placenta** 31(8); 718-724, 2010.

FAZIO E, MEDICA P, ARONICA V, GRASSO L, FERLAZZO A. Circulating beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. **Acta Vet Scand** 50; 1–7, 2008.

FERREIRA-DIAS G, CLAUDINO F, CARVALHO H, AGRÍCOLA R, ALPOIM-MOREIRA J, SILVA JR. Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. **Dom Anim End** 29; 203-213, 2005.

FERRIS RA, MCCUE PM. The effects of dexamethasone and prednisolone on pituitary and ovarian function in the mare. **Equine Vet J** 42; 438–443, 2010.

FITZGERALD BP, MCMANUS CJ. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biol Reprod** 63; 335–340, 2000.

FORHEAD AJ, FRENCH J, IKIN P, et al. Relationship between plasma insulin and triglyceride concentrations in hypertriglyceridaemic donkeys. **Res Vet Sci** 56; 389–392, 1994.

FRAGALA MS, KRAEMER WJ, MASTRO AM, DENEGAR CR, VOLEK JS, KUPCHAK BR, HÄKKINEN K, ANDERSON JM, MARESH CM. Glucocorticoid receptor expression on human B cells in response to acute heavy resistance exercise. **Neuroimmunomodulation** 18; 156–64, 2011.

FRANK N, ELLIOTT SB, BRANDT LE, KEISLER DH. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. **J Am Vet Med Assoc.** 228 (9); 1383-1390, 2006.

FRASER AF. **The Behavior of the Horse**. CABI Publishing, Oxon, 1992. 184—197 p.

FRIEDMANN JM, HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature** 395(22); 763-70, 1998.

GALVÃO A, TRAMONTANO A, REBORDÃO MR, AMARAL A, PINTO BRAVO P, SZÓSTEK A, SKARZYNSKI D, MOLLO A, FERREIRA-DIAS G. Opposing Roles of Leptin and Ghrelin in the Equine Corpus Luteum Regulation: An In Vitro Study. **Mediat Inflamm** 1-13, 2014.

GARCIA MR, AMSTALDEN M, WILLIAMS SW, STANKO RL, MORRISON CD, KEISLER DH, WILLIAMS GL. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **J Anim Sci** 80 (8); 2158-2167, 2002.

GASTAL MO, GASTAL EL, BEG MA, GINTHER OJ. Short-term feed restriction decreases the systemic and intrafollicular concentrations of leptin and increases the vascularity of the preovulatory follicle in mares. **Theriogenology** 73; 1202–9, 2010.

GAYRARD V, ALVINERIE M, TOUTAIN PL. Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. **Domest Anim Endocrinol** 13; 35–45, 1996.

GENTRY LR, THOMPSON DL, GENTRY GT, DAVIS KA, GODKE RA, CARTMILL JA. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **J Anim Sci** 80 (10); 2695-2703, 2002.

GENTRY LR, THOMPSON JR DL, GENTRY JR GT, DAVIS KA, GODKE RA. High versus low body condition in mares: interactions with responses to somatotropin, GnRH analog, and dexamethasone. **J Anim Sci** 80; 3277–85, 2002a.

GENTRY LR, THOMPSON DL, GENTRY GT, et al. The Relationship Between Body Condition Score and Ultrasonic Fat Measurements in Mares of High Versus Low Body Condition. **J Equine Vet Sci** 377 (24); 198-203, 2004.

GONG DW, BI S, PRATLEY RE, WEINTRAUB BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. **J Biol Chem** 271, 3971–3974, 1996.

GONZÁLEZ FHD, SILVA SC. **Introdução a Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

GONZÁLEZ RR, CABALLERO-CAMPO P, JASPER M, MERCADER A, DEVOTO L, PELLICER A, SIMON C. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptinsecretion is regulated by the human blastocyst. **J Clin Endocrinol Metab**. 85 (12); 4883-8, 2000.

GORDON ME, MCKEEVER KH, BETROS CL, MANSO-FILHO HC. Exercise induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. **Vet J** 173; 532–40, 2007.

GRANDIN T. Assessment of stress during handling and transport. **J Anim Sci** 75; 249-257, 1997.

GUERRE-MILLO M. Adipose tissue secretory function: Implication in metabolic and cardiovascular complications of obesity. **J Soc Biol** 37; 43, 2006.

GUZELOGLU A, AMBROSE DJ, KASSA T, DIAZ T, THATCHER JM, TATCHER JJ. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Anim Reprod Sci** 66; 15-34, 2001.

HAKANSSON ML, BROWN H, GHILARDI N, SKODA RC, MEISTER B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **J Neurosci** 18; 559-72, 1998.

HAMMOND GL, SMITH CL, PATERSON NAM, SIBBALD WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. **J Clin Biochem Metab** 71; 34-39, 1990.

HANSEN JP, ARÉCHIGA FC. Strategies for Managing Reproduction in the Heat-Stressed Dairy Cow. **J Anim Reprod** 77; 36-50, 1999.

HARDIE L, TRAYHURN P, ABRAMOVICH D, FOWLER P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. **Clin Endocrinol** 47; 101-106, 1997.

HENNEKE DR, POTTERGD, KRIEDER JL, YEATES BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Vet J** 379 (15); 371-372, 1983.

HERRID M, NGUYEN VL, HINCH G, MCFARLANE JR. Leptin has concentration and stage-dependent effects on embryonic development in vitro. **Reproduction** 132:247-256, 2006.

HILLIER SG, TETSUKA M. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? **J Reprod Immunol** 39; 21-7, 1998.

HUBE F, LIETZ U, IGEL M, JENSEN PB, TORNQVIST H, JOOST HG, HAUNER H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. **Horm Metab Res** 28; 690-3, 1996.

IRVINE CHG, ALEXANDER SL. The role of environmental factors in reproduction in the mare. **Ars Vet** 10; 33-41, 1994.

JANSSEN JAMJL, HUIZENGA NATM, STOLK RP, GROBBEE DE, POLS HAP, DE JONG FE, ATTANASIO AMF, BLUM WF, LAMBERTS SWJ. The acute effect of dexamethasone on plasma leptin concentrations and the relationships between fasting leptin, the IGF-I/IGFBP system, dehydroepiandrosterone, androstenedione and testosterone in an elderly population. **Clin Endocrinol** 48; 621-6, 1998.

JOHNSON PJ. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. **Vet Clin North Am Equine Pract** 18; 271-293, 2002.

JOHNSON PJ, WIEDMEYER CE, MESSER NT, GANJAM VK. Medical implications of obesity in horses—lessons for human obesity. **J Diabetes Sci Technol** 3 (1); 163-74, 2009.

KAWAMURA K, SATO N, FUKUDA J, KODAMA H, KUMAGAI J, TANIKAWA H, NAKAMURA A, TANAKA T. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. **Endocrinology** 143; 1922-1931, 2002.

KEARNS CF, MCKEEVER KH, ROEGNER V, BRADY SM, MALINOWSKI K. Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. **Vet J** 172(3); 460-465, 2006.

KEAY SD, HARLOW CR, WOOD PJ, JENKINS JM, CAHILL DJ. Higher cortisol: cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. **Hum Reprod** 17; 2410-2414, 2002.

KEDZIERSKI W, CYWINSKA A. The effect of different physical exercise on plasma leptin, cortisol, and some energetic parameters concentrations in Purebred Arabian horses. **J Equine Vet Sci** 34; 1059-63, 2014.

KEDZIERSKI W, ŁOPUSZYNSKI W, WYDRYCH J. Age- and Glucocorticoid-Dependent Leptin Release by Horse Adipose Tissue: In Vitro Study. **J Equine Vet Sci** 56; 104-109, 2017.

KELLEY DE, GIBBONS JR, SMITH R, VERNON KL, PRATT-PHILLIPS SE, MORTENSEN CJ. Exercise affects both ovarian follicular dynamics and hormone concentrations in mares. **Theriogenology** 76; 615-622, 2011.

KENDALL N, GUTIERREZ C, SCARAMUZZI R, BAIRD D, WEBB R, CAMPBELL B. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. **Reproduction** 128; 757-765, 2004.

KENNEY RM, DOIG PA. **Equine endometrial biopsy**. In Morrow, D.A. (Hrsg.): Current therapy in theriogenology 2. W.B. Saunders, Comp., Philadelphia, 1986. 723-729 p.

KITAWAKI J, KOSHIBA H, ISHIHARA H, KUSUKI I, TSUKAMOTO K, HONJO H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab** 85; 1946-1950, 2000.

KOHNKE J. **Feeding and Nutrition: The Making of a Champion**. Australia. Birubi Pacific, Pymble, 1992. 163-166 p.

KUMAR B, FRANCES MS, SUTTIE JM, THOMPSON MP. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. **Biochem Mol Biol** 120; 543-548, 1998.

LANGE-CONSIGLIO A, DELL'AQUILA ME, FIANDANESE N, AMBRUOSI B, CHOYS, BOSI G, ARRIGHI S, LACALANDRA GM, CREMONESI F. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. **Reprod Biol Endocrinol**. 7; 113, 2009.

LANGE-CONSIGLIO A, ARRIGHI S, FIANDANESE N, POCAR P, ARALLA M, BOSI G, BORROMEO V, BERRINI A, MEUCCI A, DELL'AQUILA ME, CREMONESI F. Follicular fluid leptin concentrations and expression of leptin and leptin receptor in the equine

ovary and in-vitro-matured oocyte with reference to pubertal development and breeds. **Reprod Fertil Dev** 25; 837–846, 2013.

LEE MJ, FRIEDSK. Multilevel regulation of leptin storage, turnover and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. **J Lipid Res** 47; 1984–1993, 2006.

LIMA FB, CURI R. **Moléculas ativas produzidas por órgãos não endócrinos**. In: Aires MM (Ed.). Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1077-1096 p.

LIN J, BARB CR, KRAELING RR, et al. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biol Reprod** 64; 1614-1618, 2001.

MACFARLANE MS, BREEN KM, SAKURAI H, ET AL. Effect of duration of infusion of stresslike concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. **Anim Reprod Sci** 63; 167- 75, 2000.

MAILLARD V, UZBEKOVA S, GUIGNOT F, PERREAU C, RAMÉ C, COYRAL-CASTEL S, DUPONT J.. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. **Reprod Biol Endocrinol** 8; 23, 2010.

MALSCHITZKY E, PIMENTEL AM, GARBADE P, JOBIM MIM, GREGORY RM, MATTOS RC. Management Strategies Aiming to Improve Horse Welfare Reduce Embryonic Death Rates in Mares. **Reprod Dom Anim** 50; 632–636, 2015.

MANN GE. Pregnancy rates during experimentation in dairy cows. **Vet J** 161; 301-5, 2001.

MARC M, PARVIZI N, ELLENDORF F, KALLWEIT E, ELSAESSER F. Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise test as physiological markers for evaluation of training status. **J Anim Sci** 78; 1936–46, 2000.

MAZIERO RRD, MARTIN I, MATTOS MCC, FERREIRA JCP. Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. **Vet e Zootec** 19(3); 366-372, 2012.

MCCUE P. **Diagnosis of ovarian abnormalities**. In ‘Recent Advances in Equine reproduction’. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. 17-Oct-2000.

MCCUE PM, SQUIRES EL. Persistent anovulatory follicles in the mare. **Theriogenology** 58; 541–543, 2002.

MELO UP, PALHARES MS, GHELLER VA, FILHO JMS, FERREIRA C, LEME FOP. Respostas neuroendócrinas à inanição em equinos. **Acta VetBrasilic** 5 (1); 24-32, 2011.

MERCER JG, HOGGARD N, WILLIAMS LM, LAWRENCE CB, HANNAH LT, TRAYHURN P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett** 387; 113-6, 1996.

MICHAEL AE, EVAGELATOU M, NORGATE DP, CLARKE RJ, ANTONIW JW, STEDMAN BA, BRENNAN A, WELSBY R, BUJALSKA I, STEWART PM, COOKE BA. Isoforms of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. **Mol Cel Endocrinology** 132; 43–52, 1997.

MIELL JP, ENGLARO P, BLUM WF. Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. **HormMetab Res** 28; 704–707, 1996.

MILLS D, NANKERVIS K. **Equine Behavior: Principles and Practice**. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1999. 232 p.

MOBERG GP. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. **J Anim Sci** 7; 1228-1235, 1987.

MOBERG GP. **Biological response to stress: implications for animal welfare**. In: Moberg, G.P., Mench, J.A.(Eds.). The biology of animal stress. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. 1-21 p.

MONDER C, LAKSHMI V. 1989 Evidence for kinetically distinct forms of corticosteroid 11-hydroxysteroid dehydrogenase in rat liver microsomes. **J Steroid Biochem** 32; 77–83, 1989.

MOREIRA F, GHELLER SM, MONDADORI RG, VARELA JÚNIOR AS, CORCINI CD, LUCIA T JR. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus, uterus and ovaries of Swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reprod Domest Anim** 49(6); 1074-8, 2014.

MORLEY SA, MURRAY JA. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. **J Equine Vet Sci** 34; 842–853, 2014.

MOSCHOS S, CHAN JL, MANTZOROS CS. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril**. 77(3):433-44, 2002.

MURAKAMI T, LIDA M, SHIMA K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 214; 1260—1267, 1995.

OGIER V, ZIEGLER O, MEJEAN L, NICOLAS JP, STRICKER-KRONGRAD A. Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord** 26 (4); 496-503, 2002.

OLIVEIRA JP, JACOB JCF, JESUS VLT, SILVA PCA. In uência da temperatura e umidade ambiente em um programa de transferência de embriões equinos, na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. **Rev Bras Med Vet** 37(2); 158-162, 2015.

OMURA T, MOROHASHI K. Gene regulation of steroidogenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol** 53;19–25, 1995.

PANDA BSK, PANDEY S, SOMAL A, PARMAR MS, BHAT IA, BAIJU I, BHARTI MK, SAI KUMAR G, CHANDRA V, SHARMA GT. Leptin supplementation in vitro improved

developmental competence of buffalo oocytes and embryos. **Theriogenology** 98; 116-122, 2017.

PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, BAKER MB, HECHT R, WINTERS D, BOONE T, COLLINS F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science** 28; 269 (5223); 540-3, 1995.

PEREIRA C.C.J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2005. 195p.

PÉREZ-PÉREZ A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MAYMÓ J, DUEÑAS JL, VARONE C, SÁNCHEZ-MARGALET V. Role of leptin in female reproduction. **Clin Chem Lab Med** 53 (1); 15–28, 2015.

RABIN DS, JOHNSON EO, BRANDON DD. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. **Biol Reprod** 42; 74- 80, 1990.

RADIN MJ, LESLIE CS, BETHANY JH. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Vet ClinPathol**. 38; 136–156, 2009.

RAMSAY TG. Porcine leptin inhibits lipogenesis in porcine adipocytes. **J Anim Sci** 81; 3008–17, 2003.

RESELAND JE, ANDERSSSEN SA, SOLVOLL K, HJERMANN I, URDAL P, HOLME I, DREVON CA. Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. **Am J Clin Nutr** 73 (2); 240-5, 2001.

RIBEIRO SML, SANTOS ZA, DA SILVA RJ, LOUZADA E, DONATO JUNIOR J, TIRAPEGUI J. Leptina: Aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorreia do esforço. **Arq Bras Endocrinol Metab** 51; 11-23, 2007.

RICCI R, BEVILACQUA F. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. **Vet J** 191; 292–298, 2012.

RIVIER C, VALE W. Influence of corticotrophin-releasing factor (CRF) on reproductive functions in the rat. **Endocrinology** 114; 914-919, 1984.

RIVIER C, RIVEST S. Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol Reprod** 45; 523-532, 1991.

ROMERO CEM, ZANESCO A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev Nutr** 19; 85-91, 2006.

SAKETOS M, SHARMA N, SANTORO NF. Suppression of the hypothalamicpituitary-ovarian axis in normal women by glucocorticoids. **Biol Reprod** 49; 1270-1276, 1993.

SALADIN R, DE VOS P, GUERRE-MILLOT M, LETURQUE A, GIRARD J, STAELS B, AUWERX J. Transient increase in *obese* gene expression after food intake or insulin administration. **Nature** 377; 527-529, 1995.

SAPOLSKY RM, ROMERO ML, MUNCK AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinology** 89; 21-55, 2000.

SARKAR M, SCHILFFARTH S, SCHAMS D, MEYER HHD, BERISHA B. The Expression of Leptin and Its Receptor During Different Physiological Stages in the Bovine Ovary. **Mol Reprod Dev** 77; 174–181, 2010.

SCARLET D, ILLE N, ALVES BG, GASTAL GDA, GASTAL MO, GASTAL EL, AURICH C. Determining intrafollicular concentrations of cortisol and progesterone in horses and the effects of cortisol on *in vitro* maturation of equine oocytes. **Anim Reprod** 12 (3) ; 605, 2015.

SCARLET D, ILLE N, ERTL R, ALVES BG, GASTAL GDA, PAIVA SO, GASTAL MO, GASTAL EL, AURICH C. Glucocorticoid metabolism in equine follicles and oocytes. **Dom Anim Endocrinol** 59; 11–22, 2017.

SCHMID W, COLE TJ, BLENDY JA, SCHUTZ G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. **J Steroid Biochem Mol Biol** 53; 33–5, 1995.

SESSIONS DR, REEDY S E, VICK M M, MURPHY B A, FITZGERALD B P. Development of a model for inducing transient insulin resistance in the mare: Preliminary implications regarding the estrous cycle. **J Anim Sci** 82; 2321–2328, 2004.

SESSIONS-BRESNAHAN DR, CARNEVALE EM. The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. **J Anim Sci** 92; 1485-1494, 2014.

SESSIONS-BRESNAHAN DR, SCHAUER KL, HEUBERGER AL, CARNEVALE EM. Effect of Obesity on the Preovulatory Follicle and Lipid Fingerprint of Equine Oocytes. **Biol Reprod** 94 (1); 1–12, 2016.

SIROTKIN AV. Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to hormones. **J Exp Biol** 213, 2125-2130, 2010.

SMITH ER, JOHNSON J, WEICK R, et al. Inhibition of the reproductive system in immature rats by intracerebral implantation of cortisol. **Neuroendocrinology** 8; 94-106, 1971.

SMOLINSKA N, SIAWRYS G, KAMINSKI T, PRZALA J. Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs. **J Physiol Pharmacol** 58; 563–581, 2007.

SMOLINSKA N, KAMINSKI T, SIAWRYS G, PRZALA J. Expression of leptin and its receptor genes in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs. **Animal** 7, 109–117, 2013.

SOSA C, CARRIQUIRY M, CHALARC C, CRESPI D, SANGUINETTI C, CAVESTAND, MEIKLE A. Endometrial expression of leptin receptor and members of the growth hormone—insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. **Anim Reprod Sci.** 122; 208–214, 2010.

SPICER LJ, ALPIZAR E, ECHTERNKAMP SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. **J Anim Sci** 71 (5); 1232–41, 1993.

SPICER LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domest Anim Endocrinol** 21; 251-270, 2001.

STORER WA, THOMPSON DL JR, WALLER CA, CARTMILL JA. Hormonal patterns in normal and hyperleptinemic mares in response to three common feeding-housing regiments. **J Anim Sci** 85; 2873–2881, 2007.

TAMER EREL C, SENTURK LM. The impact of body mass index on assisted reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol** 21; 228-35, 2009.

TAROUCO AK, FREITAS CC, NEVES AP, GREGORY RM, MATTOS RC. Sexual and social behaviors of pony stallions and mares. **Anim Reprod** 6; 534–544, 2009.

TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMP LA, CLARK FT, DEEDS J. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell** 83; 1263–1271, 1995.

TATEO A, PADALINO B, BOCCACCIO M, MAGGIOLINO A, CENTODUCATI P. Transport stress in horses: effects of two different distances. **J Vet Beh: Clin Appl Res** 7; 33-42, 2012.

TERLOUW EMC, SCHOUTEN WGP, LADEWIG J. **Physiology**. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*. CAB International University Press, Cambridge, 1997. 143–158 p.

TETSUKA M, NISHIMOTO H, MIYAMOTO A, OKUDA K, HAMANO S. Gene expression of 11beta-HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: the role of follicular stimulating hormone. **J Reprod Dev** 56; 616–22, 2010.

TETSUKA M, THOMAS FJ, THOMAS MJ, ANDERSON RA, MASON JI, HILLIER SG. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab** 82; 2006–2009, 1997.

THARWAT M, AL-SOBAYI F. Influence of Transportation on the Serum Concentrations of the Cardiac Biomarkers Troponin I and Creatine Kinase-myocardial Band (CK-MB) and on Cortisol and Lactate in Horses. **J Equine Vet Sci** 34; 662- 667, 2014.

THATCHER CD, PLEASANT RS, GEOR RJ, ELVINGER F, NEGRIN KA, FRANKLIN J, GAY L, WERE SR. Prevalence of obesity in mature horses: an equine body condition study. **J Anim Physiol An** 92(2); 222, 2008.

THORN SR, MEYER MJ, VAN AMBURGH ME, BOISCLAIR YR. Effect of estrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepubertal dairy heifers. **J Dairy Sci** 90; 3742–3750, 2007.

TREIBER KH, KRONFELD DS, GEOR RJ. Insulin Resistance in Equids: Possible Role in Laminitis. **J Nutr** 136 (7); 2094S-22098, 2006.

UOTANI S, BJORBAEK C, TORNOE J, FLIER JS. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. **Diabetes** 48; 279 – 286, 1999.

VAN WEYENBERG S, HESTA M, BUYSE J, PAPADOPOULOS GA, JANSSENS GPJ. Short-term effects of energy changes on plasma leptin concentrations and glucose tolerance in healthy ponies. **Vet J** 178; 233–237, 2008.

VICK MM, SESSIONS DR, MURPHY BA, KENNEDY EL, REEDY SE, FITZGERALD BP. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: Effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. **Reprod Fertil Dev** 18; 609–617, 2006.

WABITSCH M, JENSEN PB, BLUM WF, CHRISTOFFERSEN CT, ENGLARO P, HEINZE E, RASCHER W, TELLER W, TORNQVIST H, HAUNER H. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. **Diabetes** 45; 1435–1438, 1996.

WALLER CA, THOMPSON Jr. DL, CARTMILL JA, STORER WA, HUFF NK. Reproduction in high body condition mares with high versus low leptin concentrations. **Theriogenology** 66; 923-928, 2006.

WANG H, FU J, WANG A. Expression of obesity gene and obesity gene long form receptor in endometrium of Yorkshire sows during embryo implantation. **Mol Biol Rep** 41; 1597–1606, 2014.

WENDREMAIRE M, BARDOU M, PEYRONEL C, HADI T, SAGOT P, MORRISON JJ, LIRUSSI F. Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis. **Am J Obstet Gynecol** 205 (363); 361–369, 2011.

WILLIAMS GL, AMSTALDEN M, GARCIA MR, et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Dom Anim Endocrinol** 5345; 1-11, 2002.

WILSON JS, MARION SR, SPAIN NJ, SPIERS ED, KEISLER HD, LUCY CM. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. **J Dairy Sci** 81; 2124-2131, 1998.

WYSE C, MCNIE K. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. **Vet Rec** 162; 590–1, 2008.

YAMASHITA T, MURAKAMI T, OTANI S, KUWAJIMA M, SHIMA K. Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. **Biochem Biophys Res Comm** 246; 752–759, 1998.

YONG PY, THONG KJ, ANDREW R, WALKER BR, HILLIER SG. Development-related increase in cortisol biosynthesis by human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab** 85; 4728–4733, 2000.

YOON SJ, CHA KY, LEE KA. Leptin receptors are downregulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. **Mol Cell Endocrinol** 232; 27–35, 2005.

ZAKRZEWSKA KE, CUSIN I, STRICKER-KRONGRAD A, BOSS O, RICQUIER D, JEANRENAUD B, ROHNER-JEANRENAUD F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. **Diabetes** 48; 365–70, 1999.

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 372; 425-32, 1994.