

As proteínas de relógios e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal de fêmeas de roedores

Clock protein and hypothalamus-pituitary gonadal axis of female rodents

Maristela de Oliveira Poletini

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Contato do autor: marispoletini@icb.ufmg.br

Resumo. A liberação hormonal de cada componente do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ocorre numa janela temporal circadiana, o que é fundamental para garantir o sucesso reprodutivo e a ovulação de fêmeas de mamíferos quer sejam ovuladores espontâneos ou induzidos. Um pico na secreção do hormônio luteinizante (LH) garante a ruptura do folículo ovariano e expulsão do óocito. Este pico é precedido pela hipersecreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) dos neurônios hipotálamicos. Em roedores, está bem definido que a ativação destas secreções é o resultado da integração de mecanismos neuroendócrinos cíclicos, tais como um aumento das concentrações plasmáticas de estradiol durante a fase folicular do ciclo estral e um sinal neural vindo dos núcleos supraquiasmáticos (NSQs). Além disso, têm-se acumulado evidências de que o funcionamento de cada um dos componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal tem a intermediação de proteínas do relógio biológico. Esta revisão discute estas evidências.

Palavras-chave. *Proteínas de relógio; Ovulação; Ratas; Hormônio luteinizante.*

Abstract. The components of hypothalamus-pituitary-gonadal axis release their products in a circadian-temporal window; this is crucial for the reproductive success in either spontaneous or inducible ovulators. The preovulatory surge of luteinizing hormone (LH) is preceded by a hypersecretion of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH). In rodents, it is already known that the timed, preovulatory activation of GnRH-secreting neurons depends on a complex interacting neuroendocrine mechanism involving two cyclic signals: an ovarian estradiol rise in plasma levels during the follicular phase of the estrous cycle and a neural signal from the suprachiasmatic nuclei (SCN). Evidences supporting the hypothesis that the hypothalamic-pituitary axis function depends on the integrity of an autoregulatory loop of expression of clock proteins on each of its components are increasing. This review discusses these evidences.

Keywords. *Clock protein; Ovulation; Female rats; Luteinizing hormone.*

Recebido 18out10
Aceito 03mai12
Publicado 27dez12

Do ponto de vista evolutivo, a reprodução serve como uma maneira de perpetuar características de uma espécie, por meio de uma linguagem universal composta de sequências de nucleotídeos. O sucesso do processo depende, na reprodução sexual, das diferentes estratégias encontradas pelos organismos que garantem que ocorra a união entre os gametas. Em vertebrados, o comportamento sexual, a produção e a liberação dos gametas são eventos orquestrados pelos produtos de liberação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Esta liberação ocorre de acordo com o ciclo de claro e escuro em que o animal está exposto, garantindo o controle temporal da fertilidade. Além disso, a fertilidade é aumentada em determinadas estações, garantindo que o nascimento da prole ocorra no momento em que o clima seja o mais adequado às características da espécie

e quando a disponibilidade de alimento é maior. Dentre todas as pistas ambientais, a variação fotoperiódica anual parece ser a pista decisiva que determina as variações sazonais da fertilidade (Kennaway, 2005). As mudanças da duração do claro e do escuro ao longo do ano controlam a liberação de melatonina, além de outros sinais hormonais e neurais (Reiter, 1980).

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um neuropeptídeo hipotalâmico, o qual estimula a adeno-hipófise a liberar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Estes hormônios, por sua vez, garantem a liberação pelas gônadas de hormônios de natureza esteroidal, dentre eles os estrógenos, os progestágenos e a testosterona, que são os mais importantes para a função reprodutiva. Estes esteróides podem exercer

diversas funções, que vão desde a plasticidade do sistema auditivo das fêmeas do peixe, *Porichthy notatus*, as quais são capazes de ouvir um som emitido pelos músculos sônicos das bexigas natatórias dos machos, somente na estação reprodutiva (Sisneros, 2009), até a participação em mecanismos de retroalimentação positiva e negativa. Estes mecanismos permitem que os esteróides exerçam uma ação estimulatória e/ou inibitória sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise, garantindo variações cíclicas nas secreções dos hormônios adeno-hipofisários, essenciais à oogênese em fêmeas de mamíferos.

A liberação de GnRH é pulsátil em machos e fêmeas de todas as espécies de mamíferos estudadas. A pulsatili-dade é crítica para sustentar a secreção hipofisária do LH e do FSH em fêmeas. Em roedores, o estradiol liberado pelos ovários tem ação inibitória sobre o eixo hipotálamo-hipófise durante a maior parte do ciclo estral. Entretanto, esta retroalimentação negativa é quebrada durante a fase folicular, quando o estradiol secretado abundantemente pelos folículos ovarianos passa a exercer ação estimuladora sobre o hipotálamo e a hipófise. A ação do estradiol ovariano leva a um aumento da secreção de GnRH por neurônios hipotalâmicos. Além disso, este aumento, provoca um pico de LH na fase do proestro. Em fêmeas de camundongos e de ratos (roedores noturnos), o horário do pico precede o início da atividade do animal (Christian et al, 2005; Legan e Karsch, 1975). É no momento do pico que ocorre a expulsão do oócito do folículo ovariano. Assim, na ocorrência da cópula, os óvulos estarão depositados nas trompas uterinas à espera dos espermatozoides (Freeman et al, 1994).

A quebra do mecanismo de retroalimentação negativa desempenhado pelos esteróides ovarianos sobre o hipotálamo e a hipófise e o estabelecimento do mecanismo de retroalimentação positiva que os mesmos hormônios assumem, é um dos aspectos mais desafiadores do controle neuroendócrino da reprodução. Em roedores, a retroalimentação positiva é exercida pelo estradiol (Freeman et al, 1994), e em aves pela progesterona (Johnson et al, 1985). Em ambos grupos de animais, acumulam-se evidências a favor da existência de uma janela temporal circadiana, em que os mecanismos de deflagração do pico de LH são ativos. O trabalho de Everett e Sawyer, realizado em 1950 (Everett e Sawyer, 1950), em fêmeas de ratos, comprova de forma clara a existência dessa janela. Estes pesquisadores e posteriormente outros, realizando experimentos em fêmeas de hamsters (Norman et al, 1972), observaram um atraso de 24 horas da ovulação e do pico de LH após a aplicação de anestesia profunda. A anestesia era administrada num momento preciso do dia do proestro e, se fosse repetida no dia seguinte no mesmo horário, o atraso de fase observado era prolongado por mais 24 horas. Em roedores, outras evidências apontam para a existência dessa janela temporal. Em fêmeas de ratos, atrasos ou adiantamentos no início da fase de claro provocam uma alteração no horário da ovulação (Hoffmann, 1969) e, em fêmeas de camundongos e de hamsters, alterações no período endógeno do ritmo de atividade são acompanhadas por alterações no horário do pico de LH (Lucas et

al, 1999; Miller et al, 2004).

Nos mamíferos, são os núcleos supraquiasmáticos (NSQs), localizados no hipotálamo, os responsáveis pela geração da ritmicidade e pela sincronização do relógio biológico com as pistas ambientais, traduzindo as informações do comprimento do ciclo de claro/escuro. São, por isto, considerados o relógio biológico central. Existem projeções diretas desta área do sistema nervoso central para os neurônios produtores de GnRH (Kalsbeek e Buijs, 2002) e a integridade dos NSQs é necessária para a ovulação (Wiegand et al, 1980). Assim, o sinal neural que participa do processo ovulatório, em roedores, pode ter sua origem nestes núcleos.

Mutações genéticas podem levar a alterações nos ritmos circadianos demonstrando que os relógios biológicos estão codificados no DNA (Hall e Rosbash, 1988). As primeiras mutações foram observadas em *Drosophila melanogaster* (mutação no gene *period*) (Konopka e Benzer, 1971) e depois em hamsters (mutação no gene *tau*) (Ralph e Menaker, 1988). Atualmente sabe-se que diversos genes constituem alças de retroalimentação positiva e negativa que são a base molecular da geração do ritmo biológico. Suas proteínas acumulam-se no citoplasma de maneira circadiana. Nos mamíferos, dois genes têm ação bastante importante: *Bmal1* e *Clock*, que constituem um heterodímero.

A descoberta de que os genes de relógio são expressos de maneira circadiana em vários tecidos periféricos e em várias regiões cerebrais (Balsalobre, 2002) mostra que o relógio biológico é composto, além do relógio central, por osciladores periféricos. Experimentos de transplantes de tecido dos NSQs em animais em que estes núcleos haviam sido lesados (Guo et al, 2006; LeSauter et al, 1996), ou em animais nocautes para *Bmal1*, restauram os ritmos circadianos nestes animais (Sujino et al, 2003). Transplantes de NSQs, provindos de animais geneticamente modificados que apresentam ritmos endógenos com diferentes períodos, para animais com lesão dos NSQs, induzem oscilações em que o período é determinado pelo doador (Pando et al, 2002). Com base nestes resultados, aceita-se a preponderância do relógio central sobre os relógios periféricos (tecidos periféricos e regiões cerebrais fora dos NSQs), cabendo ao primeiro, o papel de sincronizar os múltiplos relógios endógenos.

Acumulam-se evidências a favor da possibilidade de que as proteínas de relógio sejam parte do sinal circadiano responsável pelo pico pré-ovulatório de LH, o qual ocorre em sincronia com as variações no fotoperíodo. Os genes de relógio são expressos de maneira circadiana em neurônios GnRH, nos gonadotrófos hipofisários e nos ovários. Esta expressão está intimamente relacionada com a função dos componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Culturas de neurônios GnRH de camundongos, submetidas a tratamento com altas concentrações de soro fetal bovino, mostram expressão circadiana dos genes de relógio (Gillespie et al, 2003). A secreção pulsátil de GnRH é determinada pelas proteínas de relógio (Chappell et al, 2003). O estradiol garante indiretamente a hipersecreção de GnRH, atuando principalmente em uma população de neurônios

secretoras de um peptídeo denominado “kisspeptina” (Tena-Sempere, 2006). A kisspeptina estimula a secreção de GnRH. Em fêmeas de camundongos, a expressão do receptor para este peptídeo em neurônios GnRH depende da expressão das proteínas de relógio (Tonsfeldt et al, 2011), e em fêmeas de hamsters, a atividade dos neurônios kisspeptinérgicos oscila com um pico no meio do ciclo claro/escuro (Williams et al, 2011). Em relação à hipófise, a sensibilidade dos gonadotrófos hipofisários ao LH depende das proteínas de relógio, uma vez que a expressão do receptor para este hormônio é regulada pela proteína PERIOD 1 (Resuehr et al, 2009). A sensibilidade ovariana ao LH é também dependente do ciclo claro/escuro (Sellix e Menaker, 2010). Além disso, a cascata enzimática que leva à produção de esteróides pelos ovários depende do funcionamento da alça auto-regulatória de expressão dos genes de relógio (Nakao et al, 2007).

Estes resultados, em conjunto, corroboram a hipótese de que, além da ação sincronizadora exercida pelos NSQs sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, cada um dos componentes desse eixo funciona como um oscilador endógeno, garantindo que seu produto de liberação atue numa janela temporal determinada pela expressão das proteínas de relógio.

Camundongos mutantes que não expressam o gene *Clock* apresentam menor sucesso reprodutivo, redução no número de filhotes e prolongamento do ciclo estral (Miller et al, 2004). Estas descobertas sobre a participação das proteínas de relógios na função reprodutiva levam a novas análises sobre o paradigma dos mecanismos de retroalimentação exercidos pelos esteróides ovarianos. Juntamente com o fato de que estes mecanismos funcionam dentro de uma janela temporal circadiana, podemos concluir que podem ser gerados por um relógio biológico endógeno.

Referências

- Balsalobre A. 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Research* 309: 193-9.
- Chappell PE, White RS e Mellon PL. 2003. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *Journal of Neuroscience* 23: 11202-13.
- Christian CA, Mobley JL e Moenter SM. 2005. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 15682-7.
- Everett JW e Sawyer CH. 1950. A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*; 47: 198-218.
- Freeman ME, Knobil E e Neill JD. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In *The physiology of reproduction*. Raven Press: New York;: 613-58.
- Gillespie JM, Chan BP, Roy D, Cai F e Belsham DD. 2003. Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. *Endocrinology* 144: 5285-92.
- Guo H, Brewer JM, Lehman MN e Bittman EL. 2006. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *Journal of Neuroscience* 26: 6406-12.
- Hall JC e Rosbash M. 1988. Mutations and molecules influencing biological rhythms. *Annual Reviews of Neuroscience* 11: 373-93.
- Hoffmann JC. 1969. Light and reproduction in the rat: effect of lighting schedule on ovulation blockade. *Biology of Reproduction* 1: 185-8.
- Johnson PA, Johnson AL e van Tienhoven A. 1985. Evidence for a positive feedback interaction between progesterone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in the hen *Gallus domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* 58: 478-85.
- Kalsbeek A e Buijs RM. 2002. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Research* 309: 109-18.
- Kennaway DJ. 2005. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update* 11: 91-101.
- Konopka RJ e Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 2112-6.
- Legan SJ e Karsch FJ. 1975. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology* 96: 57-62.
- LeSauter J, Lehman MN e Silver R. 1996. Restoration of circadian rhythmicity by transplants of SCN “micropunches”. *Journal of Biological Rhythms* 11: 163-71.
- Lucas RJ, Stirland JA, Darrow JM, Menaker M e Loudon AS. 1999. Free running circadian rhythms of melatonin, luteinizing hormone, and cortisol in Syrian hamsters bearing the circadian tau mutation. *Endocrinology* 140: 758-64.
- Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH e Takahashi JS. 2004. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current Biology* 14: 1367-73.
- Nakao N, Yasuo S, Nishimura A, Yamamura T, Watanabe T, Anraku T, Okano T, Fukada Y, Sharp PJ, Ebihara S e Yoshimura T. 2007. Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology* 148: 3031-8.
- Norman RL, Blake CA e Sawyer CH. 1972. Delay of the proestrous ovulatory surge of LH in the hamster by pentobarbital or ether. *Endocrinology* 91: 1025-9.
- Pando MP, Morse D, Cermakian N e Sassone-Corsi P. 2002. Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* 110: 107-17.
- Ralph MR e Menaker M. 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*; 241: 1225-7.
- Reiter RJ. 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews* 1: 109-31.
- Resuehr HE, Resuehr D e Olcese J. 2009. Induction of mPer1 expression by GnRH in pituitary gonadotrope cells involves EGR-1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 311: 120-5.
- Sellix MT e Menaker M. 2010. Circadian clocks in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism*; 21: 628-36.
- Sisneros JA. 2009. Steroid-dependent auditory plasticity for the enhancement of acoustic communication: recent insights from a vocal teleost fish. *Hear Research* 252: 9-14.
- Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H e Inouye ST. 2003. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Current Biology* 13: 664-8.
- Tena-Sempere M. 2006. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update* 12: 631-9.

- Tonsfeldt KJ, Goodall CP, Latham KL e Chappell PE. 2011. Oestrogen induces rhythmic expression of the Kisspeptin-1 receptor GPR54 in hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone-secreting GT1-7 cells. *Journal of Neuroendocrinology* 23: 823-30.
- Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE e Goy RW. 1980. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 31: 147-57.
- Williams WP, 3rd, Jarjisian SG, Mikkelsen JD e Kriegsfeld LJ. 2011. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 152: 595-606.