IZABELA MARA DA SILVA ZANARDI

Estudo sobre a coexpressão do receptor de leptina e neuropeptídios no núcleo arqueado do hipotálamo. Correlação entre senescência e ovariectomia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Frazão

Versão original.

São Paulo
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Zanardi, Izabela
Estudo sobre a coexpressão do receptor de leptina e neuropeptídeos no núcleo arqueado do hipotálamo. Correlação entre senescência e ovariectomia. / Izabela Zanardi; orientador Renata Frazão. -- São Paulo, 2021.
46 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neurociência. 2. Envelhecimento. 3. Estrógenos. 4. Metabolismo. 5. Reprodução. I. Frazão, Renata , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Izabela Mara da Silva Zanardi

Título da Dissertação:

Estudo sobre a coexpressão do receptor de leptina e neuropeptídeos no núcleo arqueado do hipotálamo. Correlação entre senescência e ovariectomia

Orientador: Renata Frazão

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.4.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **21/2017/CEUA**, válido até **28/03/2021**, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Renata Frazão**, do Departamento de **Anatomia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Izabela Mara da Silva Zanardi** na equipe do Projeto de Pesquisa "*Possíveis mecanismos e influência da leptina no sistema nervoso durante a maturação sexual*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de fevereiro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.09.2021

São Paulo, 08 de abril de 2021.

Prezado(a) Professor(a),

Após análise de sua solicitação, informo que o projeto intitulado: **"Possíveis mecanismos e influência da leptina no sistema nervoso durante a maturação sexual"**, registrado sob o protocolo nº 21/2017 e aprovado em 28/03/2017, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 28/03/2023.**

E inclusão de animais aprovados na licença original, como descrito na tabela abaixo, para conclusão dos objetivos propostos.

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/peso	quantidade
Mus musculus	C57BL/6 (lepR-Cre/Tdtomato)	feminino	17/19 meses de vida	20
Mus musculus	C57BL/6 (lepR-Cre/Tdtomato)	masculino	17/19 meses de vida	20

Autorizamos a prorrogação de vigência de licença, com a declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Renata Frazão**
Docente do Departamento de Anatomia - ICB USP

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Possíveis mecanismos e influência da leptina no sistema nervoso durante a maturação sexual***", registrado sob o protocolo nº ***21/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***28/03/2017*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Renata Frazão***
- Departamento: *Anatomia*
- Membros da Equipe: *Daniella G de Paula (Iniciação científica), Tabata M Bohlen (Pós-graduando), Larissa campista Lana de Moraes (Pós-graduando), Marina A Silveira (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Leptin role on mice sexual maturation***", protocol nº ***21/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***3/28/2017*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Renata Frazão***
- Team members: *Daniella G de Paula (Undergraduate Student), Tabata M Bohlen (Graduate Student), Larissa campista Lana de Moraes (Graduate Student), Marina A Silveira (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57bl/6 (LepR-Cre/Tdtomato)*	*Fêmea/female*	*38-42 dias/days*	*80*
	C57bl/6 (LepR-Cre/Tdtomato)	*Fêmea/female*	*8-12 dias/days*	*80*
	C57bl/6 (LepR-Cre/Tdtomato)	*Fêmea/female*	*60-90 dias/days*	*160*
	C57bl/6 (LepR-Cre/Tdtomato)	*Macho/male*	*8-12 dias/days*	*80*
	C57bl/6 (LepR-Cre/Tdtomato)	*Macho/male*	*38-42 dias/days*	*80*
	C57bl/6 (LepR-Cre/Tdtomato)	*Macho/male*	*60/90 dias/days*	*80*

São Paulo, 29 de março de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

Aos meus pais, Iria e Donizete, por sempre acreditarem em mim e por terem abdicado de suas vidas em prol das minhas realizações e da minha felicidade.

À minha irmã Laira que é minha melhor amiga e teve orgulhou de mim.

À minha sobrinha e afilhada de apenas 3 meses, que se tornou o Sol dos nossos dias. Ayla, sua existência é o reflexo mais perfeito da existência de Deus.

À minha avó Alice (in memoriam), por ser pura luz e amor, a pessoa mais incrível que já conheci na vida.

Ao meu avô Francisco (in memoriam), que comemorou comigo cada etapa até eu chegar aqui, mas que não conseguirá comemorar mais essa comigo. Tenho certeza que estaria muito feliz e orgulhoso de mim agora.

Ao Victor, meu namorado e companheiro de tantos anos, que desde sempre me incentivou a ir atrás dos meus sonhos e esteve comigo nos momentos de conquistas e de derrotas também.

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biomédicas III e Programa de Pós-Graduação Biologia de Sistemas, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa científica na melhor Universidade do País.

À CAPES pelo apoio concedido para a realização deste trabalho.

Aos professores **Drs. Raphael Scorsim**, **Marúcia Chacur** e **Isadora Furigo**, pelos conselhos e dicas valiosas durante a qualificação, que me auxiliaram a finalizar este trabalho.

Aos **membros dessa banca examinadora**, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Agradeço também a todos os **professores e funcionários do Departamento de Anatomia**, que contribuíram direta ou indiretamente para que essa pesquisa chegasse até aqui. Quero agradecer aos técnicos do biotério, especialmente ao **Renivaldo**, que sempre cuidou com muito carinho e atenção dos animais, e esteve sempre disposto a nos ajudar, muito obrigada!

À Professora **Dra. Renata**, pela orientação, competência, profissionalismo, dedicação e principalmente, pela amizade. Obrigada pela confiança e por acreditar em mim até quando eu mesma não acreditava. Por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. Eu não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Você é meu espelho de profissional. Obrigada!

Aos meus amigos e companheiros de pesquisa **Naira**, **Henrique** e **Estela**, por todo apoio e ajuda, tanto emocional quanto profissional. Meu dia a dia nesses dois anos foram muito mais felizes com vocês ao meu lado, já sinto falta do nosso convívio. Obrigada pelos conselhos e, principalmente, pela preocupação e incentivo constantes. Obrigada em especial à Naira, que me acolheu em sua casa logo que cheguei em São Paulo, serei eternamente grata por tua sua generosidade e companheirismo.

A todos os demais amigos da pós-graduação **Thaís**, **Ammir**, **Jean**, **Bianca**, **Roberta**, **Felipe**, **Bárbara** e **Victor**, obrigada por estarem sempre por perto, pelos desabafos compartilhados e pelos momentos felizes que vivemos.

Aos meus amigos **Vinicius**, **Bianca**, **Maria**, **Keller**, **Karina**, **Lilian**, **Marcelo** e **Heloisa**, vocês são parte de mim e mesmo longe sempre estarão comigo.

À minha família, **mãe**, **pai** e **irmã**, obrigada por acreditarem em mim, por compreenderem a minha distância e minha ausência em inúmeras comemorações, finais de semana, aniversários e reuniões. Obrigada também por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação e por fazerem o impossível pelos meus sonhos. Sou muito orgulhosa e privilegiada por ter uma família tão especial.

Ao meu parceiro de vida ao longo desses 11 anos, **Victor**, obrigada por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada, você é o meu lar. Obrigada por ser o meu maior incentivador em TUDO. Obrigada pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88887.463635/2019-00"

“Já havia sido bem entendido por cientistas e filósofos da antiguidade clássica, que a Terra era um mero ponto de luz em um vasto cosmos circundante, mas ninguém jamais a tinha visto assim. Aqui estava nossa primeira chance, e talvez a nossa última nas próximas décadas (…)

(…) Desse ponto de vista, nossa obsessão com nacionalismo não aparece em evidencia. Nós somos muito pequenos. Na escala dos mundos, humanos são irrelevantes, uma fina película de vida num obscuro e solitário torrão de rocha e metal.

Considere novamente esse ponto. É aqui. É nosso lar. Somos nós. Nele, todos que você ama, todos que você conhece, todos de quem você já ouviu falar, todo ser humano que já existiu, viveram suas vidas. A totalidade de nossas alegrias e sofrimentos, milhares de religiões, ideologias e doutrinas econômicas, cada caçador e saqueador, cada herói e covarde, cada criador e destruidor da civilização, cada rei e plebeu, cada casal apaixonado, cada mãe e pai, cada crianças esperançosas, inventores e exploradores, cada educador, cada político corrupto, cada “superstar”, cada “lidere supremo”, cada santo e pecador na história da nossa espécie viveu ali, em um grão de poeira suspenso em um raio de sol.”

“Nosso planeta é um espécime solitário na grande e envolvente escuridão cósmica. Na nossa obscuridade, em toda essa vastidão, não há nenhum indicio que ajuda possa vir de outro lugar para nos salvar de nós mesmos. Goste ou não, por enquanto, a terra é onde estamos estabelecidos. Foi dito que a astronomia é uma experiência que traz humildade e constrói o caráter. Talvez, não haja melhor demonstração das tolices e vaidades humanas que essa imagem distante do nosso pequeno mundo. Ela enfatiza nossa responsabilidade de tratarmos melhor uns aos outros, e de preservar e estimar o único lar que nós conhecemos… o pálido ponto azul”

(O Pálido Ponto Azul- Carl Sagan)

“Se eu pudesse deixar um presente à você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: O de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

(Mahatma Ghandi – Se eu Pudesse)

RESUMO

ZANARDI, I, M, S. **Estudo sobre a coexpressão do receptor de leptina e neuropeptídios no núcleo arqueado do hipotálamo. Correlação entre senescência e ovariectomia.** 2021. 48 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A senescência é um processo biológico que provoca disfunções hormonais e fisiológicas bem estabelecidas nos mamíferos. Na mulher as consequências da senescência levam, inclusive, à perda da qualidade de vida. Assim sendo, muito trabalhos investigaram as consequências da diminuição dos esteroides sexuais circulantes em fêmeas, utilizando animais ovariectomizados como modelo experimental. Por outro lado, há trabalhos que questionam se a ovariectomia seria um modelo representativo do envelhecimento. Estudos demonstraram que a remoção dos ovários provoca ganho de peso significativo, aumento da leptina sérica e aumento do RNAm que codifica a expressão do receptor de leptina (LepR), dentre outros genes, no hipotálamo de fêmeas. Porém, ainda não há na literatura dados comparando se efeitos semelhantes são observados devido a senescência. O núcleo arqueado do hipotálamo (ARH), particularmente, contém diferentes populações neuronais que expressam o LepR e são responsáveis pela regulação do balanço energético e modulação de aspectos reprodutivos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar parâmetros fisiológicos e morfológicos encontrados em fêmeas controle (adultas jovens, média de 12 semanas de vida), fêmeas idosas (média de 78 semanas de vida) e fêmeas submetidas à ovariectomia (OVX, média de 16 dias de vida), tais como ciclo estral, peso corporal, peso uterino e quantificação de neurônios no ARH. Para a realização desse estudo, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca para coleta e processamento dos encéfalos e, coleta dos úteros para avaliação do peso. Séries representativas dos cortes encefálicos foram submetidos a técnica de imunoistoquímica para detecção de peptídeos relacionados à modulação do balanço energético e reprodução (α-MSH, βendorfina e kisspeptinas) e sua coexpressão com LepR no ARH. Na avaliação dos resultados observamos que não houve variação significativa no número de neurônios que expressam o LepR entre os grupos experimentais. Fêmeas idosas apresentaram ciclo estral irregular, além de aumento significativo de peso uterino em comparação a fêmeas controle (adultas jovens). Em fêmeas idosas, o número de neurônios que expressavam α-MSH, βendorfina ou kisspeptinas foi similar ao encontrado no grupo controle. O percentual de células que coexpressavam o LepR e cada peptídeo mencionado foi semelhante entre fêmeas idosas e fêmeas do grupo controle. Em contrapartida, fêmeas OVX não apresentaram ciclo estral e tiveram diminuição significativa do peso uterino. O procedimento de remoção dos ovários, induziu aumento do número de neurônios que expressam as kisspeptinas e o gene *Kiss1*, em comparação ao grupo controle. Além disso, fêmeas OVX apresentaram diminuição do percentual de neurônios que coexpressavam βendorfina e LepR na porção rostral do ARH, e aumento expressivo do percentual de neurônios que coexpressavam kisspeptinas e o LepR, nos níveis rostrais e caudais do ARH. Nossos achados evidenciam que a senescência e ovariectomia representam modelos fisiológicos distintos, sugerindo assim, que há diferenças importantes que precisam ser consideradas na escolha de um ou outro modelo experimental, ao menos em estudos que se referem à avaliação do ARH.

Palavras-chaves: Envelhecimento. Estrógenos. Metabolismo. Neurociência. Reprodução.

ABSTRACT

ZANARDI, I, M, S. **Study on the co-expression of the leptin receptor and neuropeptides in the arcuate nucleus of the hypothalamus. Correlation between senescence and ovariectomy**. 2021. 48 p. Dissertation (Masters thesis in Systems Biology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Senescence is a biological process which causes well known hormonal and physiological disfunctions in mammals. For women, its repercussions lead to a loss of quality of life. Therefore, many researchers investigated the consequences of diminished circulating sex steroids in females by using ovariectomized animals as experimental model, whereas other studies question whether ovariectomy is a faithful representative model to aging. Reports showed that ovary removal results in significant weight gain, higher levels of serum leptin and increased expression of mRNA that codifies the expression of leptin receptor (LepR) and other genes in the female hypothalamus. However, there are no data comparing if similar effects are due to senescence. The arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) particularly contains different LepR expressing neural populations, which are responsible for regulating energetic balance and modulating reproductive functions. Thus, the objective of the present study was to compare physiological and morphological baselines found in control females (young adults, 12 weeks of age), aged females (78 weeks of age) and ovariectomized females (OVX, 16 weeks of age), such as estrous cycle, body weight, uterine weight and ARH neurons quantification. In order to perform this study, animals were submitted to transcardial perfusion to collect brains to be processed and uteruses to be weighted. Representative series of brain slices were subjected to immunohistochemical processing to detect peptides related to the modulation of energetic and reproductive balance (α-MSH, β-endorphin and kisspeptins) and their coexpression with LepR in the ARH. We found no significant variation in the number of LepR expressing neurons among experimental groups. Aged females showcased irregular estrous cycle and a noteworthy increase in uterine weight when compared to control females (young adults). In aged females, the amount of α-MSH, β-endorphin or kisspeptins expressing neurons was similar to that of the control group. Yet, OVX females had no estrous cycle and had a significant decrease in uterine weight. Ovary removal induced kisspeptin and *Kiss1* expressing neurons to raise in quantity in comparison to the control group. Furthermore, OVX females showed lower percentage of neurons that coexpressed β-endorphin and LepR in the frontal portion of the ARH, and an expressively higher percentage of neurons that coexpressed kisspeptins and LepR in the rostral and caudal portions of the ARH. Our findings demonstrate that senescence and ovariectomy represent distinct physiological models, suggesting that there are important differences that need to be considered when choosing between the experimental models, at least in studies regarding ARH nucleus evaluation.

Keywords: Aging. Estrogens. Metabolism. Neuroscience. Reproduction.

LISTRA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 Organograma dos procedimentos experimentais.....19
Tabela1 Concentração dos anticorpos utilizados na técnica de imunoistoquímica fluorescente.....20
Figura 2 Avaliação do ciclo estral.....22
Figura 3 Caracterização dos modelos experimentais.....23
Figura 4 Avaliação de neurônios que expressam o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α–MSH) e coexpressam o receptor de leptina (LepR) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....24
Figura 5 Avaliação de neurônios que expressam o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α–MSH) e coexpressam o receptor de leptina (LepR) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....25
Figura 6 Quantificação de neurônios que expressam hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α–MSH) e coexpressam o receptor de leptina (LepR) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....26
Figura 7 Quantificação de neurônios que expressam βendorfina e coexpressam o receptor de leptina (LepR) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....27
Figura 8 Avaliação de neurônios que expressam kisspeptinas e coexpressam o receptor de leptina (LepR) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....28
Figura 9 Quantificação de neurônios que expressam kisspeptinas e coexpressam o receptor de leptina (LepR) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....29
Figura 10 Avaliação do número de neurônios que expressam a proteína fluorescente verde renilla humana (hrGFP) sob o controle transcricional do gene *Kiss1* no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....31
Figura 11 Quantificação de neurônios que expressam a proteína endógena verde fluorescente renilla humana (hrGFP) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH).....32

LISTA DE SIGLAS

ARH - Núcleo Arqueado do hipotálamo

AVPV - Núcleo Anteroventral Periventricular

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GFP - Proteína Verde Fluorescente

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

HPG - Hipotálamo-hipófise-gonadal

LepR - Receptor de Leptina

LH - Hormônio Luteinizante

NPY - Neuropéptido Y

OVX- Ovariectomia

PeN - periventricular anterior

POMC - Pró-Opiomelanocortina

RNAm - RNA mensageiro

SNC - Sistema Nervoso Central

α-MSH - Hormônio estimulador de melanócito alpha

SUMÁRIO

RESUMO 13

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 Senescência reprodutiva 21

2 OBJETIVOS 23

3 MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1 Padronização do Modelo Experimental 24

3.2 Procedimento cirúrgico 25

3.3 Perfusão transcardíaca 25

3.4 Imunoistoquímica fluorescente 25

3.5 Análise Quantitativa de Neurônios 267

3.6 Análise Estatística 267

4 RESULTADOS 27

4.1 Quantificação de neurônios que expressam o hormônio estimulador de alfa-melanócitos e coexpressam o LepR no ARH 28

4.2 Quantificação de neurônios que expressam βendorfina e coexpressam o LepR no ARH 31

4.3 Quantificação de neurônios que expressam kisspeptinas e coexpressam o LepR no ARH 33

4.4 Quantificação de neurônios que expressam o gene Kiss1 no ARH 36

5 DISCUSSÃO 39

6 CONCLUSÃO 42

REFERÊNCIAS 43

1 INTRODUÇÃO

O núcleo arqueado do hipotálamo (ARH) está localizado na base do hipotálamo, circundando a parte ventral do terceiro ventrículo e se conectando intimamente com a eminência mediana e a hipófise. A organização anatômica dessa estrutura permite a integração de informações neuroendócrinas e, dessa forma, o desempenho de funções importantes como a regulação do metabolismo, da fertilidade e da função cardiovascular (CHRONWALL, 1985). Diferentes neuropeptídios são sintetizados pelos variados grupos de neurônios presentes no ARH, por exemplo: neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo relacionado a *Agouti* (AgRP), pró-opiomelanocortina (POMC), ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, kisspeptinas, dentre outros (; ELIAS et al., 2000; CRAVO et al., 2011). Algumas populações de neurônios do ARH expressam a isoforma longa do receptor de leptina (LepR), tornando esse núcleo em um potente mediador dos efeitos da leptina na homeostase energética (BOURET et al., 2004). A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo em proporção à quantidade de estoques de energia corporal (DA SILVA et al 2014; CRAVO et al., 2013).

No que se refere ao controle da ingestão alimentar, sabe-se que a leptina atua principalmente em duas classes de neurônios do núcleo ARH: inibindo neurônios que sintetizam o NPY e a AgRP, e ativando neurônios POMC e transcritos relacionados a anfetamina e cocaína (CART) (DAMIANI, 2011). A ativação de neurônios POMC modula a inibição do apetite, já que estes são agentes anorexígenos (COWLEY et al., 2001; SWART et al., 2002; WILLIAMS et al., 2010). Além disso, a molécula POMC também é precursora de diversos neuropeptídios com diferentes funções; dois exemplos são a β-endorfina e o hormônio alfa estimulador de melanócitos (α-MSH) (BASKIN et al., 1999; HILL et al., 2010; TURNER et al., 1983). A βendorfina é um opioide endógeno que desempenha a função de inibir a produção de hormônios do estresse e promover sensação de bem-estar e analgesia. Sabe-se ainda que baixos níveis de βendorfina no sistema nervoso central (SNC), está associado ao surgimento de doenças relacionadas com a depressão e transtornos de estresse (SARKAR et al., 2021; DARKO et al., 1992). O α-MSH tem uma função bem estabelecida no SNC, que é modular a ingestão alimentar diminuindo a fome, através da ativação de receptores de melanocortina (RODRIGUES et al., 2003). Além disso, α-MSH é um peptídeo neuroimunomodulador endógeno, pois exerce efeito anti-inflamatório a partir da inibição da febre e outras formas de inflamação (LIPTON; CATANIA, 1997).

A leptina também é um hormônio importante para a regulação do sistema reprodutivo, sendo que alterações da ingestão alimentar e/ou peso corporal invariavelmente resultam em alterações desse sistema (DA SILVA et al., 2014; ZAMPIERI et al., 2020; MARGETIC et al., 2002, DONATO et al., 2011). Camundongos mutantes que não produzem leptina nem o seu receptor produzem baixos níveis de gonadotrofinas, desenvolvimento incompleto dos órgãos reprodutivos e infertilidade, sendo o tratamento com leptina capaz de reverter esse quadro. Porém, os mecanismos neurais pelos quais as informações nutricionais são transferidas ao sistema reprodutivo ainda não estão completamente esclarecidos (BARASH et al., 1996; CHEHAB; LIM; LU, 1996; MOUNZIH; LU; CHEHAB, 1997). No que se refere ao sistema reprodutivo, os neurônios que expressam o gene *Kiss1* no ARH sintetizam as kisspeptinas, que são essenciais para a manutenção das funções reprodutivas através de sua sinalização em neurônios que secretam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Os neurônios GnRH expressam o receptor reconhecido pelas kisspeptinas, denominado Kiss1r (HAN et al., 2005; MESSAGER et al., 2005). Os neurônios que expressam o gene *Kiss1* do ARH são responsáveis pela modulação do mecanismo de retroalimentação negativa que informa os neurônios GnRH quando os níveis circulantes de estrógenos são considerados basais ou diminuídos, além do controle do ritmo pulsátil de liberação de GnRH (LEHMAN et al., 2018). Cerca de 10 a 15% dos neurônios *Kiss1* no ARH coexpressam a isoforma funcional do LepR (LepRb) em fêmeas adultas em diestro, enquanto 40% dos neurônios *Kiss1* no ARH coexpressam o LepR, em machos castrados (SMITH et al., 2006). Os neurônios que expressam o gene *Kiss1* também estão distribuídos em outras áreas, como nos núcleos periventricular anteroventral e porção rostral do periventricular anterior (AVPV/PeN), porém estes não coexpressam o LepRb, não sendo, portanto, considerados diretamente responsivos à leptina (CRAVO et al., 2011; CRAVO et al., 2013).

Evidências recentes apontam que os neurônios que expressam o gene *Kiss1* também podem estar envolvidos na modulação da ingestão alimentar. Experimentos eletrofisiológicos demonstraram que as kisspeptinas são capazes de excitar diretamente os neurônios POMC e inibir os neurônios AgRP indiretamente (FU; VAN DEN POL, 2010). Camundongos tratados com kisspeptina via intraperitoneal, reduzem o consumo alimentar sugerindo um efeito anorexígeno deste peptídeo na ingestão alimentar (STENGEL et al., 2011). Além disso, camundongos, fêmeas, com deleção global do receptor Kiss1r, têm menor percentual de massa magra, maior percentual de gordura corporal, menor temperatura corporal, além de metabolismo reduzido (TOLSON et al., 2019a; TOLSON et al., 2019b).

1.1 Senescência reprodutiva

A atividade reprodutiva é coordenada pela interação entre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG), secreção de hormônios e estímulos neuronais (HAISENLEDER et al., 2007). Os neurônios que sintetizam GnRH liberam este hormônio de forma pulsátil, o qual atuará na hipófise anterior, desencadeando a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Os hormônios FSH e LH, denominados em conjunto como gonadotrofinas, atuam nas gônadas (testículos e ovários) estimulando a produção de hormônios esteroides (testosterona, estrógenos e progesterona) e promovendo a gametogênese (ROCHA et al., 2011). Os estrógenos são hormônios sexuais femininos produzidos principalmente pelos ovários, e exercem funções fisiológicas como o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação e preparo cíclico do trato reprodutor para implantação do óvulo (AMADEI et al., 2006). A progesterona, por sua vez, é um hormônio sexual que prepara o organismo para a gestação, estimula o desenvolvimento das glândulas mamárias para a lactação e facilita a implantação do zigoto no útero (RUBINOW; SCHMIDT, 2006). Os estrógenos e progesterona realizam retroalimentação no sistema nervoso e hipófise, modulando a secreção do GnRH e das gonadotrofinas (ROCHA et al., 2011). Além disso, estrógenos também atuam modulando a distribuição e o acúmulo de gordura corporal (HAARBO et al., 1991; POEHLMAN; TOTH; GARDNER, 1995). Portanto, entende-se que a interação entre os esteroides sexuais circulantes, os neurônios GnRH e neurônios que expressam o gene *Kiss1* são essenciais para a maturação e manutenção do eixo HPG ao longo da vida (ROCHA et al., 2011).

O processo do envelhecimento provoca mudanças significativas que envolvem alterações comportamentais, neuroendócrinas e fisiológicas. Nos camundongos, a senescência reprodutiva ocorre em média aos 15 meses de idade, mas para que um camundongo seja considerado idoso ele deve ter pelo menos 18 meses de vida, quando são identificados biomarcadores da senescência (DUTTA & SENGUPTA, 2016). Em humanos, especificamente em mulheres, a senescência reprodutiva acontece entre 40 e 55 anos de idade e é dividida nos seguintes estágios: perimenopausa, menopausa e pós-menopausa (VIGETA; BRÊTAS, 2004; PEDRO et al., 2003). A perimenopausa é a preparação para a última menstruação, fase demarcada pela irregularidade do ciclo menstrual e dos níveis de hormônios sexuais. A menopausa define o encerramento da atividade folicular dos ovários e é reconhecida somente após um ano de amenorreia. Já a pós-menopausa se trata da época

após a última menstruação (BRINTON, 2009; DIAZ BRINTON, 2012; BIMONTE-NELSON; BERNAUD; KOEBELE, 2021). A senescência reprodutiva promove sintomas fisiológicos diversos, tais como o aumento dos níveis das gonadotrofinas FSH e LH (AUGOULEA et al., 2005), ganho de peso corporal, osteoporose, atrofia urogenital, irritabilidade, insônia e variação de humor (GAMBACCIANI et al., 1999; ALDRIGHI, 2002; DE LORENZI et al., 2005; AMADEI et al., 2006). Dessa forma, tem sido cada vez mais importante estudar modelos animais que mimetizam a menopausa humana, para que possamos compreender as consequências desse processo biológico que afeta milhares de mulheres todos os anos (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). Um modelo animal amplamente utilizado para simular a menopausa é a remoção cirúrgica dos ovários (ovariectomia). Nesse modelo, assim como na menopausa, a ovulação é encerrada e há a queda na produção de estrógenos e progesterona (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; SOUZA et al., 2018). A ovariectomia induz aumento da ingestão alimentar, redução na atividade locomotora e gasto energético, ganho de peso e aumento acentuado nos níveis de leptina sérica (HENRIQUES et al., 2010; DA SILVA et al., 2014). Além disso, a diminuição dos esteroides sexuais induzido pela ovariectomia é seguida pelo aumento significativo dos RNAm que codificam a expressão do gene *Kiss1*, gene POMC e LePR hipotalâmico (DA SILVA et al., 2014; HELENA et al., 2015; MITTELMAN-SMITH et al., 2016; KIM et al., 2009), bem como, aumento significativo da coexpressão de LepR em neurônios que expressam o gene *Kiss1* no ARH (CRAVO et al., 2013).

Portanto, as evidências apresentadas sugerem que a coexpressão do LepR em neurônios do ARH, particularmente os que expressam o gene *Kiss1*, é influenciada pelos níveis de hormônios sexuais. Até o momento não há descrição na literatura se a senescência natural induz efeitos similares aos efeitos induzidos pela ovariectomia. Além disso, também não há estudos que demonstram se outras populações de neurônios, como aquelas que expressam o α-MSH e βendorfina, apresentam alterações na coexpressão do LepR no ARH, em decorrência da senescência ou devido a diminuição de hormônios sexuais. No presente estudo iremos avaliar a coexpressão entre o LepR e neuropeptídeos do ARH, em três condições diferentes, fêmeas adultas jovens, idosas ou adultas jovens submetidas à ovariectomia.

2 OBJETIVOS

- ✓ Comparar diferentes parâmetros obtidos de animais controle (fêmeas adultas jovens), fêmeas idosas e fêmeas adultas submetidas à ovariectomia, como padrão de ciclicidade estral, peso corporal e peso uterino;
- ✓ Determinar se o envelhecimento e/ou ovariectomia, induzem alterações significativas no número de neurônios que expressam o α-MSH, a βendorfina ou as kisspeptinas no ARH;
- ✓ Determinar se o envelhecimento e/ou ovariectomia, induzem alterações significativas na coexpressão do LepR e neurônios sintetizam α-MSH, βendorfina ou kisspeptinas no ARH;
- ✓ Avaliar se o envelhecimento induz alteração significativa na expressão do gene *Kiss1* no núcleo ARH.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente projeto foram utlizados:

- Camundongos geneticamente modificados que expressam a enzima Cre recombinase sob o controle transcricional do gene que codifica o LepR, e a proteína fluorescente vermelha tdTomato, flanqueada por um alelo lox-p que limita a expressão da proteína fluorescente (LepR-Cre/tdTomato) (NAGAISHI et al., 2014).

- Camundongos geneticamente modificados nos quais a proteína fluorescente verde humanized renilla (hrGFP) é expressa sob o controle transcricional do gene *Kiss1* (Kiss1/hrGFP) (CRAVO RM 2013).

Os animais foram alojados no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com temperatura (21-23°C) e período claro-escuro (luz 12h/escuro 12h) controlados. Os experimentos e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, protocolo 21/2017.

3.1 Padronização do Modelo Experimental

Ao completarem três semanas, os filhotes gerados foram desmamados e a ponta da cauda cortada para a realização da genotipagem pela técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa (PCR). Ao completarem oito semanas de idade, as fêmeas com genótipo de interesse foram incluídas no protocolo experimental. Todos os animais foram submetidos à análise do ciclo estral. A avaliação do ciclo estral foi realizada através da análise dos tipos de células encontradas no lavado vaginal (BYERS et al., 2012). Sendo que cada ciclo foi contabilizado a partir do primeiro dia em que células do tipo leucócito foram visualizadas, até o último dia em que células do tipo cornificadas foram encontradas no lavado vaginal, e assim sucessivamente. Fêmeas que apresentaram ciclo estral regular foram divididas em três grupos experimentais: fêmeas adultas (média de 12 semanas de vida, n=13), fêmeas idosas (média de 78 semanas, n=8) e fêmeas submetidas à procedimento para remoção dos ovários (OVX) (média de 16 semanas de vida, n=13). Todas os animais foram pesados semanalmente durante o período de acompanhamento, e o sacrifício realizado em horário específico do dia (14:00 – 16:00).

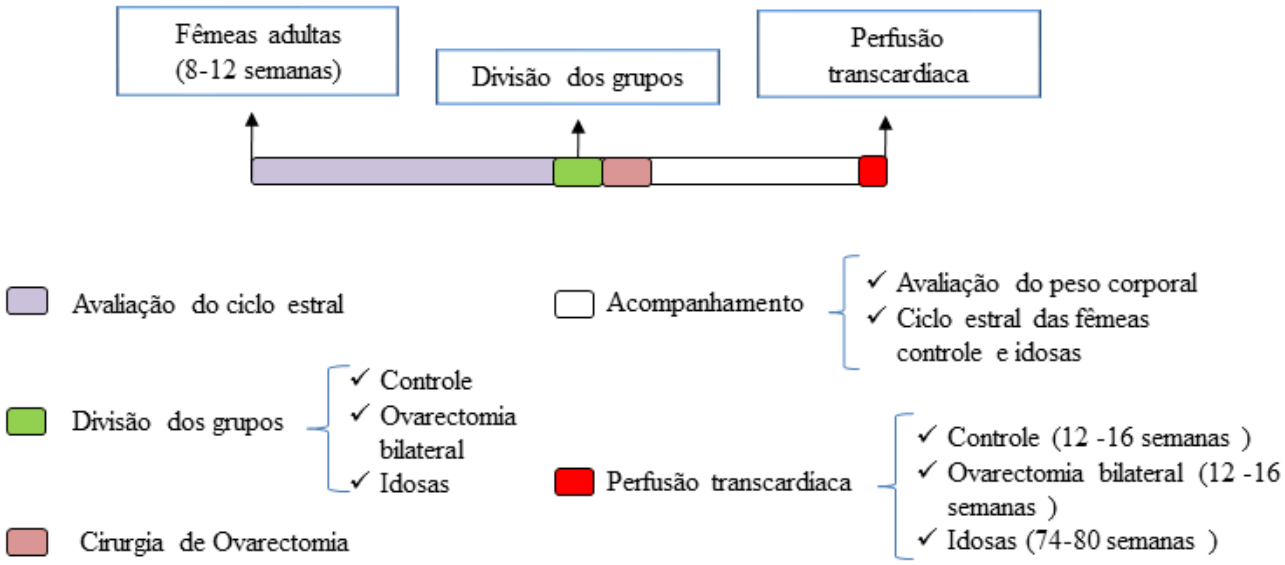

Figura 1. Organograma dos procedimentos experimentais: As fêmeas foram separadas em três grupos experimentais: grupo controle, idosas e submetidas à ovariectomia (OVX). Todos os grupos foram acompanhados semanalmente para avaliação do peso corporal e ciclo estral, ao final do protocolo todos os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

3.2 Procedimento cirúrgico

Fêmeas adultas (12 semanas), foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX). Para a realização do procedimento cirúrgico, anestesiamos profundamente os animais com isofluorano. Após a sedação, foi realizada uma incisão na região dorsal e lateral, entre o rebordo costal inferior e a coxa, após assepsia desta região. Pele e camada muscular foram seccionados para acessarmos a cavidade abdominal. Após localização do ovário o mesmo foi removido e a camada muscular e pele foram suturadas na sequência. Em seguida, o procedimento foi repetido do lado contralateral para a retirada do outro ovário.

3.3 Perfusão transcardíaca

Os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e coleta dos tecidos quando detectamos predomínio de leucócitos no lavado vaginal. Fêmeas OVX foram submetidas à perfusão transcardíaca após 30 dias do procedimento cirúrgico. Para o procedimento de perfusão, os animais foram anestesiados com isofluorano e depois da confirmação da sedação foi feito um corte utilizando o manúbrio do esterno como referência para abertura da caixa torácica. O átrio direito foi puncionado e uma cânula acoplada à uma bomba de perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo para que uma solução de salina 0,9% percorresse por todo corpo. Na sequência, foi infundida uma solução de formalina tamponada, por aproximadamente 10 minutos. Por fim, o encéfalo e útero foram

cuidadosamente coletados. O útero foi pesado após a perfusão, e no caso do grupo OVX utilizado como um controle do procedimento cirúrgico. O encéfalo foi pós fixado em solução tamponada de formalina por 1 hora e na sequência transferido para uma solução tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M mais 20% de sacarose, por cerca de 18-24 horas para que ocorresse a crioproteção do tecido. Em seguida, o encéfalo foi seccionado coronalmente (30 µm de espessura), com uso de micrótomo de congelamento (SM2010R, Leica) e organizados em quatro séries representativas. Os cortes foram colocados em solução crioprotetora e armazenados em freezer a -20 ºC até serem submetidos a técnica de imunoistoquímica.

3.4 Imunoistoquímica fluorescente

Os cortes foram lavados com KPBS 0.02M, 3 vezes por 10 minutos, depois foram incubados em solução contendo KPBS 0.02M, Triton e 3% de soro normal, durante uma hora. Em seguida, os cortes foram incubados separadamente em tubos contendo solução de KPBS 0.02M, Triton, 3% de soro normal e anticorpo primário de interesse (Tabela 1), permanecendo em temperatura ambiente, protegidos da luz e agitando durante 24 horas. Após este período os cortes encefálicos foram novamente lavados 3 vezes com KPBS 0.02M, por 10 minutos, e incubados em solução contendo o anticorpo secundário específico contra o anticorpo primário utilizado, sendo este, conjugado com uma fluoresceína de interesse (Tabela 1), também em temperatura ambiente protegidos da luz e agitando durante 90 minutos. Por fim, os cortes foram lavados 3 vezes em KPBS 0.02M por 10 minutos, montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com meio contendo 100 µl de dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) e lamínulas.

Tabela 1. Concentração dos anticorpos utilizados na técnica de imunoistoquímica fluorescente.

Anticorpo (espécie)	**Concentração**
β-endorfina (coelho)	1:3000
α-MSH (coelho)	1:2000
Kisspeptina (coelho)	1:2000
Alexa Flúor 488 (burro contra coelho)	1:500
Alexa Flúor 488 (burro contra rato)	1:500

3.5 Análise Quantitativa de Neurônios

Para análise dos resultados foram determinados critérios de acordo com o Atlas "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates". Os cortes quantificados tiveram como referência os seguintes bregmas:

- ✓ -1,46 ao -1,58 mm para análise do ARH nível rostral;
- ✓ -2,18 ao -2,30 mm para análise do ARH nível caudal.

Foi realizada a quantificação dos neurônios que expressam a enzima Cre recombinase sob o controle transcricional do gene que codifica o LepR, através de sua proteína fluorescente, bem como, a quantificação dos neurônios que expressem os peptídeos de interesse conforme tabela 1. Na sequência, o percentual de co-localização entre os neurônios LepR e os peptídeos de interesse foram determinados. Além disso, foi realizada a quantificação de neurônios que expressam o gene *Kiss1*, sendo as células reconhecidas por sua proteína fluorescente endógena hrGFP.

3.6 Análise Estatística

Para amostras com três variáveis independentes foi utilizado o teste One Way ANOVA com análise de Tukey para múltiplas comparações. Para amostras de análise percentual para três variáveis, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. Os resultados foram demonstrados como média ± erro padrão. A análise estatística foi realizada com o uso do software GraphPad Prism.

4 RESULTADOS

Na análise do lavado vaginal, observamos que fêmeas do grupo controle mantiveram regularidade do ciclo estral, alternando entre as fases de diestro ou metaestro (D/M) e estro ou proestro (E/P) (Figura 2A), com duração média de 5,4 dias para cada ciclo (Figura 2D-F). Fêmeas idosas não apresentaram ciclo estral regular, mantendo maior frequência na fase de D/M (Figura 2B) e menor número de ciclos completos (4,6 dias) durante o período de avaliação (Figura 2D-F), comparado ao grupo controle. Com relação as fêmeas submetidas à ovariectomia, apenas leucócitos foram identificados no lavado vaginal durante o período de avaliação (Figura 2C-F).

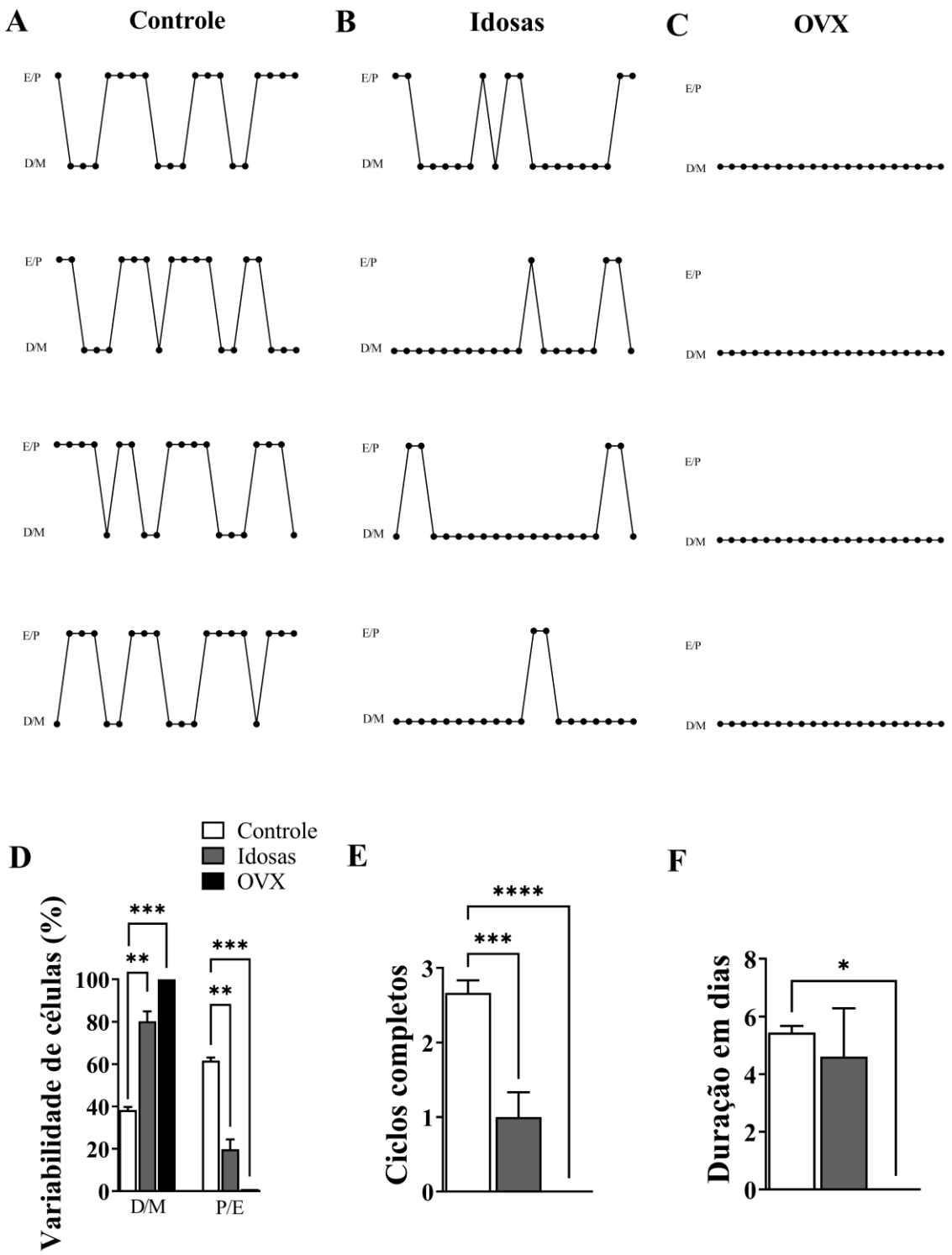

Figura 2. Avaliação do ciclo estral. (A) Representação gráfica da avaliação diária do ciclo estral de fêmeas adultas (início da avaliação com 12 semanas de vida, n=4), **(B)** Fêmeas idosas (início da avaliação com 75 semanas de vida, n=4) e **(C)** Fêmeas adultas que foram submetidas à ovariectomia (início da avaliação com 12 semanas de vida, n=4). D/M representam as fases de diestro/metaestro e E/P as fases de estro/proestro. **(D)** Gráficos de barras demonstrando o percentual de variabilidade das células diestro e metaestro (D/M) e estro e proestro (E/P). **(E)** Gráfico de barras comparando o número de ciclos completos durante o período de avaliação (27 dias). **(F)** Gráfico de barras representando a duração de um ciclo estral completo em dias. Média ± EP, *P< 0,05.

Todos os grupos foram acompanhados semanalmente para avaliação do peso corporal. Dessa forma, observamos na Figura 3A, que fêmeas controle tiveram menor peso corporal em relação às fêmeas idosas e OVX, e ainda, observamos que fêmeas idosas tiveram aumento significativo do peso corporal, comparado ao grupo de fêmeas OVX. Com relação ao peso uterino (Figura 3B), fêmeas idosas apresentaram maior peso uterino em relação a fêmeas controle e OVX. Além disso, fêmeas OVX também apresentaram menor peso uterino, comparado ao grupo controle. A figura 3C, está representando a quantificação de neurônios que expressam o LepR no ARH, evidenciados pela marcação da proteína fluorescente vermelha tdTomato, sendo que, não houveram variações significativas entre animais dos grupos controle, idosas e OVX.

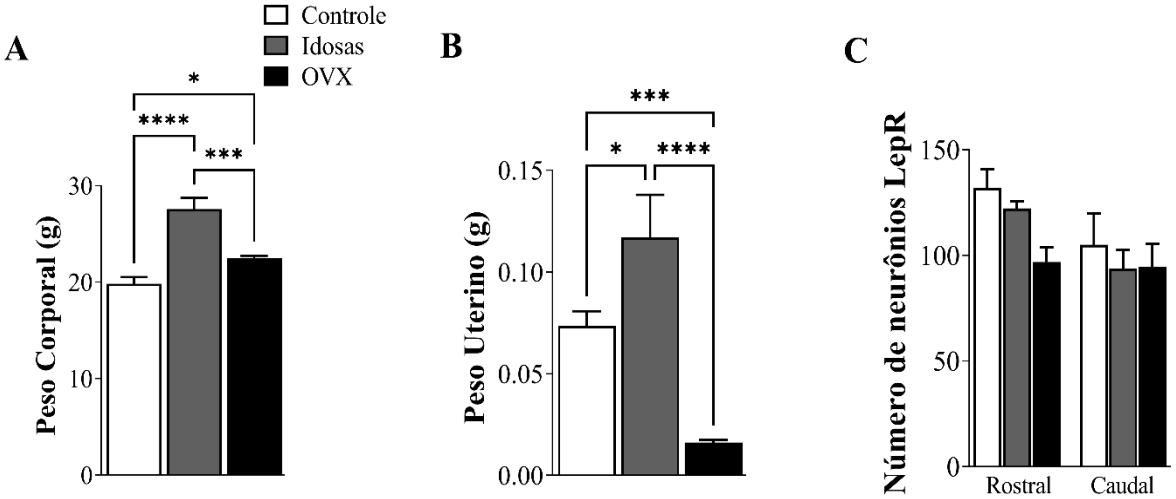

Figura 3. Caracterização dos modelos experimentais. (A-B) Gráfico de barras representando o peso corporal (A) e o peso uterino (B) de animais controle, idosas ou submetidos a ovariectomia (OVX). **(C)** Gráfico de barras demonstrando o número de neurônios que expressam o LepR no ARH de animais controle, idosas ou OVX. N= 10/18 por grupo. Média ± EP; *P< 0,05.

4.1 Quantificação de neurônios que expressam o hormônio estimulador de alfa-melanócitos e coexpressam o LepR no ARH

Na análise das imagens obtidas de cortes encefálicos submetidos a imunoistoquímica, com o uso de anticorpo que reconhece α–MSH, visualizamos poucos corpos de neurônios além de fibras imunorreativas no ARH de fêmeas dos grupos controle, idosas e OVX (Figura 4).

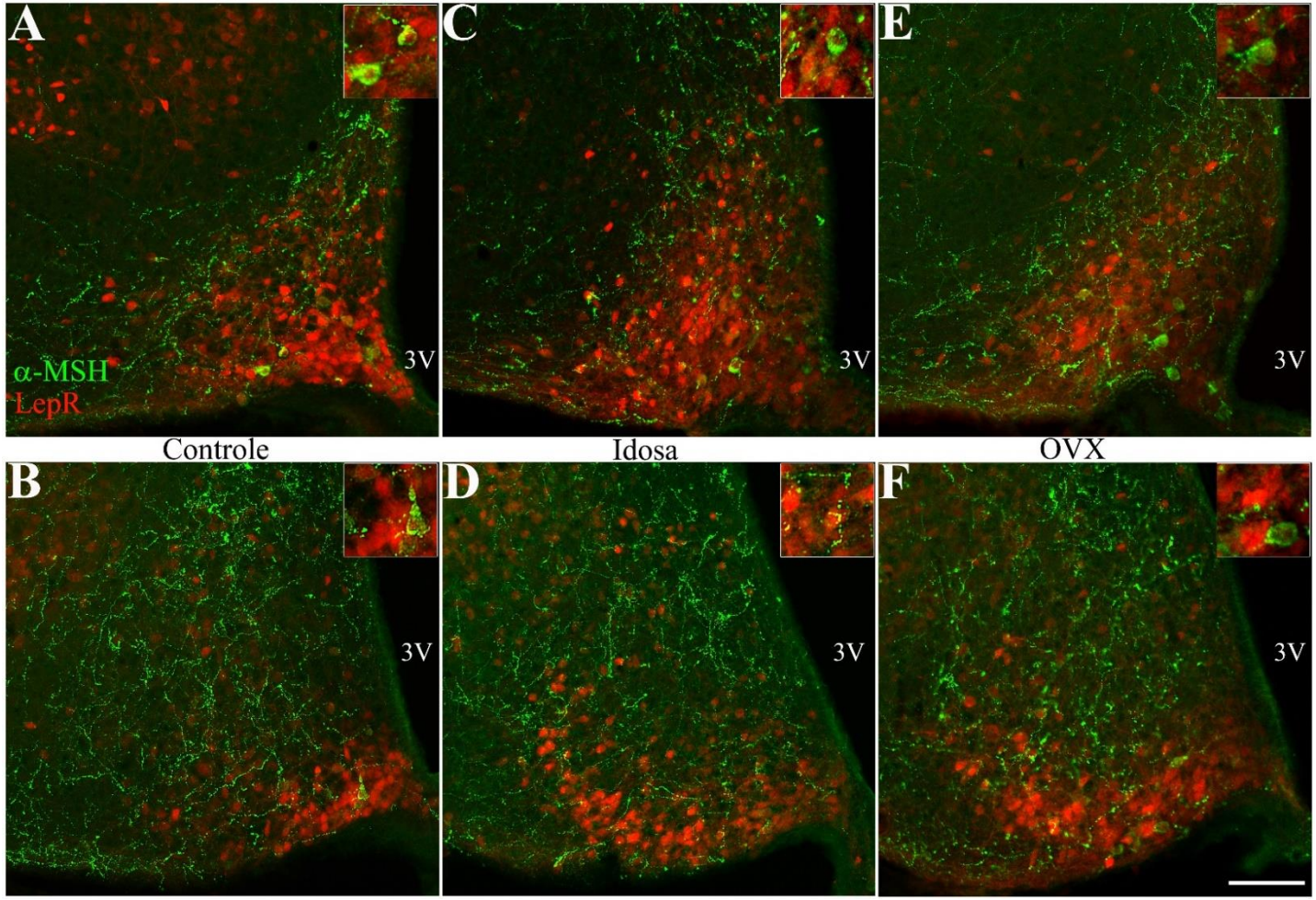

Figura 4. Avaliação de neurônios que expressam o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α–MSH) e coexpressam o receptor de leptina (LepR) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A-F) Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a imunorreatividade ao α–MSH (verde) e a proteína fluorescente vermelha tdTomato (vermelho) que identifica células que expressam o receptor de leptina (LepR). As fotomicrografias representam o nível rostral (A, C, E) e nível caudal do ARH (B, D, F) em animais controle (fêmeas adultas jovens, A-B), em idosas (C-D) ou animais submetidos à remoção dos ovários (OVX) (E-F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Barra de escala: 50 µm.

Na quantificação do número de neurônios imunorreativos ao anticorpo contra α–MSH, não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 5A). Porém, na análise da densidade óptica integrada, observamos que o grupo OVX apresentou aumento significativo no ARH caudal, em relação ao grupo idosa (Figura 5B).

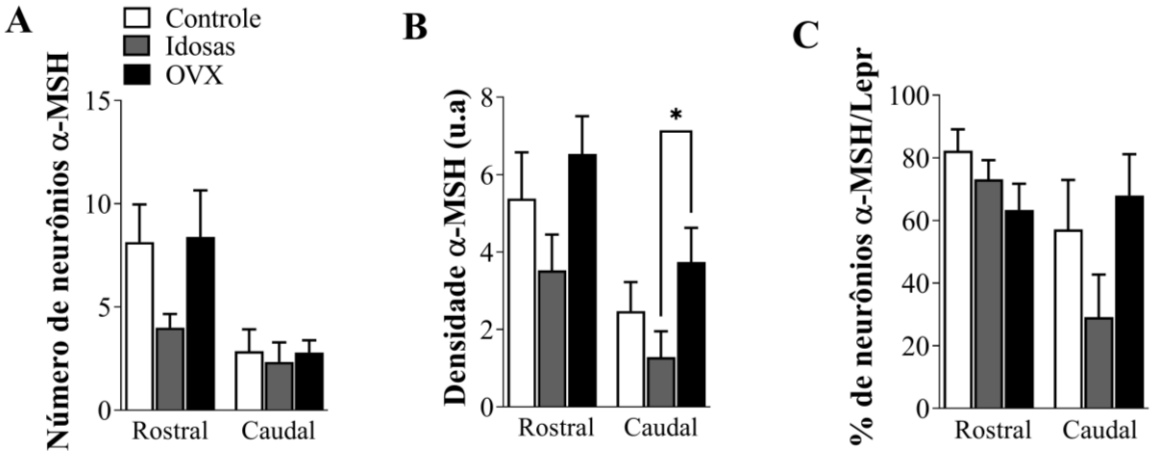

Figura 5. Quantificação de neurônios que expressam hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α–MSH) e coexpressam o receptor de leptina (LepR) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A) Gráfico de barras representando o número de neurônios que expressam α–MSH no ARH de fêmeas adultas (controle, n=7), idosas (n=7) e submetidas à ovariectomia (OVX, n=7). **(B)** Gráfico de barras representando densidade média obtida pela análise da imunofluorêscencia ao anticorpo que reconhece o α–MSH. **(C)** Gráfico de barras representando o percentual de neurônios que coexpressam α–MSH e o LepR no ARH. Dois níveis do ARH núcleo foram selecionados para as análises, rostral e caudal. Média ± EP, *P<0,05.

4.2 Quantificação de neurônios que expressam βendorfina e coexpressam o LepR no ARH

Nas imagens obtidas de cortes encefálicos submetidos a imunoistoquímica com o uso de anticorpo que reconhece βendorfina, observamos a presença de fibras e corpos de neurônios imunorreativos a βendorfina no ARH de fêmeas controle (n= 6), idosas (n= 6) e fêmeas OVX (n= 6) (figura 6). Na análise no número de neurônios imunorreativos a βendorfina, não encontramos diferenças significativas entre fêmeas controle, idosas e OVX (Figura 7A). Além disso, também não foram observadas diferenças significativas na densidade média obtida pela análise da imunofluorescência ao anticorpo que reconhece βendorfina, entre os grupos experimentais (Figura 7B).

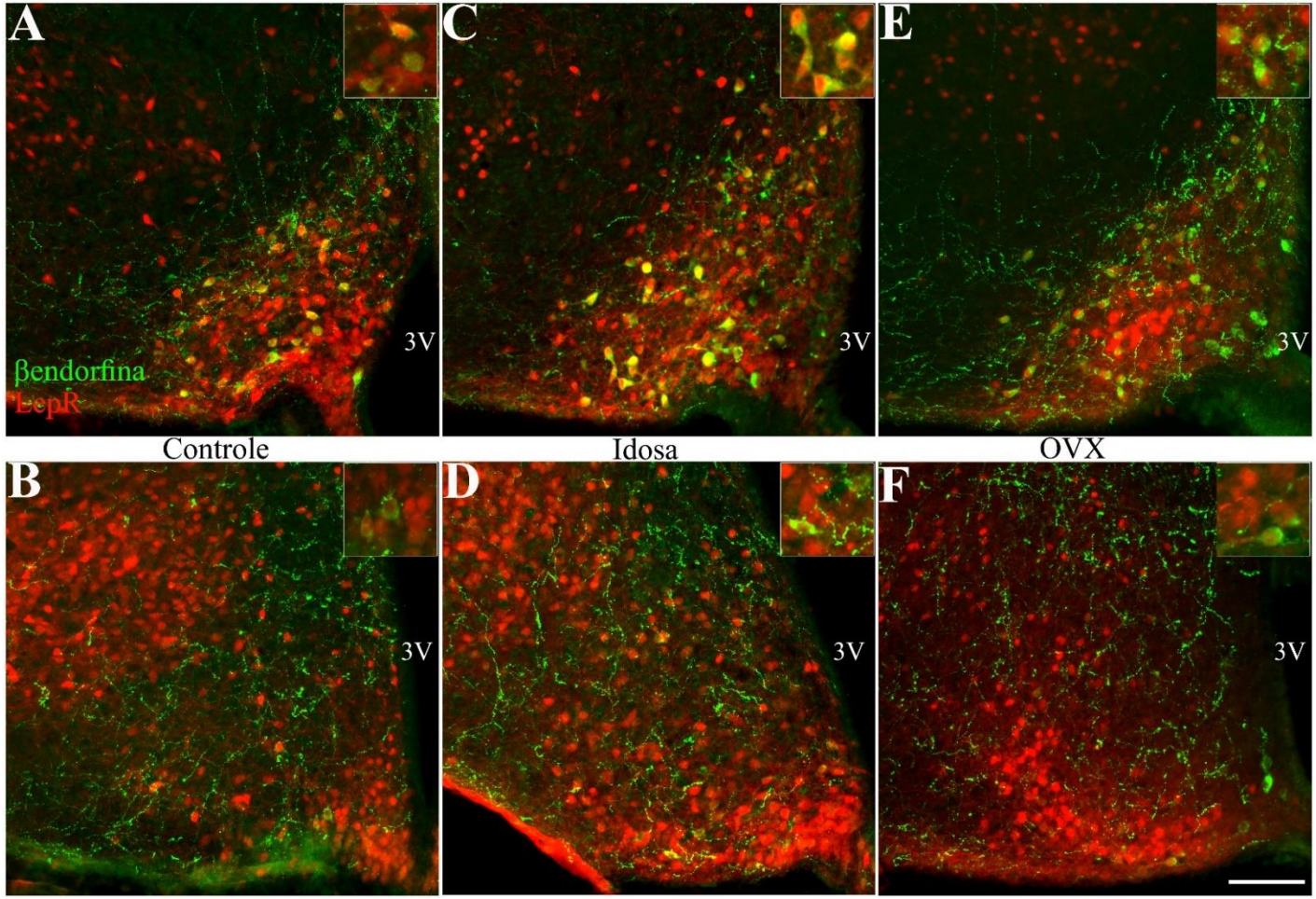

Figura 6. Avaliação de neurônios que expressam βendorfina e coexpressam o receptor de leptina (LepR) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A-F) Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a imunorreatividade a βendorfina (verde) e a proteína fluorescente vermelha tdTomato (vermelho) que identifica células que expressam o receptor de leptina (LepR). As fotomicrografias representam o nível rostral do ARH (A, C, E) e nível caudal do ARH (B, D, F) em animais controle (fêmeas adultas jovens, A-B), idosas (C-D) ou animais submetidos à remoção dos ovários (OVX) (E-F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Barra de escala: 50 µm.

Na análise da coexpressão entre células imunorreativas à βendorfina e o LepR, observamos que fêmeas controle e fêmeas idosas apresentaram maior percentual de neurônios que coexpressam o LepR no ARH rostral, em comparação aos animais do grupo OVX (Figura 7C). Não observamos diferenças significativas no ARH caudal.

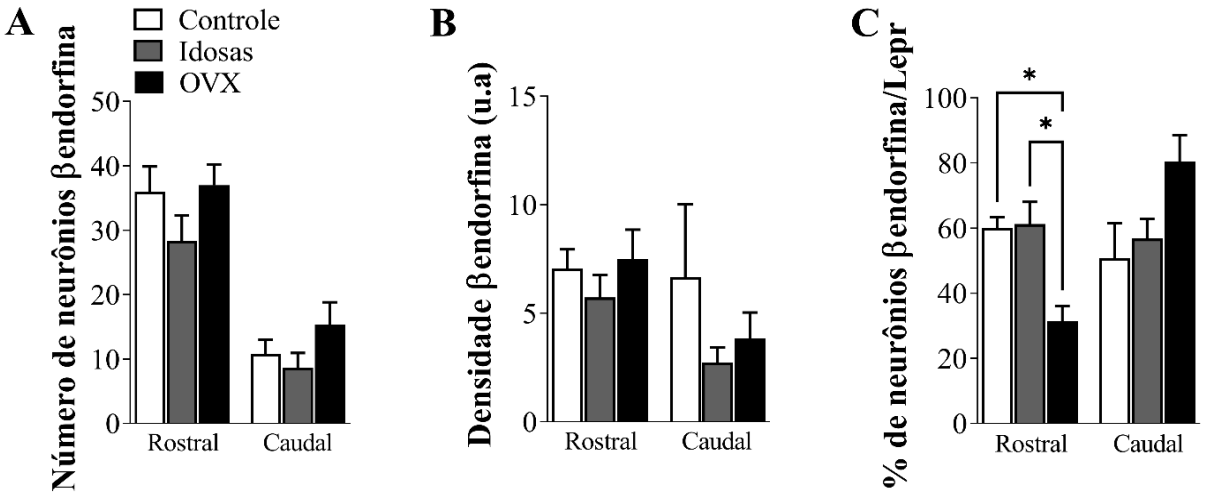

Figura 7. Quantificação de neurônios que expressam βendorfina e coexpressam o receptor de leptina (LepR) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A) Gráfico de barras representando o número de neurônios que expressam βendorfina no ARH de fêmeas adultas (controle, n=6), idosas (n=6) e submetidas à ovariectomia (OVX, n=6). **(B)** Gráfico de barras representando densidade média obtida pela análise da imunofluorêscencia ao anticorpo que reconhece a βendorfina. **(C)** Gráfico de barras representando o percentual de neurônios que coexpressam kisspeptinas e o LepR no ARH. Dois níveis do núcleo ARH foram selecionados para as análises, rostral e caudal. Média ± EP, *P<0,05.

4.3 Quantificação de neurônios que expressam kisspeptinas e coexpressam o LepR no ARH

Na análise das imagens obtidas de cortes encefálicos submetidos a imunoistoquímica com o uso de anticorpo que reconhece as kisspeptinas, observamos poucos corpos de neurônios e muitas fibras imunorreativas no ARH de fêmeas do grupo controle (n=6) e do grupo idosas (n=6) (Figura 8).

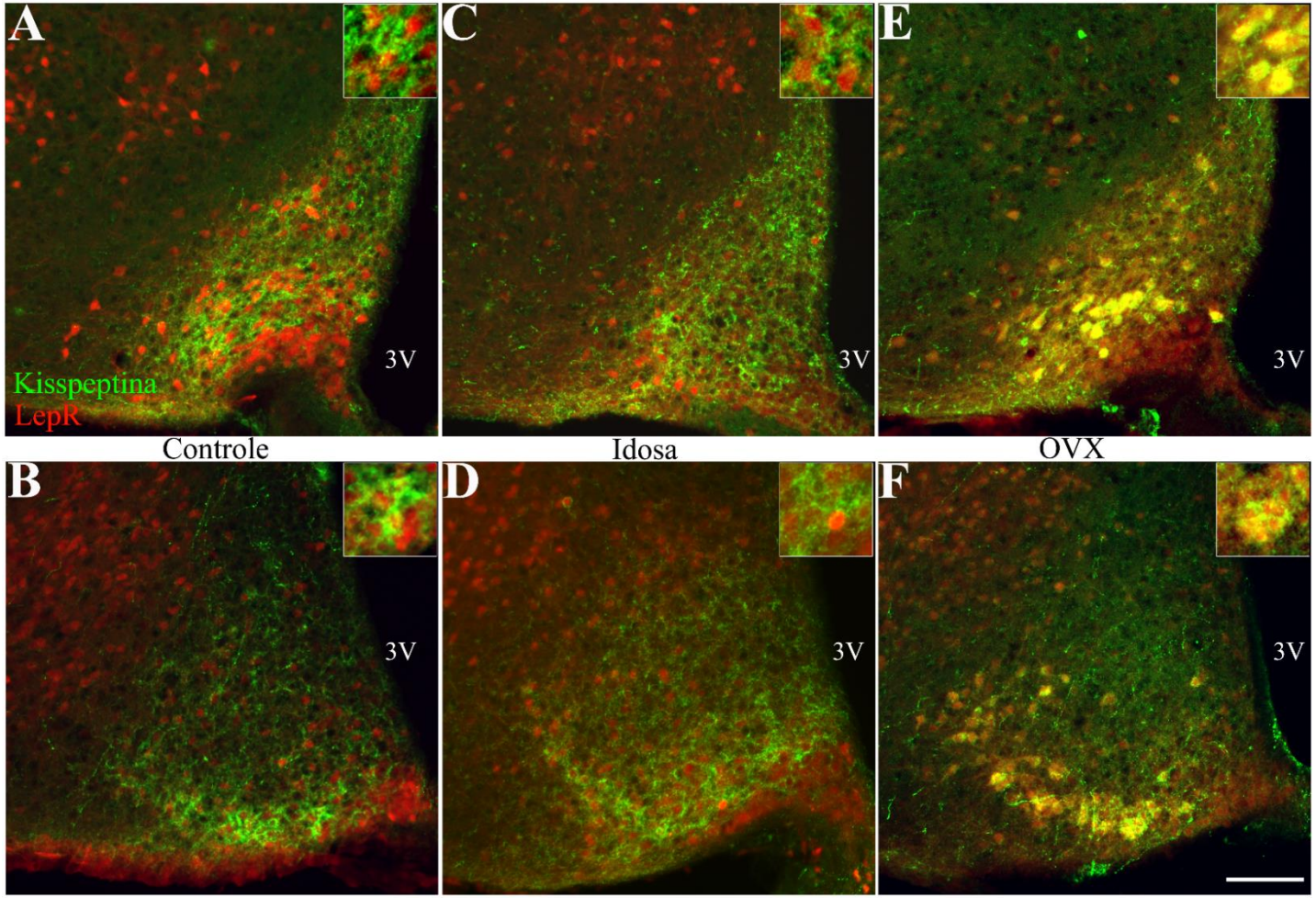

Figura 8. Avaliação de neurônios que expressam kisspeptinas e coexpressam o receptor de leptina (LepR) e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A-F) Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a imunorreatividade à kisspeptinas (verde) ou a proteína fluorescente vermelha tdTomato (vermelho) que identifica células que expressam o receptor de leptina (LepR). As fotomicrografias representam o nível rostral (A, C, E) e nível caudal do ARH (B, D, F) em animais controle (fêmeas adultas jovens, A-B), idosas (C-D) ou animais submetidos à remoção dos ovários (OVX) (E-F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Barra de escala: 50 µm.

Na quantificação do número de neurônios imunorreativos ao anticorpo que reconhece as kisspeptinas, fêmeas OVX tiveram aumento do número de neurônios imunorreativos ao anticorpo que reconhece as kisspeptinas tanto no ARH rostral e caudal, em relação aos grupos controle e idosas (Figura 9A). Na análise da densidade óptica integrada observamos que não houveram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 9B). Em relação ao percentual de neurônios que coexpressam kisspeptinas e o LepR não observamos diferenças quando comparamos o grupo controle ao grupo idosas, porém notamos que fêmeas OVX demonstraram aumento expressivo da coexpressão, em relação ao grupo controle e idosas, em ambas as áreas deste núcleo (Figura 9C).

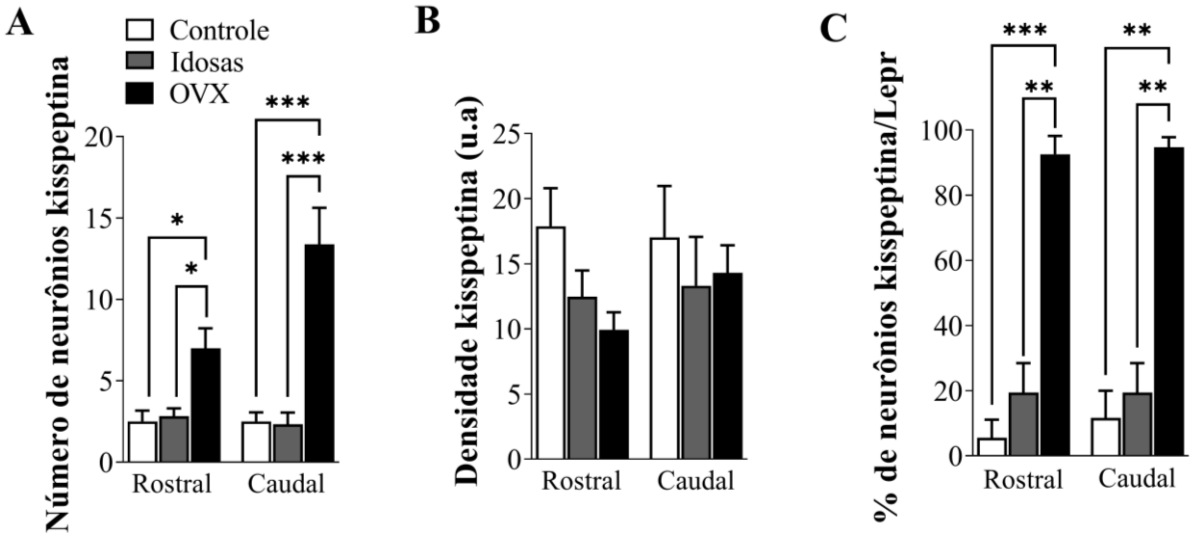

Figura 9. Quantificação de neurônios que expressam kisspeptinas e coexpressam o receptor de leptina (LepR) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A) Gráfico de barras representando o número de neurônios que expressam as kisspeptinas no ARH de fêmeas adultas (controle, n=6), fêmeas idosas (n=6) e fêmeas submetidas à ovariectomia (OVX, n=9). **(B)** Gráfico de barras representando densidade média obtida pela análise da imunofluorescência ao anticorpo que reconhece as kisspeptinas. **(C)** Gráfico de barras representando o percentual de neurônios que coexpressam kisspeptinas e o LepR no ARH. Dois níveis do núcleo ARH foram selecionados para as análises, rostral e caudal. Média ± EP, *P<0,05.

4.4 Quantificação de neurônios que expressam o gene Kiss1 no ARH

Sabendo que o anticorpo que reconhece as kisspeptinas não marca os corpos de neurônios, mas sim suas fibras nervosas no ARH de camundongos (CLARKSON; HERBISON 2006), realizamos a montagem de cortes encefálicos dos animais que expressam a proteína fluorescente hrGFP, sob o controle transcricional do gene *Kiss1* (CRAVO et al., 2013). Dessa forma, conseguimos observar a presença de corpos de neurônios marcados pela proteína hrGFP no ARH de fêmeas do grupo controle (n=3), fêmeas idosas (n=3) e OVX (n=4, Figura 10).

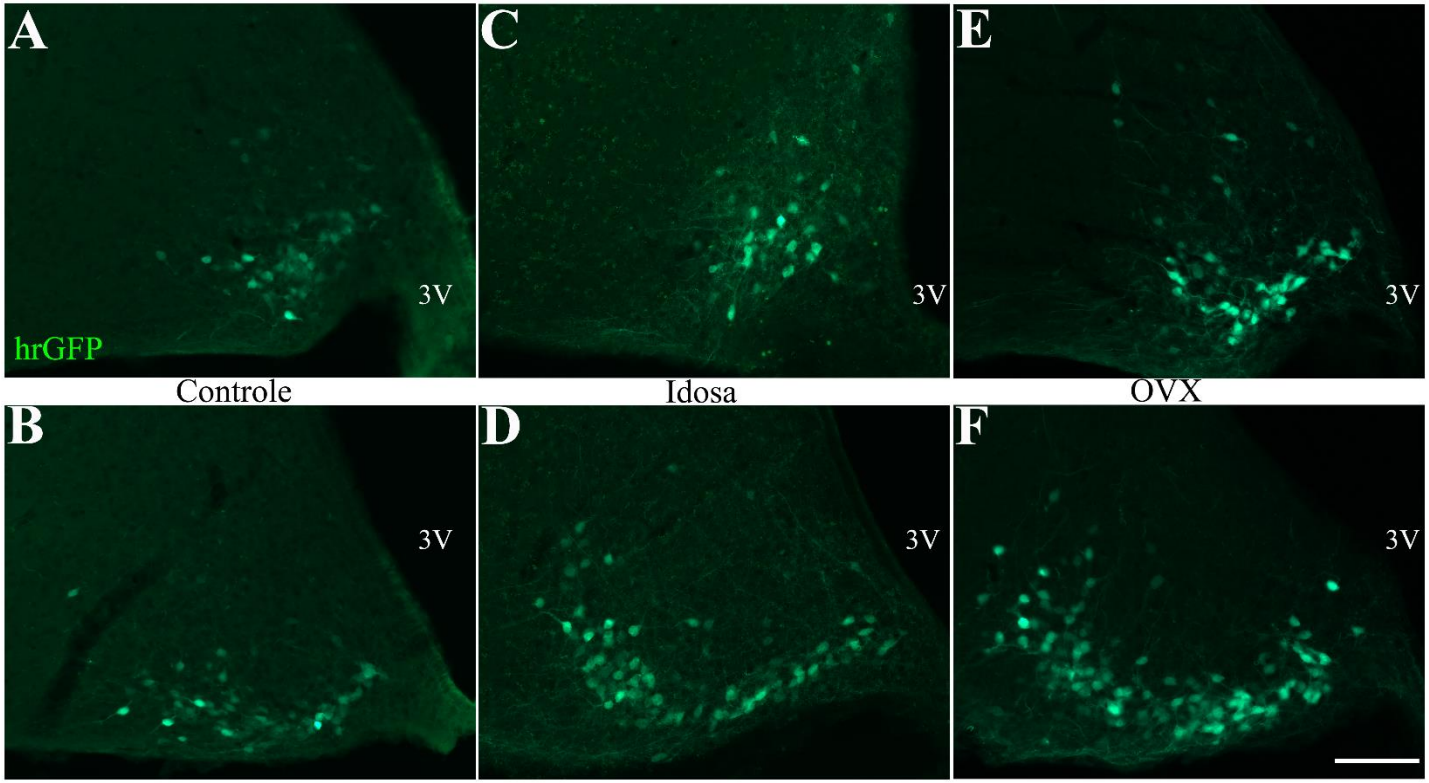

Figura 10. Avaliação do número de neurônios que expressam a proteína fluorescente verde renilla humana (hrGFP) sob o controle transcricional do gene *Kiss1* no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A-F) Fotomicrografias em fluorescência demonstrando a proteína fluorescente endógena hrGFP (verde) que identifica células que expressam o gene *Kiss1*. As fotomicrografias representam o nível rostral (A, C, E) e nível caudal do ARH (B, D, F) em animais controle (fêmeas adultas jovens, A-B), idosas (C-D) ou animais submetidos à remoção dos ovários (OVX) (E-F). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo. Barra de escala: 50 µm.

Na quantificação do número de neurônios que expressam o gene *Kiss1*, observamos que no ARH rostral a quantificação obtida de fêmeas idosas não demonstrou diferenças significativas em relação ao grupo controle. Entretanto, em fêmeas OVX observamos aumento significativo do número de neurônios que expressam o gene *Kiss1*, em comparação ao grupo idosas (Figura 11A). Na análise do ARH caudal, não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais. O N reduzido de animais pode ter contribuído para as diferenças estatísticas obtidas nesta análise.

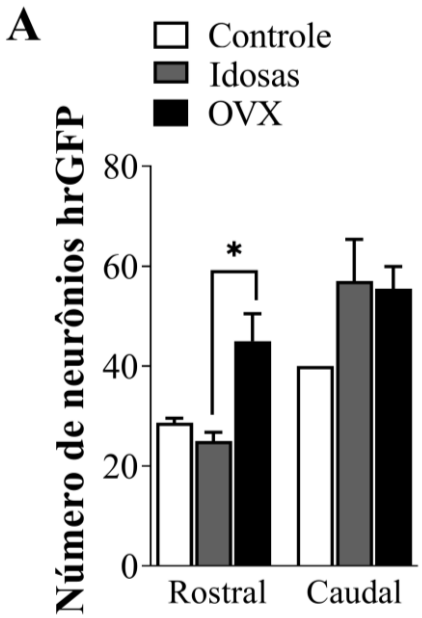

Figura 11. Quantificação de neurônios que expressam a proteína endógena verde fluorescente renilla humana (hrGFP) no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH). (A) Gráfico de barras representando o número de neurônios que expressam o gene *Kiss1* no ARH de fêmeas controle (n=3), fêmeas idosas (n=3) e fêmeas submetidas à ovariectomia (OVX, n=4). Média ± EP. *P<0,05.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que os modelos experimentais que representam a senescência e ovariectomia demonstraram diferenças importantes entre si. Fêmeas idosas apresentaram ciclo estral irregular e aumento significativo de peso uterino em comparação a fêmeas controle (adultas jovens). O número de neurônios α-MSH, β-endorfina e kisspeptinas e o percentual de coexpressão com o LepR no ARH de fêmeas idosas foi similar em comparação ao grupo controle. Por outro lado, fêmeas OVX não apresentaram ciclo estral e tiveram diminuição significativa do peso uterino, de acordo com a literatura (FRAZÃO et al., 2013). Fêmeas OVX apresentaram aumento do número de neurônios que expressam as kisspeptinas, além do gene *Kiss1*, em relação aos demais grupos experimentais. Além disso, fêmeas OVX apresentaram diminuição do percentual de neurônios que coexpressam β-endorfina e LepR no ARH rostral, e aumento expressivo do percentual de neurônios que coexpressam kisspeptinas e LepR nos níveis rostrais e caudais do ARH (CRAVO et al., 2013). Esses achados são interessantes pois evidenciam que senescência e ovariectomia representam modelos fisiológicos que culminam em alterações hipotalâmicas distintas entre si.

Os roedores possuem várias características e alterações endócrinas semelhantes às do ser humano, tais como declínio nos folículos ovarianos, ciclagem irregular e flutuações de hormônios esteroides (FINCH et al., 1984; MOBBS, GEE, FINCH, 1984; BELLINO, 2000; VAN KEMPEN, MILNER, WATERS, 2011). Há estudos relatando que em ratas o ciclo estral torna-se irregular entre 10 e 12 meses de idade, sendo que a incidência de ciclos anormais aumenta com a idade (LU et al., 1979). Muitos trabalhos utilizam a cirurgia de ovariectomia como um modelo para reproduzir a menopausa de humanos em roedores e investigar seus efeitos. Entretanto, há trabalhos que questionam esse modelo, apontando diferenças importantes entre a menopausa e a ovariectomia, como o fato de roedores possuírem ciclo estral e não ciclo menstrual; mulheres na menopausa ainda produzirem fatores esteroides; e pelas adaptações que ocorrem nas vias metabólicas durante a senescência reprodutiva natural, que não ocorrem em animais OVX (YAO et al., 2009, YAO et al., 2010; DIAZ BRINTON, 2012; KOEBELE, BIMONTE-NELSON, 2016).

De forma geral, nossos animais possuíam idade bastante avançada, e, ainda assim, eventualmente, apresentavam um ciclo estral completo. Dessa forma, não podemos determinar se há de fato falência ovariana no modelo estudado, ou se a falência aconteceria em idade ainda mais avançada. Ainda assim, nosso estudo não foi delineado para

determinarmos em qual faixa etária camundongos (C57BL/6) iniciam a irregularidade do ciclo estral, e nossos achados apontam diferenças entre fêmeas que sofreram senescência reprodutiva natural e fêmeas OVX. Alguns estudos que apontam que uma parcela dos roedores envelhecidos transita entre proestro e estro constantes, pois mantém os níveis de 17β-estradiol plasmático estáveis e queda dos níveis de progesterona (FINCH et al., 1984; DIAZ BRINTON, 2012). Sendo assim, o fator idade e, consequentemente, a variação dos hormônios sexuais, podem ter causado as alterações quanto à duração e ao número de ciclos estrais em fêmeas idosas, porém somente uma dosagem de estrógenos permitiria uma conclusão assertiva.

Com relação ao peso uterino, nossos dados estão de acordo com os encontrados na literatura, pois observamos que fêmeas OVX apresentaram menor peso uterino em relação aos demais grupos experimentais (FRAZAO et al., 2013). Sabe-se, ainda, que o desenvolvimento do endométrio uterino é regulado pelos níveis de estrógenos, especialmente o estradiol, pois fêmeas OVX que recebem reposição de estradiol apresentam aumento do tamanho do útero (BOSCH et al., 2009; FRAZAO et al., 2013). Entretanto, observamos aumento significativo do peso uterino em idosas, comparado com fêmeas controle e OVX. Na literatura há dados apontando que ratas com 18 e 24 meses de vida apresentam aumento do peso uterino devido ao aumento da espessura do miométrio e aumento do líquido luminal (LOEB, SUNTZEFF, BURNS., 1938; SUNTZEFF; BABCOCK; LOEB, 1940; WOLFE et al., 1942; HSUEH, ERICKSON, LU, 1979). Além disso, foi demonstrado que os níveis de progesterona produzidos em ratas idosas são menores do que os níveis de ratas jovens (MILLER; RIEGLE, 1980). Sabe-se, ainda, que a progesterona atua no tecido uterino de forma antagônica à proliferação celular causada pelos estrógenos (WHITE et al., 1982; DAI et al., 2002). Muito embora nosso estudo não tenha sido delineado para realização da dosagem hormonal, efeito semelhante ao observado em ratos anteriormente foram vistos aqui. Além disso, nossos achados indicam que fêmeas idosas possam ter tido diminuição nos níveis de progesterona, porém essa questão ainda deve ser esclarecida.

Estudos apontam que a ausência de hormônios sexuais circulantes causada pela remoção dos ovários induz alterações no padrão de expressão gênica no hipotálamo, sendo os efeitos podem ser observados a partir da quarta semana após a cirurgia (AINSLIE et al., 2001; JACKSON et al., 2011; DA SILVA et al., 2014). Dentre os genes alterados observou-se aumento dos genes que codificam o LepR, POMC, kisspeptinas, entre outros, sendo esse efeito hipotalâmico acompanhado por aumento do ganho de peso, bem como aumento da

leptina sérica circulante (BENNETT et al., 1998; DA SILVA et al., 2014; SMITH et al. 2005). No presente estudo não observamos efeito decorrente da cirurgia no número de neurônios que expressam apenas o LepR no ARH. Além disso, não observamos diferenças quanto ao número de neurônios que expressam os neuropeptídios α-MSH e β-endorfina (derivados de POMC) em fêmeas OVX, comparado com o grupo controle. Entretanto, deve-se questionar sobre o tempo necessário para detectar mudanças significativas na expressão de neurônios por meio da imunoistoquímica, já que realizamos o sacrifício 30 dias após a cirurgia. Além disso, a molécula POMC possui outros derivados além de α-MSH e β-endorfina, tais como β-lipotropina e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Sendo assim, os efeitos encontrados podem estar refletindo mudança em outros derivados que não investigamos. Contudo, é importante ressaltar que os estudos previamente citados utilizaram técnica que avalia a expressão gênica, ou seja, a quantificação de RNAm que codifica um determinado gene. Em nosso estudo utilizamos a técnica de imunoistoquímica fluorescente, que possibilita a detecção e localização da proteína de interesse *in situ*. Não há trabalhos na literatura avaliando a expressão de LepR, α-MSH e β-endorfina em animais com idade tão avançada como apresentado aqui.

A diminuição de esteroides sexuais causada pela remoção dos ovários induziu alterações que não necessariamente foram vistas na quantificação dos neurônios em fêmeas idosas. Por exemplo, fêmeas OVX apresentaram diminuição do percentual de neurônios que coexpressavam β-endorfina e LepR na porção rostral do ARH.De acordo com a literatura, fêmeas OVX também apresentaram aumento do número de neurônios que expressam as kisspeptinas e o gene *Kiss1*, bem como aumento do percentual de colocalização com o LepR em comparação ao grupo controle (SMITH et al., 2005; SMITH et al., 2006; CRAVO et al., 2013; FRAZAO et al., 2013). Nossos resultados estão de acordo com a literatura e reforçam que os estrógenos desempenham retroalimentação negativa no que se refere à expressão do gene *Kiss1* no ARH.

Navarro et al. (2004), avaliou a expressão de *Kiss1* e do gene que codifica o receptor de kisspeptinas (Kiss1r) no hipotálamo de ratas com diversas idades. Observou-se que ratas envelhecidas (18 meses), apresentam expressão hipotalâmica de *Kiss1* e Kiss1r semelhante a ratas adultas jovens e em fase neonatal, porém menor que fêmeas no período da puberdade. Em nosso estudo as fêmeas idosas não demonstraram mudanças significativas quanto à expressão de kisspeptinas, muito embora não tenhamos avaliado o AVPV, não notamos diferença na imunoistoquímica que reflete expressão proteica. Em relação à expressão

gênica, com a análise do tecido obtido dos animais Kiss1hrGFP, devemos notar que o N amostral foi insuficiente, e embora não haja alteração no nível rostral, o nível caudal parece acompanhar o achado como em animais OVX.

Observamos ainda, resultados diferentes para o ARH caudal e ARH rostral, em algumas análises dos neuropeptídios. De acordo com a literatura, existe uma certa heterogeneidade na distribuição de neurônios presentes nesse núcleo (SAPER et al., 2014; ELIAS et al 1998). Por exemplo, os neurotransmissores glutamato e GABA que coexpressam os neurônios POMC e AGRP, são encontrados em regiões diferentes, sendo o glutamato expresso em porções mais rostrais e o GABA, em mais porções caudais do ARH (VAN DEN POL et al., 2019). Essas diferenças regionais nas populações neuronais distribuídas no ARH, se referem ainda aos locais de projeção destas células (BETLEY et al., 2013), com ARH rostral projetando-se para áreas do prosencéfalo e ARH caudal projetando-se para locais rombencéfalos (ELIAS et al 1998). Além disso, essas projeções neuronais do ARH parecem não apenas transmitir informações sobre uma mudança no estado endócrino, mas também parece alterar a função comportamental nessas regiões de maneira adaptativa (CHRONWALL, 1985).

6 CONCLUSÃO

Concluímos que a ovariectomia induziu modificações significativas tanto em aspectos fisiológicos (ciclo estral, peso corporal e tamanho uterino), quanto em aspectos morfológicos (avaliação de neuropeptídios envolvidos na reprodução e no metabolismo energético), nos animais experimentais. Porém, essas mesmas modificações, não foram encontradas em animais que sofreram senescência reprodutiva de forma natural. Isso significa que há diferenças importantes entre esses dois modelos, nos fazendo questionar se a ovariectomia é um modelo experimental viável para representar a menopausa das mulheres nas pesquisas básicas.

REFERÊNCIAS

AINSLIE, D. et al. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 11, p. 1680–1688, nov. 2001.

ALDRIGHI, J.; ALDRIGHI, C. M.; ALDRIGHI, A. P. Alterações sistêmicas no climatério. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 15–21, dez. 2002.

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, fev. 2006.

AUGOULEA, A. et al. Role of postmenopausal hormone replacement therapy on body fat gain and leptin levels. **Gynecological Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 227–235, abr. 2005.

BARASH, I. A. et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3144–3147, 1 jul. 1996.

BELLINO, F. L. Nonprimate Animal Models of Menopause: Workshop Report. **Menopause**, v. 7, n. 1, p. 14–24, 2000.

BENNETT, P. A. et al. Differential Expression and Regulation of Leptin Receptor Isoforms in the Rat Brain: Effects of Fasting and Oestrogen. **Neuroendocrinology**, v. 67, n. 1, p. 29–36, 1998.

BETLEY, J. NICHOLAS et al. Parallel, Redundant Circuit Organization for Homeostatic Control of Feeding Behavior. **Cell**, v. 155, n. 6, p. 1337–1350, dez. 2013.

BIMONTE-NELSON, H. A.; BERNAUD, V. E.; KOEBELE, S. V. Menopause, hormone therapy and cognition: maximizing translation from preclinical research. **Climacteric**, p. 1–9, 12 maio 2021.

BOSCH, M. A. et al. 17β-estradiol regulation of the mRNA expression of t-type calcium channel subunits: Role of estrogen receptor α and estrogen receptor β. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 512, n. 3, p. 347–358, 20 jan. 2009.

BOURET, S. G. Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2797–2805, 17 mar. 2004.

BYERS, S. L. et al. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35538, 13 abr. 2012.

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

CHRONWALL, B. M. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. **Peptides**, v. 6, p. 1–11, jan. 1985.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in

Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5817–5825, dez. 2006.

COWLEY, M. A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 480–484, maio 2001.

CRAVO, R. M. et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. **Neuroscience**, v. 173, p. 37–56, jan. 2011.

CRAVO, R. M. et al. Leptin Signaling in Kiss1 Neurons Arises after Pubertal Development. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58698, 7 mar. 2013.

DA SILVA, R. P. et al. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4226–4236, 1 nov. 2014a.

DA SILVA, R. P. et al. Leptin Resistance Is Not the Primary Cause of Weight Gain Associated With Reduced Sex Hormone Levels in Female Mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4226–4236, 1 nov. 2014b.

DAI, D. et al. Progesterone Inhibits Human Endometrial Cancer Cell Growth and Invasiveness: Down-Regulation of Cellular Adhesion Molecules through Progesterone B Receptors. **Cancer Research**, v. 62, n. 3, p. 881–886, fev. 2002.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 2, p. 138–145, 2011.

DARKO, D. F. et al. Association of beta-endorphin with specific clinical symptoms of depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 149, n. 9, p. 1162–1167, set. 1992.

DE LORENZI, D. R. S. et al. Fatores indicadores da sintomatologia climatérica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 1, p. 7–11, jan. 2005.

DIAZ BRINTON, R. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571–3578, ago. 2012.

DONATO, J. et al. Hypothalamic Sites of Leptin Action Linking Metabolism and Reproduction. **Neuroendocrinology**, v. 93, n. 1, p. 9–18, 2011a.

DONATO, J. et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p. 355–368, 4 jan. 2011b.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244–248, maio 2016.

ELIAS, C. F. et al. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 402, n. 4, p. 442–459, 28 dez. 1998.

FINCH, C. E. et al. Ovarian and Steroidal Influences on Neuroendocrine Aging Processes

in Female Rodents*. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 4, p. 467–497, out. 1984.

FRAZAO, R. et al. Shift in Kiss1 Cell Activity Requires Estrogen Receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 2807–2820, 13 fev. 2013.

FU, L.-Y. .; VAN DEN POL, A. N. Kisspeptin Directly Excites Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons but Inhibits Orexigenic Neuropeptide Y Cells by an Indirect Synaptic Mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 30, p. 10205–10219, 28 jul. 2010.

GAMBACCIANI, M. et al. Climacteric modifications in body weight and fat tissue distribution. **Climacteric**, v. 2, n. 1, p. 37–44, jan. 1999.

GOSDEN, R. G. et al. Imminent Oocyte Exhaustion and Reduced Follicular Recruitment Mark the Transition to Acyclicity in Aging C57BL/6J Mice. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 255–260, 1 mar. 1983.

HAARBO, J. et al. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. **Metabolism**, v. 40, n. 12, p. 1323–1326, 1 dez. 1991.

HAISENLEDER, D. J. et al. Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation of Gonadotropin Subunit Transcription in Rat Pituitaries: Evidence for the Involvement of Jun N-Terminal Kinase But Not p38. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 139–145, 11 out. 2007.

HAN, S.-K. et al. Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11349–11356, 7 dez. 2005.

HELENA, C. V. et al. KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 4200–4213, 24 ago. 2015.

HENRIQUES, H. N. et al. Efeito de doses elevadas de tibolona sobre o peso corporal e perfil lipídico de ratas ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 2, fev. 2010.

HILL, J. W. et al. Direct Insulin and Leptin Action on Pro-opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 286–297, abr. 2010.

HSUEH, A. J. W.; ERICKSON, G. F.; LU, K. H. Changes in Uterine Estrogen Receptor and Morphology in Aging Female Rats1. **Biology of Reproduction**, v. 21, n. 4, p. 793–800, 1 nov. 1979.

JACKSON, M. A. et al. Effects of increased hypothalamic leptin gene expression on ovariectomy-induced bone loss in rats. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1575–1580, ago. 2011.

KIM, W. et al. Postmenopausal increase in KiSS-1, GPR54, and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH-1) mRNA in the basal hypothalamus of female rhesus monkeys. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 103–110, jan. 2009.

KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5–17, maio 2016.

LEHMAN, M. N. et al. The 3rd World Conference on Kisspeptin, “Kisspeptin 2017: Brain and Beyond”: Unresolved questions, challenges and future directions for the field. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n. 5, p. e12600, maio 2018.

LIPTON, J. M.; CATANIA, A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator α-MSH. **Immunology Today**, v. 18, n. 3, p. 140–145, mar. 1997.

LOEB, L.; SUNTZEFF, V.; BURNS, E. L. The effects of age and estrogen on the stroma of vagina, cervix and uterus in the mouse. **Science**, v. 88, n. 2288, p. 432–433, 4 nov. 1938.

LU, K. H. et al. Chronological Changes in Sex Steroid, Gonadotropin and Prolactin Secretion in Aging Female Rats Displaying Different Reproductive States1. **Biology of Reproduction**, v. 21, n. 1, p. 193–203, 1 ago. 1979.

MARGETIC, S. et al. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **International Journal of Obesity**, v. 26, n. 11, p. 1407–1433, nov. 2002.

MCLEAN, A. C. et al. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Journal of Visualized Experiments**, n. 67, 15 set. 2012.

MESSAGER, S. et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1761–6, 2005.

MILLER, A. E.; RIEGLE, G. D. Temporal Changes in Serum Progesterone in Aging Female Rats*. **Endocrinology**, v. 106, n. 5, p. 1579–1583, maio 1980.

MITTELMAN-SMITH, M. A. et al. Ablation of KNDy Neurons Results in Hypogonadotropic Hypogonadism and Amplifies the Steroid-Induced LH Surge in Female Rats. **Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 2015–2027, 3 mar. 2016.

MOBBS, C. V.; GEE, D. M.; FINCH, C. E. Reproductive Senescence in Female C57BL/6J Mice: Ovarian Impairments and Neuroendocrine Impairments that Are Partially Reversible and Delayable by Ovariectomy*. **Endocrinology**, v. 115, n. 5, p. 1653–1662, nov. 1984.

MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F. F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1190–1193, 1 mar. 1997.

NAVARRO, V. M. et al. Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and Its Putative Receptor, GPR54, in Rat Hypothalamus and Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4565–4574, 1 out. 2004.

PEDRO, A. O. et al. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 07-25, fev. 2003.

POEHLMAN, E. T.; TOTH, M. J.; GARDNER, A. W. Changes in Energy Balance and Body Composition at Menopause: A Controlled Longitudinal Study. **Annals of Internal Medicine**, v. 123, n. 9, p. 673, 1 nov. 1995.

ROCHA, R. et al. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 147–157, 8 jul. 2011.

RUBINOW, D.; SCHMIDT, P. Gonadal steroid regulation of mood: The lessons of premenstrual syndrome. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, n. 2, p. 210–216, jul. 2006.

SAPER, C. B.; LOWELL, B. B. The hypothalamus. **Current Biology**, v. 24, n. 23, p. R1111–R1116, dez. 2014.

SMITH, J. T. et al. Differential Regulation of KiSS-1 mRNA Expression by Sex Steroids in the Brain of the Male Mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 2976–2984, jul. 2005a.

SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3686–3692, 1 set. 2005b.

SMITH, J. T. et al. KiSS-1 Neurones Are Direct Targets for Leptin in the ob/ob Mouse. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 298–303, abr. 2006.

SOUZA, V. R. et al. Description of Ovariectomy Protocol in Mice. **Methods in Molecular Biology**, p. 303–309, 11 dez. 2018.

STENGEL, A. et al. Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. **NeuroReport**, v. 22, n. 5, p. 253–257, 30 mar. 2011.

SUNTZEFF, V.; BABCOCK, R. S.; LOEB, L. Reversibility of Hyalinization in the Mouse Uterus Produced by Injections of Estrogen, and the Changes in the Mammary Gland and Ovaries after Cessation of Injections. **The American Journal of Cancer**, v. 38, n. 2, p. 217–223, fev. 1940.

SWART, I. et al. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 5, p. R1020–R1026, 1 nov. 2002.

TOLSON, K. P. et al. Conditional knockout of kisspeptin signaling in brown adipose tissue increases metabolic rate and body temperature and lowers body weight. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 1, p. 107–121, 19 nov. 2019a.

TOLSON, K. P. et al. Cre/lox generation of a novel whole-body Kiss1r KO mouse line recapitulates a hypogonadal, obese, and metabolically-impaired phenotype. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 498, p. 110559, dez. 2019b.

VAN DEN POL, A. N. et al. Defining the caudal hypothalamic arcuate nucleus with a focus on anorexic excitatory neurons. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 6, p. 1605–1625, 6 fev. 2019.

VAN KEMPEN, T. A.; MILNER, T. A.; WATERS, E. M. Accelerated Ovarian Failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. **Brain Research**, v. 1379, p. 176–

187, mar. 2011.

VIGETA, S. M. G.; BRÊTAS, A. C. P. A experiência da perimenopausa e pós-menopausa com mulheres que fazem uso ou não da terapia de reposição hormonal. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 1682–1689, dez. 2004.

WHITE, J. O. et al. Progesterone therapy results in partial reversibility of uterine abnormalities of the adult anovulatory rat. **Biochemical Journal**, v. 202, n. 2, p. 535–541, 15 fev. 1982.

WILLIAMS, K. W. et al. Segregation of Acute Leptin and Insulin Effects in Distinct Populations of Arcuate Proopiomelanocortin Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2472–2479, 17 fev. 2010.

WOLFE, J. M. et al. The effects of advancing age on the connective tissue of the uterus, cervix and vagina of the rat. **American Journal of Anatomy**, v. 70, n. 1, p. 135–165, jan. 1942.

YAO, J. et al. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14670–14675, 10 ago. 2009.

YAO, J. et al. Decline in mitochondrial bioenergetics and shift to ketogenic profile in brain during reproductive senescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1800, n. 10, p. 1121–1126, out. 2010.

ZAMPIERI, T. T. et al. Postnatal Overnutrition Induces Changes in Synaptic Transmission to Leptin Receptor-Expressing Neurons in the Arcuate Nucleus of Female Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2425, 13 ago. 2020.