

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

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, muitos 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 imunistoquímica para detecção de peptídeos relacionados à modulação do balanço energético e reprodução (α -MSH, β endorfina 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, β endorfina 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 β endorfina 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.

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 β -endorfina 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 β -endorfina 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; MESSENGER 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 β endorfina, 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.

CONCLUSÃO

Concluimos 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 Rats. **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.