

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FISIOLÓGICAS

LARISSA BRAZOLOTTO FERREIRA

ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO NÚCLEO ANTEROVENTAL

PERIVENTRICULAR E SUA PARTICIPAÇÃO NO ENVELHECIMENTO

REPRODUTIVO DE RATAS

ARAÇATUBA

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FISIOLÓGICAS

**ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS DO NÚCLEO ANTEROVENTRAL
PERIVENTRICULAR E SUA PARTICIPAÇÃO NO ENVELHECIMENTO
REPRODUTIVO DE RATAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Larissa Brazolotto Ferreira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA

2015

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Ferreira, Larissa Brazolotto.

F383a Atividade dos neurônios do núcleo anteroventral periventricular e sua participação no envelhecimento reprodutivo de ratas / Larissa Brazolotto Ferreira. - Araçatuba, 2015
67 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Envelhecimento 2. Norepinefrina 3. Gonadotropinas
4. Estrogênios I. T.

CDD 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Brazolotto Ferreira

Atividade Dos Neurônios Do Núcleo Anteroventral Periventricular E Sua Participação No Envelhecimento Reprodutivo De Ratas

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Larissa Brazolotto Ferreira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Aprovado em: 30/07/2015

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: FOA/UNESP

Dr^a. Cristiane Mota Leite

Instituição: FORP/USP

Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima Christian

Instituição: CCB/UFSC

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 03.10.1988, Araçatuba - SP

Filiação: Carlos José Ferreira

Marli Brazolotto Ferreira

2007/2010: Curso de Graduação em Enfermagem - Universidade Paulista – UNIP – Araçatuba – SP.

2012/2013: Curso de Pós-Graduação *Latu-Sensu* em Estratégia de Saúde da Família – Universidade Federal de São Paulo – Unifesp – São Paulo – SP.

2012/2014: Curso de Pós-Graduação *Latu-Sensu* em Formação de Professores para o Ensino Superior - Universidade Paulista – UNIP.

2013/2015: Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – FOA – Araçatuba – SP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Marli, a minha irmã Jéssica, e a meu noivo, futuro marido

Alex, pelo amor, compreensão, apoio.

AGRADECIMENTOS

À UNESP (Universidade Estadual Paulista) e a SBFis (Sociedade Brasileira de Fisiologia) junto ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À Diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Titular Wilson R. Poi pelo apoio.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio financeiro quando foi necessário.

A todos os funcionários da UNESP, que gentilmente prestaram seus serviços com dedicação.

A Professora Doutora Rita Cassia Menegati Dornelles, por ser paciente, compreensiva e responsável pela realização deste trabalho, o qual me deu a oportunidade da realização deste sonho de ser mestre. Sinto muito por não saber demonstrar carinho, mas deixo aqui meus sinceros sentimentos de que esses foram os melhores anos da minha vida, e que parte desses momentos você esteve presente. Obrigada por tudo.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas, em especial a Professora Dr^a. Sandra Helena Penha Oliveira, coordenadora local do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas; e ao Professor Titular Dr. João César Bedran de Castro, pelos pareceres, conselhos e boas conversas na hora do café.

As professoras. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima Christian da CCB/UFSC e Dr^a. Cristiane Mota Leite da FORP/USP pela presença e participação na banca examinadora e pelas imprescindíveis considerações científicas para o melhor aperfeiçoamento deste trabalho.

À Professora Dr^a. Janete A. Anselmo-Franci da FORP/USP por coorientar esse trabalho. Estendo meus agradecimentos ao Professor Dr. Celso R. Franci da FMRP/USP e Professor Dr. Guilherme de Paula Nogueira por cederem seus laboratórios para realização de experimentos deste trabalho.

Aos meus amigos, simplesmente Obrigada.

Aos meus colegas de laboratório e departamento, por sempre estarem presentes e me dando apoio, à Angela obrigada pelos conhecimentos passados.

As ratas que me acompanharam nesse trabalho, muito obrigada, farei valer a pena a vida de cada uma.

Aos meus pais e minha irmã, que desde sempre acreditaram que eu conseguiria essa vitória e sempre torceram por mim.

Ao meu noivo, que sua infinita paciência foi essencial pra mim, seu apoio financeiro que jamais vou conseguir retribuir, pois volto a dizer, esse era o sonho da minha vida profissional, ser mestre.

Aos meus familiares, que de uma forma ou de outra sempre estiveram prontos para me ajudar e me aconselhar.

A Deus, meu melhor amigo.

*“Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência do que qualquer
outro talento.”*

Isaac Newton

FERREIRA, LB. Atividade dos neurônios do núcleo anteroventral periventricular e sua participação no envelhecimento reprodutivo de ratas. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

Alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em fêmeas determinam a transição de ciclos reprodutivos regulares para irregulares, com perda da fertilidade. Interação dos neurônios GnRH e esteróides gonadais está interligado pelas alças de retroalimentação e alterações nesse mecanismo estão relacionados com a senescência reprodutiva. Estímulos da noradrenalina (NA) e neurônios da área pré-óptica (APO) são essenciais para liberação das gonadotrofinas, pois neurônios GnRH expressam receptores para estrógeno β e progesterona. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das células neuronais da APO no período de transição para a menopausa em ratas Wistar. Ratas Wistar cíclicas (4-5 meses) no dia do estro e acíclicas (17-18 meses) em constante estro (CE) foram perfundidas ou decapitadas às 10, 14 e 18 horas. Encéfalos perfundidos foram processados por imunohistoquímica para avaliação da imunorreatividade para antígenos relacionados ao Fos da APO. Após a decapitação, o encéfalo foi retirado e realizado microdissecção da APO e determinação do conteúdo de NA e seu metabolito; o plasma foi utilizado para dosagens de LH, FSH, E₂ e P₄. Os resultados obtidos evidenciaram secreção plasmática maior de LH e menor de FSH e E₂ no grupo de ratas acíclicas. O número de neurônios FRA-IR foi maior em ratas acíclicas, nos horários das 10 ($p < 0,001$) e das 18 ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais com ciclo regular. Nas ratas acíclicas, o conteúdo armazenado de NA foi menor às 14h e 18h ($p < 0,001$) e o metabolito foi constante e maior às 18h, comparada com o mesmo horário das ratas do grupo cíclica ($p < 0,05$). Conclui-se que alterações neurais e ovarianas que ocorrem no CE determinam o declínio para a ocorrência da ciclicidade dos ciclos e caracterizam o período de periopausa.

PALAVRAS-CHAVE: envelhecimento, norepinefrina, gonadotropinas, estrogênios

FERREIRA, LB. Activity of Anteroventral Periventricular Nucleus Neurons in Reproductive Aging of Female Rats. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Changes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in females determine the transition from regular to irregular reproductive cycles, with a loss of fertility. Interaction of GnRH neurons and gonadal steroid is connected by feedback and changes in this mechanism are related to reproductive senescence. Noradrenaline (NE) stimulation and preoptic area (POA) neurons are essential for release of gonadotropins, as GnRH neurons express receptors for estrogen β and progesterone. The objective of this study was to evaluate the activity of neurons in POA nuclei, in transition period for estropause in Wistar rats. Cyclic Wistar rats (4-5 months) on the day of estrus and acyclic (17-18 months) in estrus constant (CE) were decapitated or perfused at 10, 14 and 18 hours. Perfused brains were processed for immunohistochemistry to evaluate the immunoreactivity to antigens related to the Fos in POA. After decapitation, the brain was removed and carried microdissection of POA and determining the content of NE and its metabolite; Plasma was used for measurements of LH, FSH, E_2 and P_4 . The results showed higher plasma secretion of LH, FSH and E_2 lower in the group of acyclic rats. The number of FRA-IR neurons was higher in acyclic rats in the 10 hours ($p < 0.001$) and 18 ($p < 0.05$) compared to the group of animals with regular cycle. In rats acyclic, the stored contents of NE was lower at 14h and 18h ($p < 0.001$), and the metabolite was constant and greater at 18h compared to the same time of the rats of the cyclic group ($p < 0.05$). It follows that neural and ovarian changes that occur in the CE decline to determine the occurrence of cyclicity of cycles and featuring periostropausa period.

KEYWORDS: aging, norepinephrine, gonadotropins, estrogens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pulsos hormonais no ciclo hormonal em mulheres.

Figura 2 - Alterações hormonais na peri e pós-menopausa. Concentração sérica aproximada de estradiol, FSH e LH.

Figura 3 - Pulsos hormonais no ciclo estral de ratas, os picos de LH, FSH, E₂ e P₄ no Proestro.

Figura 4 – Progressão do ciclo estral em ratas acíclicas.

Figura 5 - Representação da inervação noradrenérgica do LC e do AVPV/APO nos neurônios GnRH no momento da retroalimentação positiva para deflagração do LH.

Figura 6 - Fotografia obtida em microscópio óptico na objetiva de 10x. Em (A) fotos ciclo estral regular de ratas adultas. Em (B) fotos do ciclo em CE de ratas senis.

Figura 7 - Fotomicrografias representativas do FRA no AVPV. (A) Representação esquemática dos bregma +0,12; 0,00; -0,12mm. (B) Representação esquemática do bregma -0,00 mm. (C) Fotomicrografia do corte de rata aciclica as 18 h do bregma - 0,00. (D) Representação da inserção das caixas bilaterais para delimitação do núcleo AVPV. (E) Fotomicrografia no aumento de 400x onde foi realizada a contagem dos neurônios FRA. Barra de escala para AVPV = 500 mm (50x ampliação), 100 mm (aumento de 200x) e 50 mm (aumento de 400x). 3V = terceiro ventrículo.

Figura 8 - (A) Esquema da secção coronal indicando o ponto de inserção da agulha de 2.0 mm para APO. A coordenada indica a distância do bregma da secção rostral conforme Atlas de Watson e Paxinos, 2007. (B) Fotografia da secção coronal da APO em extensão aproximada de +0.48 mm a -1.02 mm. (C) Fotografia da secção depois do punch para retirada da porção referente à APO.

Figura 9 - Incidência de ciclo estral regular nas ratas adultas com 4-5 meses (A) e de constante estro em ratas senis com 17-18 meses (B).

Figura 10 - Concentração plasmática de LH (A) e FSH (B) de ratas cíclicas e acíclicas. As amostras sanguíneas foram colhidas as 10, 14 e 18 horas na fase do estro (cíclicas) e constante estro (acíclicas).

Figura 11 - Concentração plasmática de E_2 (A) e P_4 (B) de ratas cíclicas e acíclicas. As amostras sanguíneas foram colhidas as 10, 14 e 18 horas na fase do estro (cíclicas) e constante estro (acíclicas).

Figura 12 – Número de neurônios marcados por FRA no AVPV/APO em ratas cíclicas e acíclicas por imunohistoquímica.

Figura 13 – Representação fotográfica da marcação para FRA no AVPV (*plate* 33) de ratas cíclicas e acíclicas. 3V: terceiro ventrículo. Barra de escala para AVPV = 50 μ m.

Figura 14 - Conteúdo de noradrenalina (NA) (A) e seu metabólito (MHPG) (B) na APO de ratas cíclicas e acíclicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

ANOVA – Análise de variância

APO – Área Pré-óptica

APOM – Área Pré-óptica Medial

AVPV – Núcleo Anteroventral periventricular

BSA – Albumina sérica bovina

CE – Constante Estro

CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais

DAB – Diaminobenzidina

DOPAC - ácido 3,4-dihidroxifenilacético

E₂ - Estradiol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

ELISA – Ensaio de Imunoabsorbância Ligado a Enzima

EM – Eminência Mediana

EPM – Erro Padrão da Média

ER_α - Receptor para estrógeno α

ER_β - Receptor para estrógeno β

FRA – Antígeno relacionado ao *fos*

FRA-IR – Antígeno relacionado ao *fos* - imunorreativo

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

H₂O₂ – Água oxigenada

HCl – Ácido clorídrico

HHG – Hipotálamo-Hipófise-Gônadas

HMB – Hipotálamo Médio Basal

HPLC-EC – Cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica

ip - Intraperitoneal

ISOP - Isoproterenol

Kg – Kilograma

LC – Locus Coeruleus

LH – Hormônio luteinizante

M – Molar

mg – Miligrama

MHPG - 3-methoxy-4-hidroxifenilglicol

min – Minuto

mL – Mililitro

mM - milimol

NA – noradrenalina

NE - Noradrenaline

Ng - nanograma

ρμ - picomicrograma

P₄ - progesterona

PBS – Tampão fosfato salina

PCA – Ácido perclórico

PFA – Paraformaldeído

Pg - picograma

pH – Potencial Hidrogênionico

POA – Preoptic Area

PR α - Receptor de Progesterona α

PR β – Receptor de Progesterona β

RIE – Radioimunoensaio

rpm – Rotação por minuto

TH – Tirosina hidroxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 METODOLOGIA	33
2.1 Animais.....	33
2.2 Dosagens Hormonais Plasmáticas.....	34
2.3 Atividades dos neurônios do núcleo Anteroventral Periventricular (AVPV) da Área Pré-Óptica de ratas cíclicas e acíclicas.....	36
2.3.1 Coleta das Amostras	36
2.3.1.1 Perfusão	36
2.3.2 Imunohistoquímica	36
2.4 Dosagem de Noradrenalina da APO de ratas cíclicas e acíclicas.....	39
2.4.1 Coleta das Amostras	39
2.4.2 Microdissecção da área pré óptica (APO).....	40
2.4.3 Dosagem de NA da APO por cromatografia líquida de alta performance com detecção electroquímica (HPLC-EC)	41
2.5 Análise Estatística	42
3 RESULTADOS	44
3.1 Ciclo estral e senescência reprodutiva.....	45
3.2 Concentrações hormonais plasmáticas de gonadotrofinas e esteroides das ratas cíclicas e acíclicas.....	46
3.3 Análise da atividade dos neurônios FRA no AVPV/POA de ratas cíclicas e acíclicas.....	46
3.4 Análise da dosagem de noradrenalina e seu metabólito na APO de ratas cíclicas e acíclicas.....	48
4 DISCUSSÃO	51
5 CONCLUSÃO	57
6 REFERÊNCIAS	58
ANEXO	67

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Em 2050 a população idosa constituirá 22% da população mundial, caracterizando o envelhecimento populacional como fenômeno mundial (UNITED NATIONS, 2013). O envelhecimento é biológico e natural, decorrente de transformações no organismo durante a vida. Quando a homeostase e reparação são reduzidos ao ponto em que a integridade celular, tecidual e funcional são perdidos, o declínio fisiológico começa e o envelhecimento é manifestado (Zhang *et al.*, 2013).

Característica comum das populações em todo o mundo é a preponderância de mulheres em idades mais avançadas. Em muitos países, a maioria da população mais velha é feminina e esta população aumenta com a idade; segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2030 mais de 1,2 milhões de mulheres terão 50 anos (WHO, 1996) e estarão em período de transição para a menopausa (Rehman e Masson, 2005). Sendo assim, número grande de mulheres viverá maior fração de suas vidas com hipostrogenia crônica, sendo importante entender os processos biológicos que regem este período transitório.

A transição para a menopausa é precedida por aproximadamente 35 anos de ciclos menstruais regulares, constituídos pela fase lútea de 14 dias e fase folicular com, pelo menos, 10-11 dias de duração (Figura1). Antes do aparecimento de pausa nesse ritmo menstrual característico, há diminuição no fornecimento de oócitos, sem atingir o nível crítico (Burger, 1999). Além disso, embora sem sinais detectáveis à mulher, alterações sutis na secreção hormonal ocorrem neste intervalo. Como por exemplo, o hormônio folículo-estimulante (FSH), crítico para os estágios terminais de crescimento folicular, eleva-se, embora lentamente, ao longo dos anos reprodutivos (Ahmed Ebbiary, Lenton e Cooke, 1994) (Figura 2). Também o tamanho da coorte

de folículos da mulher diminui, mesmo que a ovulação ocorra em todos os meses (Santoro e Randolph, 2011). O início do processo de transição ocorre quando a mulher regularmente cíclica experimenta a não ocorrência de período menstrual, ou registra variação no intervalo intermenstrual de 6 a 15 dias; esta transição inicial permanece até a ocorrência de amenorreia, isto é, aumento no intervalo entre os ciclos por mais de 60 dias, sendo denominado de período transitório tardio (Harlow *et al.*, 2008). Nesta fase, o intervalo entre os ciclos torna-se cada vez mais prolongado e finaliza com o último período menstrual. Cada etapa de alteração no ciclo menstrual é acompanhada por alterações hormonais (Figura 2), caracterizando o período perimenopausal (Burger, 1999).

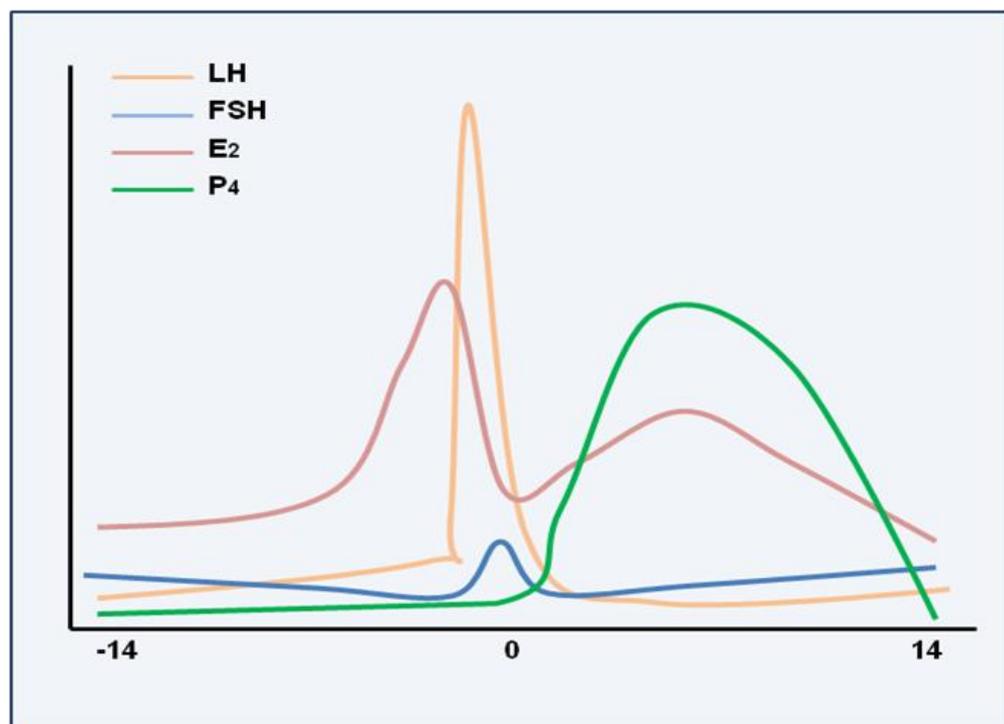


Figura 1 – Concentrações hormonais no ciclo menstrual em mulheres. O dia 0 representa o dia dos picos hormonais e ovulação; entre -14 e 0 a fase folicular; e entre 0 e 14 a fase lútea da mulher. Adaptado de Freeman (2006).

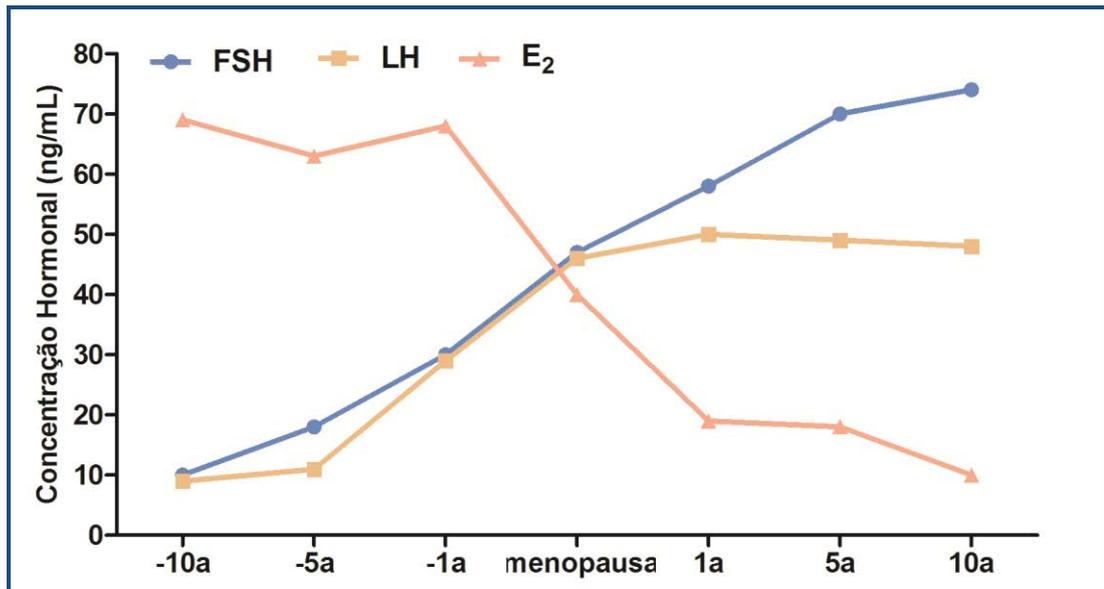


Figura 2 - Alterações hormonais na peri e pós-menopausa. Concentração sérica aproximada de estradiol, FSH e LH. Há aumento súbito do FSH, seguido pelo aumento do LH e diminuição do estradiol (Adaptado de Andrade, 2001).

Estudos realizados nos anos 90 (Lenton *et al.*, 1991; MacNaughton *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 1996), mostraram que as concentrações de estradiol (E₂) não diminuem durante o período inicial da perimenopausa, permanecem normais ou estão elevados. Entretanto, a elevação nas concentrações de FSH tem sido considerada uma das primeiras marcas da perimenopausa em mulheres. O padrão de secreção do hormônio luteinizante (LH) em mulheres cíclicas na meia-idade foi analisado por Matt e colaboradores (1998). Estes autores constataram maior duração e menor frequência nos pulsos do LH, além disso, a capacidade de estradiol para induzir picos de LH é atenuada em mulheres no período perimenopausal. Portanto, a magnitude de resposta à retroalimentação positiva dos esteroides ao LH é atenuada com o envelhecimento nas mulheres. (Shaw *et al.*, 2011). A capacidade de resposta dos folículos ovarianos, especialmente relacionados à produção de esteróides, diminui levando à redução da produção e circulação de E₂, que por sua vez se traduzem em estimulação contida

do aumento pré-ovulatório do LH, isso continua até que a liberação de LH seja insuficiente para a ovulação, pelo menos para alguns ciclos, então a ovulação torna-se cada vez mais errática acompanhada por diminuição da produção de progesterona (P_4); como a reserva ovariana diminui, a ovulação torna-se mais esporádica, com aumento da variabilidade da duração do ciclo (Ottinger, 2010).

Durante muito tempo, aceitou-se que a menopausa resulta simplesmente do esgotamento pós-mitótico de folículos ovarianos e que as alterações no eixo hipotálamo-hipófise que acompanham a menopausa eram considerados consequência do declínio da função ovariana, entretanto, há evidências de que o cérebro desempenha função importante na sequência de eventos que levam a senescência reprodutiva (Rance e Uswandi, 1996). Parece que padrões temporais de sinais neurais são alterados durante a meia idade em mulheres bem como em modelos animais, antes da cessação de ciclos reprodutivos, e podem contribuir para a menopausa (Lloyd, Hoffman e Wise, 1994).

Sabe-se que o ciclo reprodutivo feminino é controlado pelo sistema hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), sendo constituído por células secretoras do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em núcleos neurais, pelos gonadotrofos hipofisários que produzem as gonadotrofinas, LH e FSH, e pelos ovários, produtores principais de esteroides (E_2 e P_4) (Yin e Gore, 2010). O envelhecimento do sistema reprodutor feminino é processo multifatorial que envolve alterações em todo eixo HHG e tecidos reprodutivos associados. Portanto, a perda da função ovariana na menopausa está associada às alterações marcantes no hipotálamo e função da hipófise (Rehman e Masson, 2005).

Para estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos na perda da fertilidade, roedores fêmeas são modelos experimentais utilizados para avaliação

das funções reprodutivas, pois possuem ritmicidade em seu ciclo reprodutivo, com secreção de hormônios hipofisários e gonadais no mesmo ritmo das mulheres, porém em 4 dias (Heape, 1898; Freeman, 1994). O ciclo de ratas é descrito como ciclo estral, com duração aproximada de quatro dias em quatro fases distintas: Metaestro, Diestro, Proestro e Estro, as quais recebem influência direta das concentrações plasmáticas dos hormônios ovarianos (Figura 3). A fase do Proestro é marcada pelas altas concentrações plasmáticas de estradiol, progesterona e, há ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, dia fértil do animal (Mandl e Zuckerman, 1951).

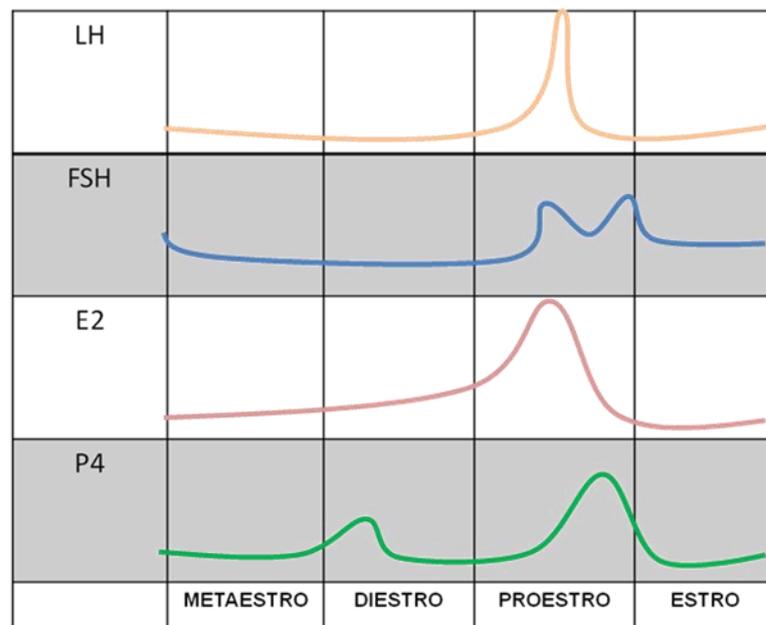


Figura 3 - Concentrações hormonais no ciclo estral de ratas, os picos de LH, FSH, E₂ e P₄ no Proestro. Adaptado de Freeman (2006).

Vários estudos realizados utilizam roedores como modelos, sendo conveniente indagar se os dados derivados destas espécies fornecem conhecimentos sobre a menopausa humana. Argumentos de que os roedores não são bons modelos estão baseados em duas observações: a primeira esta relacionado com o aumento nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas

devido à baixa concentração de estrógeno nas mulheres na pós-menopausa (Knobil, 1992). Em contraste, as concentrações de LH permanecem relativamente normal em ratas velhas, acíclicas e em “pseudoprenhez” (Lu *et al.*, 1979), embora ocorra redução na concentração de estradiol. Estas informações sugerem que diminuição de influências do hipotálamo é fundamental para o estado pós-reprodutivo em ratas e pode não ser tão crítica para as mulheres. A outra observação esta relacionada com a dinâmica na redução da reserva folicular do ovário, fundamentalmente diferente em mulheres em comparação com roedores. A diminuição de folículos primordiais nas mulheres aumenta significativamente em torno dos 37 anos de idade, levando à ausência de folículos quando as mulheres estão entre 50 e 55 anos de idade, na pós-menopausa (Richardson, Senikas e Nelson, 1987). Porém, folículos foram relatados em ratas velhas acíclicas, sugerindo que o esgotamento de folículos no ovário não é o fator limitante em roedores (Field e Kuhn, 1989; Rehman e Masson, 2005; Yin e Gore, 2006).

Apesar das diferenças citadas acima há impressionantes paralelos entre a fêmea humana e a dos roedores durante o período de transição, como as alterações nas concentrações plasmáticas das gonadotrofinas e estradiol. O conjunto de resultados obtidos em diferentes estudos (Matt *et al.*, 1986; Lenton *et al.*, 1991; MacNaughton *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 1996; Matt *et al.*, 1998) argumentam fortemente que mulheres de meia-idade, na pré e perimenopausa, e ratas com ciclo estral irregular apresentam padrões semelhantes como aumento nas concentrações de FSH, padrões de secreção do LH e a capacidade de resposta ao estradiol, caracterizando a rata como modelo apropriado para o estudo do envelhecimento reprodutivo.

Nas ratas, o início da periestro-pausa é marcado pelo constante estro (CE), quando começa a depleção de ovócitos e diminuição na concentração plasmática de E₂ e P₄; a estropausa, porém, é caracterizada por anestro e atrofia do útero (LeFevre e McClintock, 1988; Field e Kuhn, 1989; Arias *et al.*, 1996; Finch, 2014). Os eventos da periestro-pausa são acompanhados pela diminuição na fertilidade e fecundidade, juntamente com transição de ciclos regulares de 4 dias para ciclos mais longos, evoluindo para aciclicidade e anovulação (Arias *et al.*, 1996). Estudos realizados por Huang e Meites (1975) bem como por Lu e colaboradores (1979) evidenciaram que o ciclo estral progride, após ciclos regulares, para ciclos irregulares seguido de constante estro, persistente diestro, e, finalmente, anestro. Já em 1988, LeFevre e McClintock em seus experimentos constataram que ratas Sprague-Dawley passaram de ciclos regulares para CE e persistente diestro, porém algumas fêmeas, entre um estado e outro apresentavam ciclos irregulares (Figura 4). Esses autores descreveram que nem todas as ratas apresentavam CE antes do persistente diestro até o anestro.

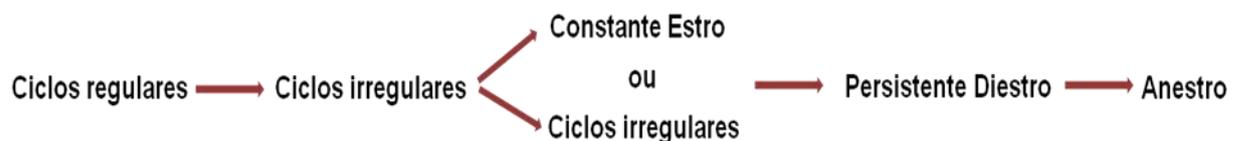


Figura 4 – Progressão do ciclo estral em ratas acíclicas. Adaptado de LeFevre e McClintock, 1988 e Lu *et al.* 1979

A diminuição da magnitude do pico pré-ovulatório do LH no proestro foi caracterizado como senescência reprodutiva em fêmeas de roedores com regularidade cíclica (Wise, 1982; Hwang *et al.*, 1990; Gore, 2001) uma vez que a depleção de ovócitos parece não ser a causa primária deste processo, pois mesmo em ratas acíclicas há folículos funcionais (Huang e Meites, 1975; Rehman e Masson, 2005). Corroborando com esses achados, Clemens e Bennet (1977) verificaram o

reaparecimento da ciclicidade quando os ovários de ratas acíclicas foram transplantados para animais que exibem regularidade de ciclo estral. Portanto, há evidências de que roedores podem tornar-se acíclicos na presença de ovário funcional, indicando possível envolvimento hipotalâmico-hipofisário, sugerindo que alteração na produção de GnRH está envolvida na aciclicidade (Field e Kuhn, 1989; Gore, Windsor-Engnell e Terasawa, 2004; Rehman e Masson, 2005).

A redução na liberação de GnRH acompanha o declínio da magnitude do pico de LH induzido por esteróides e esta diminuição da atividade de GnRH é refletida na diminuição do número de neurônios GnRH que expressam *Fos* e *Jun* (Steger *et al.*, 1980; Rubin, Lee e King, 1994). No entanto, é relatado em alguns estudos, que após o estabelecimento da senescência o número de neurônios GnRH e o conteúdo deste hormônio no hipotálamo médio basal (HMB) não é alterado logo após o estabelecimento da senescência reprodutiva (Gore e Roberts, 1995; Gore *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2001; Gore, Windsor-Engnell e Terasawa, 2004), sugerindo que o déficit durante o período de meia-idade estão nas vias aferentes que regulam a síntese e/ou secreção de GnRH.

Neurônios secretores de GnRH localizados no hipotálamo e na área pré-óptica (APO), distribuídos no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) e área pré-óptica mediana (APOM), estendem axônios para capilares fenestrados na eminência mediana (EM), liberando o neuropeptídeo na hipófise anterior, estimulando LH e FSH (Wright e Jennes, 1993; Le *et al.*, 2001; Ottinger, 2010; Matsuda *et al.*, 2015). Esses neurônios são células principais que regulam a função reprodutiva e com o envelhecimento há alteração na interação complexa do eixo HHG desencadeando aciclicidade (Gore e Roberts, 1995; Arias *et al.*, 1996; Campos e Herbison, 2014; Lima *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014).

Os neurônios do AVPV contêm receptores para E₂ (ER_α e ER_β) e P₄ (PR_α e PR_β) e expressam *c-fos*, sincronicamente a neurônios GnRH no tempo de ocorrência do pico de LH. Evidências indicam que os ER_α são os principais mediadores de ação do estrogênio na hipófise, sendo críticos para a ciclicidade estral e fertilidade (Gieske *et al.*, 2008). Os neurônios GnRH expressam receptores adrenérgicos, e no momento da retroalimentação positiva, neurônios do tronco encefálico liberam noradrenalina (NA) na APO, estimulando neurônios GnRH e portanto estimulando secreção de LH no proestro (Helena *et al.*, 2006; Szawka *et al.*, 2013). Além disso, ER_α, ER_β, PR_α e PR_β foram marcados em neurônios noradrenérgicos, sugerindo que essas células são sensíveis às variações na concentração plasmática dos esteróides ovarianos e representam via aferente primária para os neurônios GnRH, que expressam receptores adrenérgicos imunorreativos (Hosny e Jennes, 1998). Na meia-idade, a pulsatilidade do GnRH é alterada e surgimento do LH é atenuado. Há redução na expressão de *fos* no período pré-ovulatório e estas alterações neuronais e de neurotransmissores provavelmente participam da transição para aciclicidade (Herbison, 1997; Gore *et al.*, 2000; Gore, 2002; Rehman e Masson, 2005). A administração de bloqueadores dos receptores alfa-adrenérgicos suprime pico de LH e a inibição da síntese de NA resulta em supressão da liberação do GnRH em proestro (Wright e Jennes, 1993). Analisando ratas de meia idade (8-10 meses), Temel e colaboradores (2002) sugeriram que o volume reduzido da catecolamina durante o pico de LH é causado, em parte, por diminuição na sensibilidade dos neurônios NA ao estradiol e provavelmente não por grandes déficits na expressão de enzimas para a síntese do transmissor ou receptores de esteróides. Desta forma, os sinais que controlam os padrões de secreção das gonadotrofinas, tornam-se menos precisos e sincronizados

estabelecendo a transição para a aciclicidade reprodutiva (Le *et al.*, 2001). Yin e Gore (2010) sugeriram que o número de neurônios e o conteúdo de GnRH no HMB não altera na senescência reprodutiva, sugerindo que as diferenças na função resultem da combinação de fatores que ocorrem nos corpos celulares, dendritos e nos terminais de GnRH na EM.

A inervação noradrenérgica no hipotálamo é originária de células extrínsecas, principalmente no Locus Coeruleus (LC) (Anselmo-Franci *et al.*, 1997). Os neurônios noradrenérgicos do LC são considerados fonte primária de NA no cérebro e estão implicados na regulação da função reprodutiva feminina, com aumento na secreção de NA na APO no momento do pico de LH (Szawka *et al.*, 2009). Estudos têm fornecido evidências da importância do LC para a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH em diversos modelos experimentais com roedores. Após lesões no LC, verifica-se redução do *input* noradrenérgico nessa área, ocorrendo alteração no ciclo estral, redução no conteúdo de NA na APOM e HMB e bloqueio do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, resultando em falha da ovulação (Anselmo-Franci *et al.*, 1997).

Alguns estudos sugerem que o LC pode ser local para a ação do estrógeno durante *feedback* positivo. A atuação estimuladora dos neurônios do LC no controle da secreção de LH é apoiada por estudos em que a estimulação elétrica nesse núcleo aumentou a secreção de NA e GnRH em ratas castradas tratadas com estrogênio. A atuação estimuladora do LC na secreção de LH pode ser observada pelo aumento desta secreção após estimulação eletroquímica e pela diminuição da concentração de NA no hipotálamo e APO, cuja lesão, impede a ocorrência do pico pré-ovulatório (Szawka *et al.*, 2009). Além disso, aumento gradual da secreção de NA foi observada no MBH, nos terminais de GnRH. Sugere-se que o aumento da

atividade neuronal na APOM pode ser consequência da ativação dos neurônios LC resultando em aumento da secreção das gonadotrofinas (Figura 5) (Martins-Afféri *et al.*, 2003).

Portanto, é evidente que a regulação da liberação pulsátil de GnRH/LH na secreção máxima pré-ovulatória envolve circuitos neuronais múltiplos e que a via noradrenérgica exerce influência importante nesta regulação. A interrupção da ciclicidade, resultado da interação complexa das alças de retroalimentação entre os sistemas endócrino e neural, determina a diminuição na magnitude da secreção máxima pré-ovulatória do LH e caracteriza o envelhecimento reprodutivo.

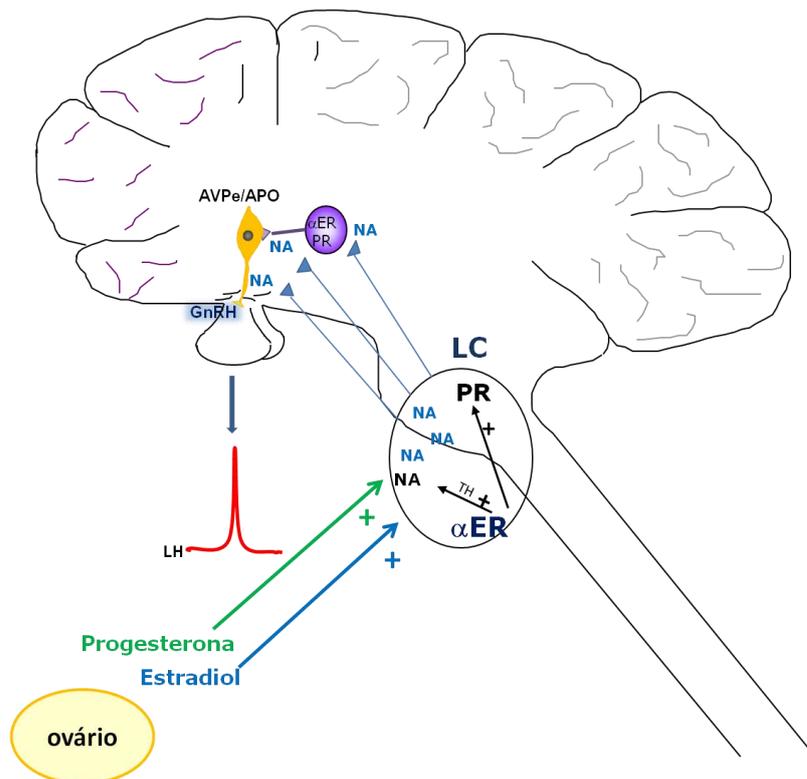


Figura 5 - Representação da inervação noradrenérgica do LC e do AVPV/APO nos neurônios GnRH no momento do feedback positivo para deflagração do LH. Adaptado Szawka *et al.*, 2013.

É importante ressaltar que a senescência reprodutiva determina consequências grandes para as mulheres, pois o ovário não é somente a fonte de oócitos, mas também a fonte primária de esteróides os quais são importantes para

manter funções normais como a integridade óssea e metabolismo mineral (Sullivan e Fowlkes, 1996), a memória e cognição (Sherwin, 1994; 1996), a função cardiovascular (Sullivan e Fowlkes, 1996; Wild, 1996) e o controle de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Paganini-Hill e Henderson, 1994). Sendo o cérebro a região “chave” para o controle da reprodução, a compreensão dos mecanismos que regulam o envelhecimento reprodutivo feminino fornecerá informações importantes acerca do envelhecimento do cérebro. Além disso, o sistema reprodutivo feminino passa por alterações drásticas em período relativamente precoce durante o envelhecimento e o conhecimento deste sistema nos permitirá abordar questões importantes sobre a biologia do envelhecimento,

Mediante o exposto, o presente estudo teve como *objetivo* avaliar a atividade das células neuronais da APO no período de transição para a estropausa de ratas Wistar e correlacionar com as concentrações plasmáticas das gonadotrofinas, esteróides gonadais (E₂, P₄), conteúdo de noradrenalina e seu metabólito.

Metodologia

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Para este estudo, os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil (CEUA: 2013-01018; Anexo A). Foram utilizadas ratas Wistar cíclicas (4-5 meses) e acíclicas em constante estro (17-18 meses). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa) em ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz (12/12 h), umidade ($55 \pm 10\%$) e com acesso livre a água e ração (Presence[®] Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil).

Para seleção dos animais, o ciclo estral foi realizado diariamente durante o período experimental. O esfregaço vaginal foi coletado sempre às 8 horas e analisado a fresco ao microscópio óptico, segundo técnica de Long e Evans (1922). Foram utilizadas ratas adultas cíclicas, que apresentaram ciclo estral regular (Figura 6A) e ratas senis acíclicas, que apresentaram constante estro (CE) durante três ciclos consecutivos, no mínimo (Figura 6B). Os animais experimentais, 8 para cada grupo, foram submetidos à decapitação ou perfusão transcardíaca em três horários: 10, 14 e 18 horas no dia do estro.

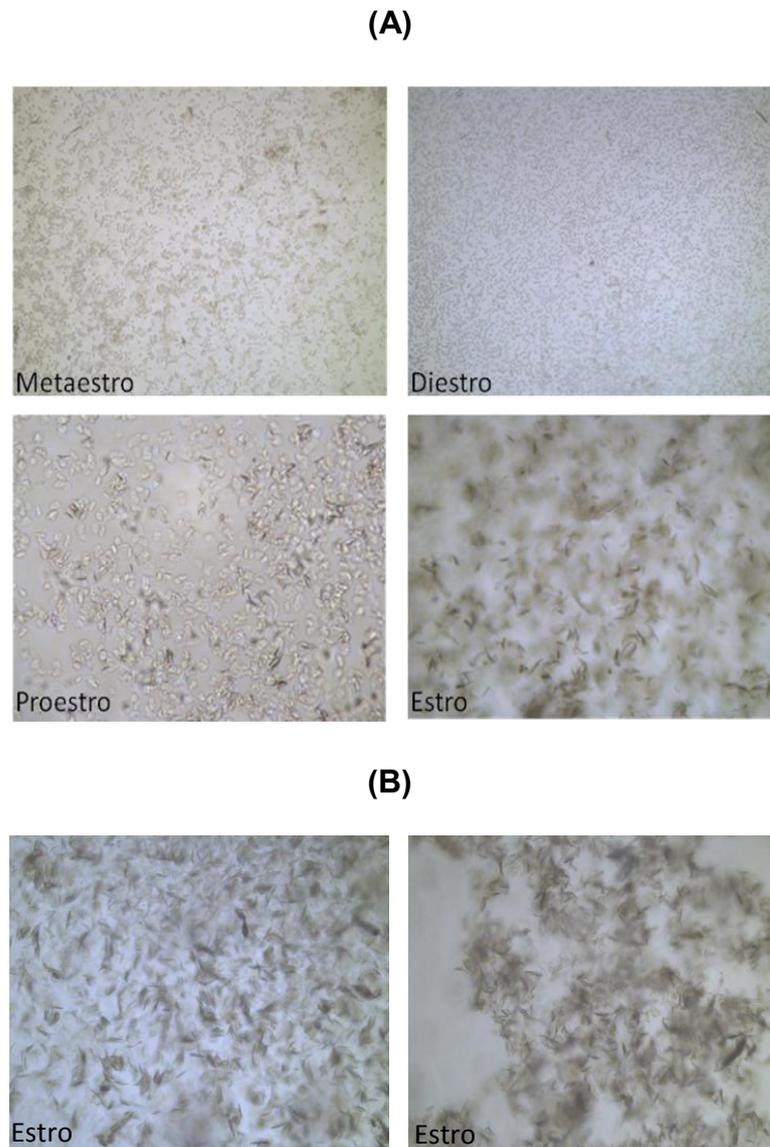


Figura 6 - Fotografia obtida em microscópio óptico na objetiva de 10x. Em (A) fotos ciclo estral regular de ratas adultas. Em (B) fotos do ciclo em CE de ratas senis.

2.2 Dosagens Hormonais Plasmáticas

Para a determinação das concentrações plasmáticas dos hormônios, as ratas cíclicas no dia do estro e as acíclicas em CE foram decapitadas as 10, 14 e 18 horas. Imediatamente após a decapitação, as amostras sanguíneas foram coletadas em tubos heparinizados acondicionados em isopor contendo gelo. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm, a temperatura de 2° C por 15 min. O plasma foi aliquoteado em eppendorfs (500 µL) e estocado em freezer (-20° C) para processamentos posteriores.

Para dosagem dos hormônios FSH, LH e P₄ foi utilizada a técnica de radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo. As concentrações plasmáticas de LH e FSH foram determinadas utilizando-se kit específico fornecido pelo Instituto Nacional de Diabetes, Doenças Digestivas e Renais (NIDDK, Bethesda, MD, EUA), no laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os anticorpos primários utilizados foram *anti-rat* de LH-S10 e FSH-S11 diluídos com soro de coelho e padrão normal de preparação LH-RP3 e FSH-RP2 diluídos em tampão fosfato gel de 0,1% (0,01 M, pH = 7,5). Os hormônios foram iodinados com ¹²⁵I da NEN (Perkin Elmer) e o segundo anticorpo foi produzido em ovelhas pelo Prof. Dr. Celso R. Franci da FMRP-USP, utilizando como inócuo gamaglobulina de coelho. A dose mínima detectável foi de 0,16 ng/mL para LH e 0,09 ng/mL para a FSH, sendo o coeficiente de variação para o erro intra-ensaio de 4% (LH) e 5% (FSH).

A determinação da P₄ plasmática foi realizada utilizando-se o kit de MP Biomedicals LLC (Diagnostics Divisions; New York, USA). A dose mínima detectável foi 0,16 ng/mL e o erro intra-ensaio de 3,9%. Todas as amostras foram dosadas em duplicata no mesmo ensaio, para evitar erro inter-ensaio.

A determinação da concentração plasmática de E₂ foi realizada com kit comercial (IBL international GMBH, Hamburgo, Alemanha) de ensaio de imunabsorbância ligado a enzima (ELISA) por fase sólida, sendo a dose mínima detectável de 0,28 pg/mL. Todas as amostras foram dosadas em monocata e no mesmo ensaio para evitar erro inter-ensaio.

2.3 Atividades dos neurônios FRA do núcleo Anteroventral Periventricular (AVPV) da Área Pré-Óptica de ratas cíclicas e acíclicas.

2.3.1. Coleta das Amostras

2.3.1.1. Perfusão

Os animais foram perfundidos transcardiacamente nos horários das 10, 14 e 18 horas depois de anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Syntec® 80 mg/Kg pc/ip) e Cloridrato de Xilazina (Syntec® 40 mg/Kg pc/ip). A região torácica do animal foi exposta, retirado aproximadamente 5 mL de sangue, em seringa heparinizada, diretamente do ventrículo esquerdo do coração, para dosagens plasmáticas posteriores. A artéria aorta abdominal foi clampeada e realizada injeção de 0,1 mL de heparina diretamente no músculo cardíaco, para evitar coagulação. Pequena incisão foi realizada no ápice do músculo, que foi dividida para introdução da cânula conectada à bomba de perfusão (Miniplus 3 GILSON®) até atingir a artéria aorta ascendente.

Utilizou-se tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M para lavagem sistêmica do animal (fluxo 8 mL/min, por 5 min), posteriormente, 700 mL de paraformaldeído (PFA) 4% (PBS 0,2 M + PFA 8%, 1:1) para a fixação do tecido cerebral, durante 50 minutos. O encéfalo foi removido e mantido em PFA 4% por 2 horas a 4°C. Após, foi retirado e imerso em solução de sacarose 30% por 48 horas. Para congelamento, foi imerso em isopentano (-50°C) durante 1min e armazenado em freezer -70° C.

2.3.2. Imunohistoquímica

Foram obtidos em criostato (Leica® CM3050 S) a -22° C, cortes coronais seriados de 30 µm das regiões da APO conforme Atlas de Watson e Paxinos para

coordenadas estereotáticas em cérebro de rato (2007). Os cortes foram armazenados em solução crioprotetora e estocados a -20°C para serem processados por imunohistoquímica um em cada quatro cortes para antígeno relacionado ao *fos* (FRA) na APO.

A imunohistoquímica foi realizada pelo método “free-floating”. Os cortes de uma série de 4 foram lavados quatro vezes, por 5 minutos, em Tampão fosfato-salina (PBS) 0,05 M pH 7.4 para remoção da solução crioprotetora. Todas as etapas da preparação do tecido foram realizados à temperatura ambiente, com soluções diluídas em PBS, intercalados por quatro lavagens com PBS durante 5 minutos.

Os cortes foram lavados com glicina (0,1M) por 15 minutos para eliminação do excesso de PFA, incubados em Triton X-100 (TX-100 0,4%) por 30 minutos, para aumentar a permeabilidade celular, e com água oxigenada (H_2O_2 1%) durante 45 minutos, para eliminação da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram lavados com PBS até eliminação da H_2O_2 . As ligações inespecíficas foram bloqueadas com incubação por 60 minutos em albumina bovina (BSA 3%).

Os cortes foram incubados a 4°C por 48h com anticorpo policlonal produzido em coelho (1:2000; K-25, Santa Cruz Biotechnology, CA), em solução contendo TX-100 0,4% e BSA 3% em PBS 0,05% (PBS+). Depois de lavados, os cortes foram incubados com 2º anticorpo biotilado, anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000; Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluído 1:600 em PBS+ durante 1:30 h. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com complexo Avidina-Biotina (1:2000; kit ABC Elite, Vectastain) por 60 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) intensificado com cloreto de níquel (0,2 mg/mL DAB,

Sigma; 25 mg/mL NiCl₂, Riedel-de haën; 1 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em tampão acetato 0,05M (pH=7.5), por 15 minutos. A reação foi interrompida transferindo-se os cortes para o tampão acetato 0,05 M (pH=7.0) e lavados três vezes, por 5 minutos e finalizado com quatro lavagens em PBS.

Os cortes imersos em PBS foram colocados em lâminas gelatinizadas e após secos, foram desidratados em álcool etílico nas concentrações de 75, 95 e 100%, diafanizados em xilol, e recobertos por lamínula com uso de Entelan (Merck®).

Para análise foi utilizado microscópio óptico (Leica® DM 4000 B LED) e sistema para análise de imagens (LAS V4.2). Na APO foi identificado o bregma 0.12 mm (plate 32), 0.00 mm (plate 33) e -0.12 mm (plate 34) que contém núcleo anteroventral da área pré-óptica (AVPV) e contagem bilateral dos neurônios imunorreativos (objetiva de 20x) ao FRA (Figura 7). Para cada plate (Figura 7A), foi inserida uma caixa (Figura 7D) bilateral, para delimitação do AVPV, cujas dimensões variaram em função do tamanho de cada plate, tendo como referência de inserção a curvatura caudal do 3º ventrículo (Figuras 7B e C). Para a análise estatística foram considerados somente os neurônios imunorreativos (Figura 7E) dos plates correspondentes ao bregma 0.00 mm (plate 33) e -0.12 mm (plate 34).

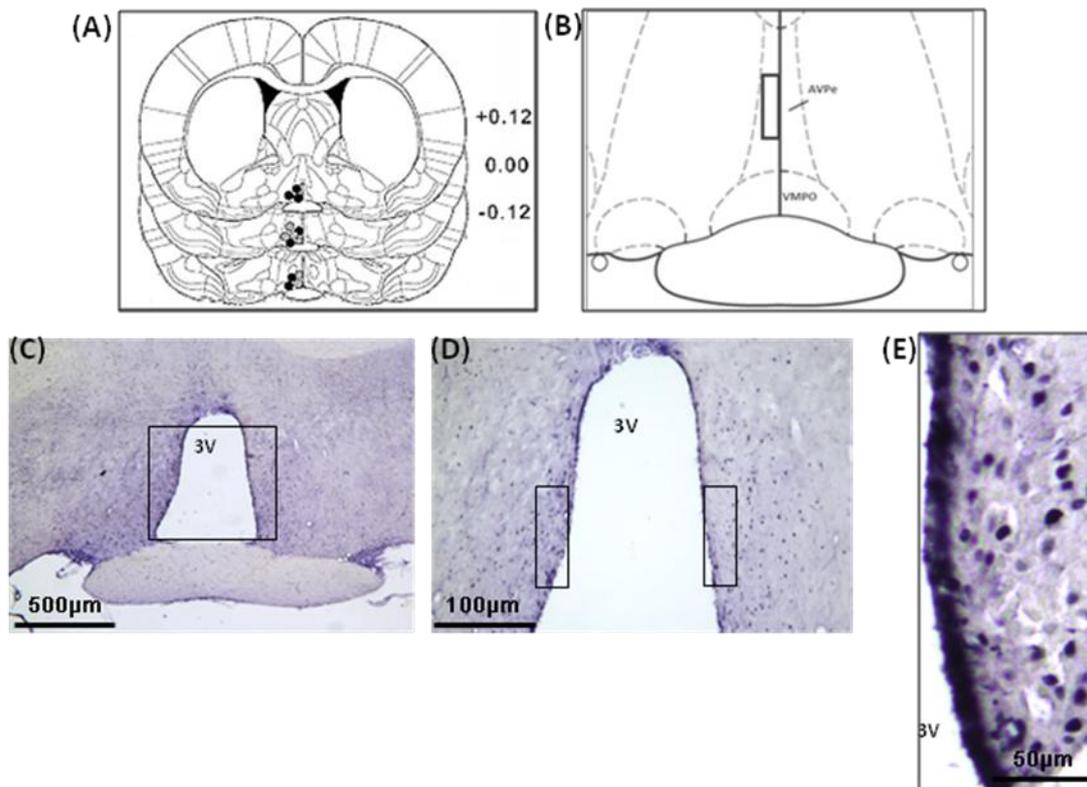


Figura 7 - Fotomicrografias representativas do FRA no AVPV. (A) Representação esquemática dos bregma +0,12; 0,00; -0,12mm. (B) Representação esquemática do bregma -0,00 mm. (C) Fotomicrografia do corte de rata acíclica as 18 h do bregma -0,00. (D) Representação da inserção das caixas bilaterais para delimitação do núcleo AVPV. (E) Fotomicrografia no aumento de 400x onde foi realizada a contagem dos neurônios FRA. Barra de escala para AVPV = 500 μm (50x ampliação), 100 μm (aumento de 200x) e 50 μm (aumento de 400x). 3V = terceiro ventrículo.

2.4 Dosagem de Noradrenalina da APO de ratas cíclicas e acíclicas

2.4.1 Coleta das Amostras

As ratas com 4-5 meses em estro e 17-18 meses em CE foram decapitadas às 10, 14 e 18 horas. Os cérebros foram rapidamente retirados, as regiões anterior e posterior foram separadas e imediatamente congeladas à -70°C , em freezer, para posterior microdissecção de áreas da região anterior.

2.4.2 Microdissecção da área pré óptica (APO)

Para a remoção da APO foi utilizada a técnica de “*punch*” descrita por Palkovits (1973). O cérebro foi fixado em plataforma recoberta com meio próprio para congelação (Tissue-tek o.c.t. compound, Miles INC.) adaptada ao criostato com temperatura mantida à -15°C . A localização desta área baseou-se no Atlas para coordenadas estereotáticas de Paxinos (Paxinos, Watson e Emson, 1980). Uma fatia de $1500\ \mu\text{m}$ foi obtida a partir de $+0,48\ \text{mm}$ posterior ao bregma, então foi microdissecada com auxílio de agulha circular com $1,5\ \text{mm}$ de diâmetro, inserida acima do quiasma óptico (Figura 8).

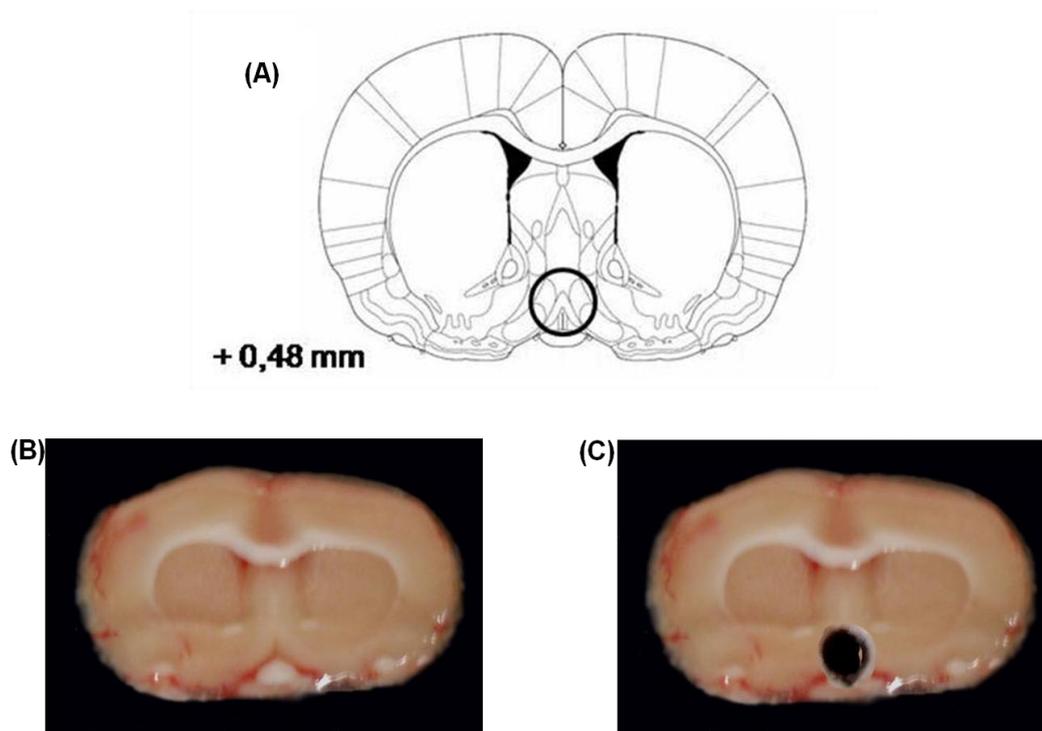


Figura 8 - (A) Esquema da seção coronal indicando o ponto de inserção da agulha de $2.0\ \text{mm}$ para APO. A coordenada indica a distância do bregma da seção rostral conforme Atlas de Watson e Paxinos, 2007. (B) Fotografia da seção coronal da APO em extensão aproximada de $+0.48\ \text{mm}$ a $-1.02\ \text{mm}$. (C) Fotografia da seção depois do punch para retirada da porção referente à APO.

2.4.3 Dosagem de NA da APO por cromatografia líquida de alta performance com detecção electroquímica (HPLC-EC)

As concentrações de NA e seu metabolito 3-metoxi-4-hydroxifenilglicol (MHPG) na APO foram determinadas através de HPLC-EC. Após a homogeneização das amostras com 100 μ L de solução de ácido perclórico (PCA 0,15 M) + EDTA (0,1 mM) contendo 10 μ g/ μ L de isoproterenol (ISOP) como padrão interno, o homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min a 4°C e filtrado em membrana 0.22 μ m (Durapore, Millipore) previamente preenchida com solução de PCA 0,15 M e, em seguida, esvaziada com ar para serem hidrolisadas por aquecimento a 94°C durante 5 min antes da injeção no sistema de HPLC com auto-injector (SIL-10Advp; Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada a 35°C em coluna de fase reversa RP-18e 250x4 mm (Purospher, 5 μ m; Merck, Darmstadt, Alemanha), precedida por pré-coluna RP-18e 4x4 mm (Lichrospher, 5 μ m; Merck).

A fase móvel foi constituída por 100 mM de dihidrogenofosfato de sódio, 10 mM cloreto de sódio, 0,1 mM EDTA, 0,12 mM de ácido 1-octanesulfônico de sódio (Sigma-Aldrich) e 4% de metanol (Omnisolv; Merck Chemical Inc., Gibbstown, NJ, EUA). O pH foi ajustado para 3,5 com ácido fosfórico a temperatura de 35°C. A vazão da bomba (LC-10Advp; Shimadzu) foi de 0,4 mL/min por 33'30" e o potencial detector foi de 0,75 V (Década; Antec, Leyden, Holanda).

Todas as amostras foram processadas na mesma análise para evitar erro inter-ensaio e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6.29%. Os níveis de NA foram considerados para estimar estoque do neurotransmissor em vesículas sinápticas, ao passo que os níveis de MHPG refletem a quantidade de NA liberada

na amostra. As taxas de MHPG/NA foram utilizadas como medida de volume do neurotransmissor.

2.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados utilizando-se os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) e as comparações múltiplas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) a dois critérios, seguida do pós-teste de Newman-Keuls. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$ para todas as comparações. O programa utilizado foi GraphPad Prism

Resultados

3. RESULTADOS

3.1 Ciclo estral e senescência reprodutiva

Para validar modelo adequado para estudo da senescência reprodutiva, analisamos as alterações que ocorrem no ciclo estral de ratas Wistar com idade entre 17-18 meses. Constatamos aumento no comprimento das fases do ciclo estral com ocorrência de 15 a 45 dias em estro, sendo este período denominado de constante estro (CE). A análise do ciclo estral das ratas com 4-5 meses comprovou a ocorrência de regularidade do ciclo estral em 67% das ratas adultas (Figura 9A) do lote de animais analisados. Entre as ratas com 17-18 meses, 64% apresentaram constante estro durante período equivalente a três ciclos consecutivos (Figura 9B).

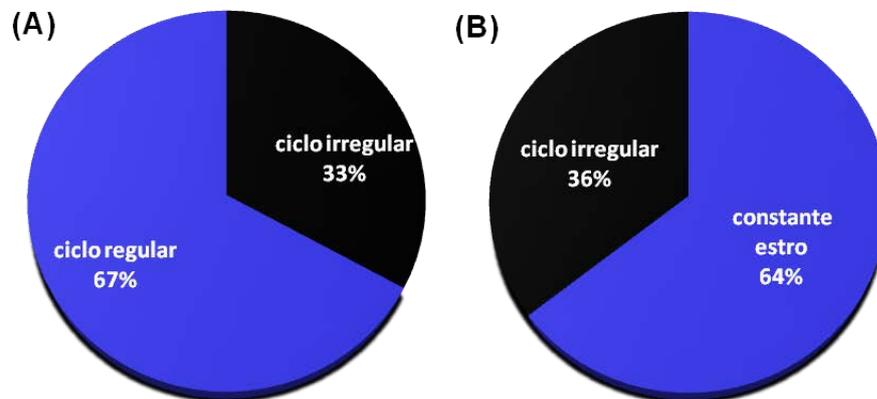


Figura 9 - Incidência de ciclo estral regular nas ratas adultas com 4-5 meses (A) e de constante estro em ratas senis com 17-18 meses (B).

3.2 Concentrações hormonais plasmáticas de gonadotrofinas e esteroides das ratas cíclicas e acíclicas

As concentrações plasmáticas das gonadotrofinas de ratas cíclicas e acíclicas, nos horários das 10, 14 e 18 horas do estro, estão apresentadas

graficamente na figura 10. Nos animais cíclicos, a concentração plasmática de LH (Figura 10A) foi menor e constante nos tempos analisados. No entanto, no grupo de ratas acíclicas foi detectado aumento na concentração de LH às 10 h ($p<0,05$) e 18 h ($p<0,05$) quando comparado ao grupo de ratas cíclicas. As concentrações plasmáticas de FSH (Figura 10B) em ratas cíclicas diminuem ao longo dos períodos de tempo analisado, com menor concentração às 18 horas ($p<0,05$). No grupo de ratas acíclicas, a concentração de FSH foi menor quando comparado com as de ratas cíclicas ($p<0,001$ para 10 e 14 horas; $p<0,05$ para as 18 horas).

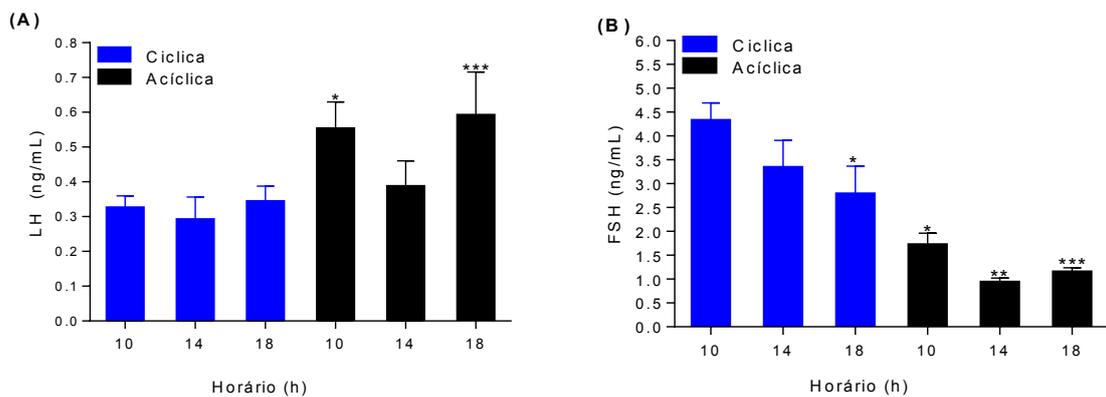


Figura 10 - Concentração plasmática de LH (A) e FSH (B) de ratas cíclicas e acíclicas. As amostras sanguíneas foram colhidas as 10, 14 e 18 horas na fase do estro (cíclicas) e constante estro (acíclicas). Dados expressos por média \pm EPM, análise estatística por ANOVA two-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * vs 10h/C; ** vs 14h/C; *** vs 18h/C. (C= cíclica; A= Acíclica; n= 8 animais/horário).

A Figura 11 apresenta a concentração plasmática de E₂ e P₄ das ratas cíclicas e acíclicas. A concentração plasmática de E₂ no grupo de ratas cíclicas é maior que no grupo de ratas acíclicas, com diminuição da concentração ao longo dos horários analisados ($p<0,001$). Nas ratas acíclicas, a concentração plasmática de E₂ permaneceu constante ao longo dos horários comparando intragrupo; quando comparado com o grupo de ratas cíclicas, as concentrações são menores ($p<0,001$) (Figura 11A). A concentração P₄ foi constante no grupo de ratas cíclicas. Entretanto,

no grupo das ratas acíclicas as concentrações foram diminuindo ao longo do período ($p < 0,05$) (Figura 11B).

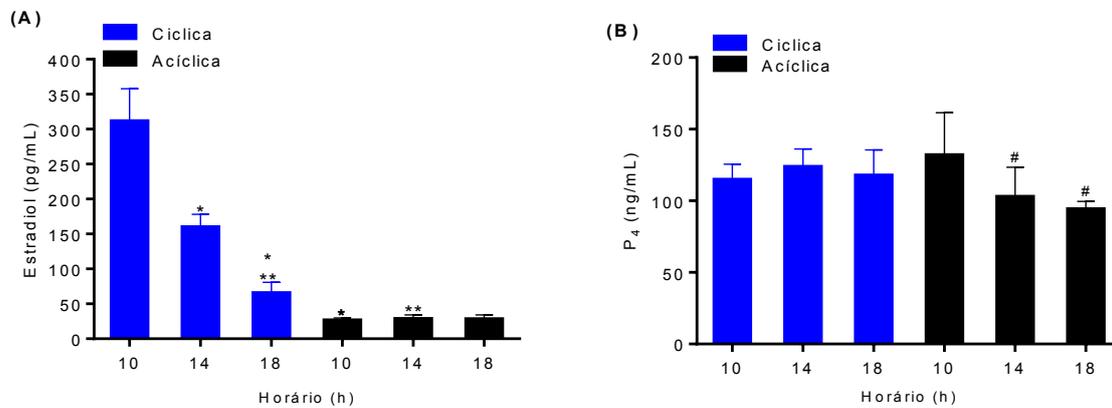


Figura 11 - Concentração plasmática de E2 (A) e P4 (B) de ratas cíclicas e acíclicas. As amostras sanguíneas foram colhidas as 10, 14 e 18 horas na fase do estro (cíclicas) e constante estro (acíclicas). Dados expressos por média \pm EPM, análise estatística por ANOVA two-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,001$ vs 10h/C; ** $p < 0,001$ vs 14h/C; # $p < 0,05$ vs 10h/A. (C= cíclica; A= Acíclica; n= 8 animais/horário).

3.3 Análise da atividade dos neurônios FRA no AVPV/POA de ratas cíclicas e acíclicas

Para análise dos neurônios FRA-ir do AVPV/POA foram considerados somente os neurônios imunorreativos dos *plates* correspondentes ao Bregma 0.00 mm e Bregma -0.12 mm, respectivamente *plates* 33 e 34. A Figura 12 apresenta o número de neurônios que expressaram FRA-ir em ratas cíclicas e acíclicas. Esta análise evidenciou número maior de neurônios FRA-ir em ratas acíclicas às 10 e 18 horas, quando comparado com 14 horas no mesmo grupo ($p < 0,05$) e com grupo cíclico ($p < 0,001$ vs 10 horas; $p < 0,05$ vs 18 horas). A fotomicrografia representativa do núcleo AVPV marcado FRA dos grupos cíclico na fase do estro e grupo acíclico em CE as 10, 14 e 18 horas esta apresentada na figura 13.

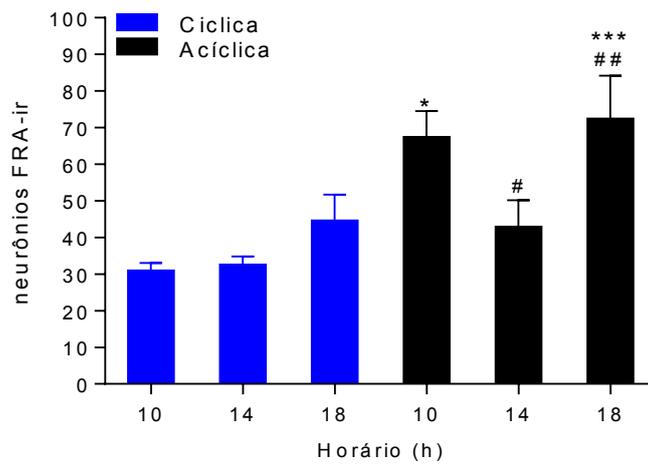


Figura 12 – Número de neurônios marcados por FRA no AVPV/APO em ratas cíclicas e acíclicas por imunohistoquímica. Dados expressos por média \pm EPM, análise estatística por ANOVA two-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs 10h/C; *** $p < 0,05$ vs 18h/C; # $p < 0,05$ vs 10h/A; ## $p < 0,05$ vs 14h/A. (C= cíclica; A= Acíclica; n= 8 animais/horário).

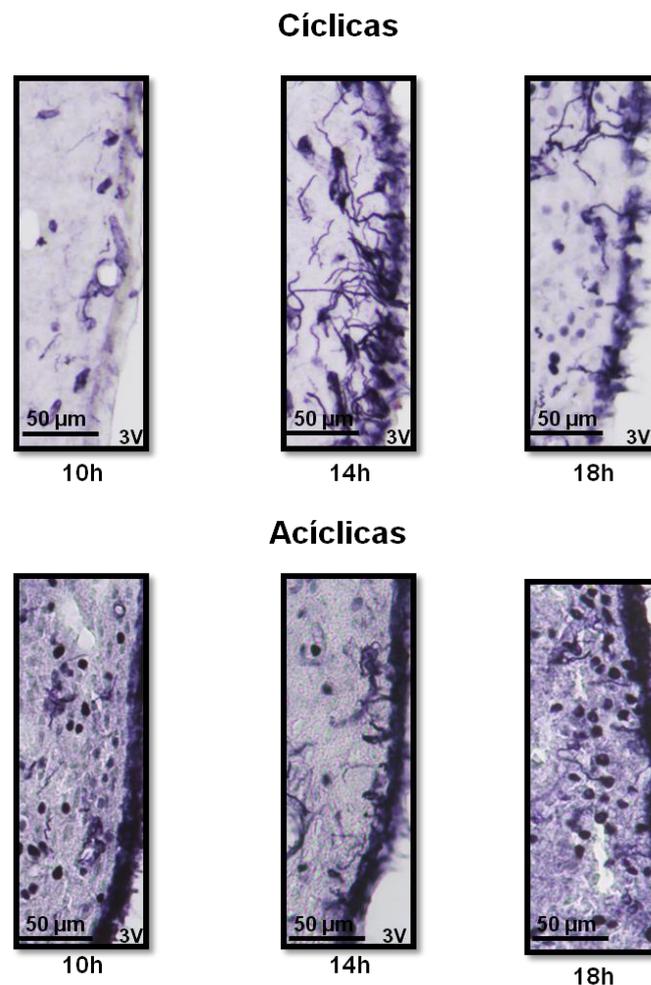


Figura 13 – Representação fotográfica da marcação para FRA no AVPV (*plate 33*) de ratas cíclicas e acíclicas. 3V: terceiro ventrículo. Barra de escala para AVPV = 50 μ m.

3.4 Análise da dosagem de noradrenalina e seu metabólito na APO de ratas cíclicas e acíclicas

O conteúdo armazenado de NA (Figura 14A) foi menor as 18 h no grupo de ratas cíclicas quando comparado com as 10h e 14h deste mesmo grupo ($p<0,05$). No grupo das ratas acíclicas o conteúdo de NA foi menor às 14h e 18h ($p<0,001$). A comparação do conteúdo de NA na APO nos grupos de ratas cíclicas e acíclicas evidenciou que nos horários das 14h ($p<0,001$) e 18h ($p<0,05$) o conteúdo foi menor no grupo de ratas acíclicas.

Os valores para o metabólito MHPG (Figura 14B) no grupo das ratas cíclicas diminuíram ao longo do período analisado, sendo às 10h a maior concentração comparando-se com às 14h ($p<0,05$) e 18h ($p<0,001$). No grupo de ratas acíclicas, a quantidade de NA liberada foi maior às 10h ($p<0,05$); quando comparado ratas cíclicas com acíclicas houve diferença no grupo das 18h ($p<0,05$).

A taxa de liberação noradrenérgica dada pela relação MHPG/NA (Figura 14C) no grupo das ratas cíclicas diminuiu ao longo do período analisado, sendo às 10h a maior concentração comparando-se com às 14h ($p<0,05$) e 18h ($p<0,001$), seguindo o padrão do metabólito (Figura 14B). No grupo de ratas acíclicas da taxa turnover MHPG/NA foi constante, comparado com as ratas cíclicas o turnover foi maior às 18h ($p<0,05$)

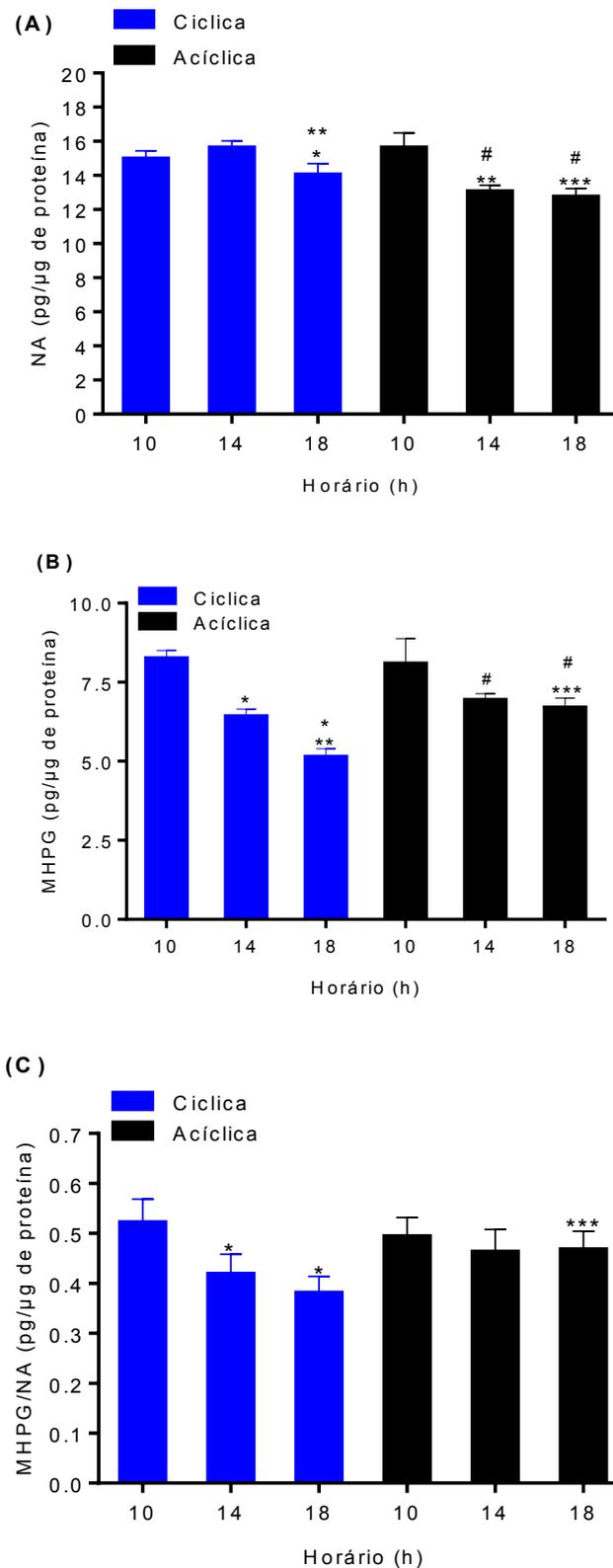


Figura 14 - Conteúdo de noradrenalina (NA) (A); seu metabólito (MHPG) (B) e o turnover MHPG/NA (C) na APO de ratas cíclicas e acíclicas. Dados expressos por média \pm EPM, análise estatística por ANOVA two-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * p <0,05 vs 10h/C; ** p <0,05 vs 14h/C; *** p <0,05 vs 18h/C; # p <0,001 vs 10h/A; (C= cíclica; A= Acíclica; n= 8 animais/horário).

Discussão

4. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado para investigar a atividade dos neurônios FRA-ir da APO, durante o período que iniciam as alterações no eixo HHG de fêmeas de roedores, para compreensão dos aspectos neurais envolvidos na aciclicidade e senescência reprodutiva. Nossos resultados mostraram maior ativação nos neurônios do AVPV/APO acompanhado por concentração maior de LH e menor de FSH.

Ratas adultas com ciclo estral regular e ratas senis com ciclos irregulares foram analisadas na mesma fase endócrina, isto é, no estro, algumas horas após ocorrência dos picos das gonadotrofinas e ovulação nas ratas cíclicas. A ocorrência da ciclicidade estral esta relacionada com ação intercalada, estimuladora-inibidora, dos esteróides gonadais sobre a secreção das gonadotrofinas (Barraclough *et al.*, 1971; Freeman, 1994; Herbison, 1998). Durante o período regular do ciclo estral, a fase do estro é caracterizada pela manutenção constante das concentrações plasmáticas de LH (Figura 10A) e de P_4 (Figura 11B). Entretanto, as concentrações plasmáticas de FSH (Figura 10B) e de E_2 (Figura 11A) diminuem ao longo dos horários analisados. Em consonância com as concentrações hormonais plasmáticas, verificamos que não há ativação significativa dos neurônios FRA no AVPV da APO e o conteúdo de NA bem como a quantidade de NA liberada, representada pelas concentrações de MHPG (Figura 14B), que diminuíram durante os períodos analisados no dia do estro. Estes resultados comprovam a interação no sistema HHG dos animais adultos e a manutenção da ciclicidade estral.

Entretanto, durante o envelhecimento das ratas foram constatadas as irregularidades nas fases do ciclo. É possível correlacionar a irregularidade e o CE das ratas, à fase -2 no período inicial para transição à menopausa em mulheres

(Harlow *et al.*, 2008). Estudo realizado por Gharib e colaboradores (1990) demonstrou que a ausência da retroalimentação dos esteroides gonadais está associada ao aumento na expressão da subunidade de gonadotrofina e no conteúdo de LH nos gonadotrofos de roedores. Quando analisamos as características das ratas em CE, verificamos concentração plasmática menor e constante de E₂ e maior de LH em relação às ratas cíclicas. Considerando o LH como marcador para GnRH e que sua secreção é controlada por GnRH isoladamente (Hall *et al.*, 1994), nossos resultados inferem secreção maior do GnRH nas ratas acíclicas. Além disso, outros estudos evidenciaram que o aumento progressivo de GnRH endógeno secretado está associado com envelhecimento (Gill *et al.*, 2002; Gore, Windsor-Engnell e Terasawa, 2004).

A secreção de GnRH durante o período reprodutivo dos roedores esta associado a atividade de neurônios do AVPV/APO (MohanKumar, MohanKumar e Quadri, 1997; Helena *et al.*, 2006; Szawka *et al.*, 2013). Os neurônios da AVPV contem ER_α, ER_β, PR_α e PR_β (Wintermantel *et al.*, 2006) e expressam c-Fos sincronicamente com os neurônios GnRH na ocorrência do pico de LH (Le *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 1999; Wintermantel *et al.*, 2006). Neste estudo verificamos que a ativação *fos* dos neurônios do AVPV/APO das ratas acíclicas em CE é maior (Figura 12) e ocorre em sincronia com a secreção plasmática de LH (Figura 10A). Essa atividade neuronal está demonstrada por marcação FRA em imunohistoquímica (Figura 13).

A média do neurotransmissor liberado (MHPG/NA: 0,47) e da concentração plasmática de LH (0,50) são semelhantes nas ratas em CE. É possível verificar que as ratas apresentam sincronia entre a liberação de noradrenalina (Figura 14B), secreção de LH (Figura 10A) e ativação *fos* no AVPV/APO (Figura 12), entretanto,

em período diferente ao que ocorre no ciclo estral regular, caracterizando então o início do período de alteração na ritmicidade para ocorrência do ciclo estral. Há evidências da ação direta da NA, mediado por receptores $\alpha 1$ e β -adrenérgicos, bem como pela ação indireta da liberação de NA em neurônios GnRH (Herbison, Heavens e Dyer, 1990; Simonian e Herbison, 1997; Hosny e Jennes, 1998; Martins-Afféri *et al.*, 2003; Helena *et al.*, 2006; Liu e Herbison, 2013; Szawka *et al.*, 2013). Isso nos faz inferir que nas ratas, no início da periostropausa, os núcleos hipotalâmicos continuam enviando informações através de neurotransmissores aos neurônios GnRH, com conseqüente liberação de LH. Entretanto, a menor síntese do neurotransmissor e quantidade maior deste sendo liberada, causa alteração na seqüência de ativação-inibição dos hormônios do eixo HHG, refletindo nas baixas concentrações de E₂. A falta de sincronia dos hormônios gonadais e hormônios hipofisários, nos sinalizam que as baixas concentrações de E₂ impossibilita a retroalimentação negativa ao LH, mantendo sua concentração plasmática alta.

Ao contrario do LH, as concentrações do FSH (Figura 8B) não se mantém alta juntamente com atividade *fos* dos neurônios da APO. Estudos com ratas jovens em que lesão eletrolítica foi realizada no núcleo noradrenérgico do LC proporcionou maior diminuição na secreção de FSH que LH; entretanto, em ratas castradas a lesão induziu diminuição de LH e não alterou secreção de FSH (Anselmo-Franci *et al.*, 1997; Martins-Afféri *et al.*, 2003). Em nosso estudo, nas ratas senis e em CE, a concentração plasmática de FSH é menor que a das ratas adultas. Entretanto, é possível verificar sincronia na liberação do hormônio FSH com a atividade dos neurônios do AVPV/APO (Figura 12), corroborando com os estudos realizados pelo grupo de Anselmo-Franci (1997; 2003), evidenciando interação da atividade neuronal e secreção de FSH. Possivelmente, a maior secreção de inibina (Jih e

Wu, 1995), associado a menor secreção de FSH não estimula crescimento folicular e resulta nas baixas concentrações de E₂ (Figura 11A). Além das concentrações plasmáticas menores do E₂, a secreção do esteróide é constante nestas ratas, resultando em alterações na sincronia reguladora que determina a ocorrência da retroalimentação negativa e positiva dos esteróides gonadais (Knobil, 1992; Freeman, 1994; Klein *et al.*, 1996).

A produção de NA é semelhante à secreção plasmática de P₄ (Figuras 14A e 10B). A liberação de NA (MHPG Figura 14B) nas ratas em CE é constante, assim como as concentrações plasmáticas de E₂ (Figura 10A). A NA exerce influência direta nos neurônios GnRH, estimulando a liberação do próprio GnRH e conseqüentemente das gonadotrofinas, influenciando também as concentrações plasmáticas dos esteroides. Estudos evidenciaram que a ativação neuronal, bem como síntese e liberação de neurotransmissores estão sincronizados com a ocorrência do ciclo estral regular (Martins-Afféri *et al.*, 2003; Helena *et al.*, 2006; Liu e Herbison, 2013; Szawka *et al.*, 2013). Desta forma, a irregularidade nessa síntese e liberação exerce influências na determinação da aciclicidade no ciclo reprodutivo em fêmeas.

Portanto, os resultados obtidos demonstram maior atividade dos neurônios AVPV/APO acompanhado por liberação maior de NA durante o envelhecimento de ratas Wistar. É possível verificar dissociação na secreção das gonadotrofinas, pois a secreção de LH é maior e de FSH é menor neste período quando comparamos com as ratas adultas. Além disso, a concentração plasmática de P₄ parece ser suficiente para retroalimentação positiva aos núcleos hipotalâmicos e a hipófise, porém a baixa concentração de E₂ impossibilita a regularidade do ciclo no eixo HHG. Essa concentração de E₂ está relacionada com a secreção insuficiente do FSH e o não

estímulo ao crescimento dos folículos. Destacamos também que a sinalização favorável na concentração plasmática de LH para a maturação folicular ocorre em período diferente a do ciclo estral regular. Este conjunto de resultados caracteriza o início da senescência reprodutiva nestes animais.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Deste modo, podemos concluir que alterações neurais, como aumento na liberação de NA e atividade do AVPV/APO, determina a ocorrência da irregularidade dos ciclos. Alterações no padrão temporal da sinalização neuroendócrina e o comprometimento na precisão destes eventos impossibilita a regularidade do ciclo reprodutivo e caracteriza o período de peri menopausa.

6. REFERÊNCIAS

Ahmed Ebbiary, N. A.; Lenton, E. A.; Cooke, I. D. Hypothalamic-pituitary ageing: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 41, n. 2, p. 199-206, Aug 1994. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923824> >.

ANDRADE RP. **Falência ovariana precoce**. *Reprod Clim.* 2001;16:14-18

Anselmo-Franci, J. A. et al. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. **Brain Res**, v. 767, n. 2, p. 289-96, Sep 1997. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9367260> >.

Arias, P. et al. Effects of aging on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced GnRH and LH release in female rats. **Brain Res**, v. 740, n. 1-2, p. 234-8, Nov 1996. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973819> >.

Barraclough, C. A. et al. Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progesterin concentrations in the rat: effects of Nembutal and exogenous gonadotropins. **Endocrinology**, v. 88, n. 6, p. 1437-47, Jun 1971. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5103157> >.

Burger, H. G. The endocrinology of the menopause. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 69, n. 1-6, p. 31-5, 1999 Apr-Jun 1999. ISSN 0960-0760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418978> >.

Campos, P.; Herbison, A. E. Optogenetic activation of GnRH neurons reveals minimal requirements for pulsatile luteinizing hormone secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 51, p. 18387-92, Dec 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489105> >.

Field, E. A.; Kuhn, C. M. Opiate antagonist treatment reinstates estrous cycles in middle-aged persistent-estrous rats. **Biol Reprod**, v. 40, n. 4, p. 714-9, Apr 1989. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2752072> >.

Finch, C. E. The menopause and aging, a comparative perspective. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 142, p. 132-41, Jul 2014. ISSN 1879-1220. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583565> >.

Freeman, M. E. **The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat.** In: **Knobil, E. & Neill.** 1994. p.613-658.

FREEMAN, M. E. **Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat.** Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition edited by Jimmy D. Neill, Elsevier © 2006

Gieske, M. C. et al. Pituitary gonadotroph estrogen receptor-alpha is necessary for fertility in females. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 20-7, Jan 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947360> >.

Gill, S. et al. Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 2290-6, May 2002. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994378> >.

Gore, A. C. Gonadotropin-releasing hormone neurons, NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 37, n. 1-3, p. 235-48, Nov 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744089> >.

_____. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: gene expression and neuroanatomical studies. **Prog Brain Res**, v. 141, p. 193-208, 2002. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508571> >.

Gore, A. C. et al. Neuroendocrine mechanisms for reproductive senescence in the female rat: gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrine**, v. 13, n. 3, p. 315-23, Dec 2000. ISSN 1355-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11216643> >.

Gore, A. C.; Roberts, J. L. Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 889-96, Mar 1995. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867597> >.

Gore, A. C.; Windsor-Engnell, B. M.; Terasawa, E. Menopausal increases in pulsatile gonadotropin-releasing hormone release in a nonhuman primate (*Macaca mulatta*). **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4653-9, Oct 2004. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231708> >.

Hall, J. E. et al. Decrease in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency with aging in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n.

5, p. 1794-800, May 2000. ISSN 0021-972X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843154> >.

_____. Decreased release of gonadotropin-releasing hormone during the preovulatory midcycle luteinizing hormone surge in normal women. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 15, p. 6894-8, Jul 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8041716> >.

Harlow, S. D. et al. The ReSTAGE Collaboration: defining optimal bleeding criteria for onset of early menopausal transition. **Fertil Steril**, v. 89, n. 1, p. 129-40, Jan 2008. ISSN 1556-5653. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681300> >.

Heape, W. On Menstruation and Ovulation in Monkeys and in the Human Female. **Br Med J**, v. 2, n. 1982, p. 1868-9, Dec 1898. ISSN 0007-1447. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20758216> >.

Helena, C. V. et al. Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. **J Endocrinol**, v. 188, n. 2, p. 155-65, Feb 2006. ISSN 0022-0795. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461543> >.

Herbison, A. E. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. **Rev Reprod**, v. 2, n. 1, p. 1-6, Jan 1997. ISSN 1359-6004. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414459> >.

_____. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 302-30, Jun 1998. ISSN 0163-769X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626556> >.

Herbison, A. E.; Heavens, R. P.; Dyer, R. G. Oestrogen modulation of excitatory A1 noradrenergic input to rat medial preoptic gamma aminobutyric acid neurones demonstrated by microdialysis. **Neuroendocrinology**, v. 52, n. 2, p. 161-8, Aug 1990. ISSN 0028-3835. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2125704> >.

Hosny, S.; Jennes, L. Identification of alpha1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurones of the female rat. **J Neuroendocrinol**, v. 10, n. 9, p. 687-92, Sep 1998. ISSN 0953-8194. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744486> >.

Huang, H. H.; Meites, J. Reproductive capacity of aging female rats. **Neuroendocrinology**, v. 17, n. 4, p. 289-95, 1975. ISSN 0028-3835. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170518> >.

Hwang, C. et al. Age-related differences in the release of luteinizing hormone and gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 52, n. 2, p. 127-32, Aug 1990. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2125700> >.

Jih, M. H.; Wu, T. C. Altered regulation of pituitary luteinizing hormone secretion by GnRH and inhibin in the aged persistent-estrous female rat. **Mech Ageing Dev**, v. 84, n. 1, p. 15-27, Sep 1995. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719774> >.

Klein, N. A. et al. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 7, p. 2742-5, Jul 1996. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675606> >.

Knobil, E. Remembrance: the discovery of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator and of its physiological significance. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1005-6, Sep 1992. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1505445> >.

Le, W. W. et al. Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 510-9, Jan 1999. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886864> >.

_____. Parallel declines in Fos activation of the medial anteroventral periventricular nucleus and LHRH neurons in middle-aged rats. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4976-82, Nov 2001. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606466> >.

LeFevre, J.; McClintock, M. K. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. **Biol Reprod**, v. 38, n. 4, p. 780-9, May 1988. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3401536> >.

Lenton, E. A. et al. Inhibin concentrations throughout the menstrual cycles of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 73, n. 6, p. 1180-90, Dec 1991. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1955499> >.

Lima, F. B. et al. Estrogen, but not progesterone, induces the activity of nitric oxide synthase within the medial preoptic area in female rats. **Brain Res**, v. 1578, p. 23-9,

Aug 2014. ISSN 1872-6240. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044408> >.

Liu, X.; Herbison, A. E. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 340-50, Jan 2013. ISSN 1945-7170. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239814> >.

Lloyd, J. M.; Hoffman, G. E.; Wise, P. M. Decline in immediate early gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during proestrus in regularly cycling, middle-aged rats. **Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 1800-5, Apr 1994. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137745> >.

LONG, J.A., EVANS, H.M. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley: Univ. of California Press;1922.

Lu, K. H. et al. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. **Biol Reprod**, v. 21, n. 1, p. 193-203, Aug 1979. ISSN 0006-3363. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/573635> >.

MacNaughton, J. et al. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 36, n. 4, p. 339-45, Apr 1992. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1424166> >.

MANDL, A. M.; ZUCKERMAN, S. The relation of age to numbers of oocytes. **J Endocrinol**, v. 7, n. 2, p. 190-3, Jun 1951. ISSN 0022-0795. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14850606> >.

Martins-Afféri, M. P. et al. LHRH release depends on Locus Coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. **Brain Res Bull**, v. 61, n. 5, p. 521-7, Sep 2003. ISSN 0361-9230. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679251> >.

Matsuda, F. et al. The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. **J Neuroendocrinol**, v. 27, n. 1, p. 57-65, Jan 2015. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367275> >.

Matt, D. W. et al. Characteristics of luteinizing hormone secretion in younger versus older premenopausal women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 178, n. 3, p. 504-10, Mar

1998. ISSN 0002-9378. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539517> >.

_____. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. **Biol Reprod**, v. 34, n. 3, p. 478-87, Apr 1986. ISSN 0006-3363. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3697463> >.

MohanKumar, P. S.; MohanKumar, S. M.; Quadri, S. K. Deprenyl stimulates the release of luteinizing hormone from the pituitary in vitro. **Life Sci**, v. 61, n. 18, p. 1783-8, 1997. ISSN 0024-3205. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9365225> >.

Ottinger, M. A. Mechanisms of reproductive aging: conserved mechanisms and environmental factors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1204, p. 73-81, Aug 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738277> >.

Paganini-Hill, A.; Henderson, V. W. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. **Am J Epidemiol**, v. 140, n. 3, p. 256-61, Aug 1994. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8030628> >.

Paxinos, G.; Watson, C. R.; Emsen, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **J Neurosci Methods**, v. 3, n. 2, p. 129-49, Dec 1980. ISSN 0165-0270. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6110810> >.

Rance, N. E.; Uswandi, S. V. Gonadotropin-releasing hormone gene expression is increased in the medial basal hypothalamus of postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 10, p. 3540-6, Oct 1996. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8855798> >.

Rehman, H. U.; Masson, E. A. Neuroendocrinology of female aging. **Gend Med**, v. 2, n. 1, p. 41-56, Mar 2005. ISSN 1550-8579. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115597> >.

Richardson, S. J.; Senikas, V.; Nelson, J. F. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 65, n. 6, p. 1231-7, Dec 1987. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3119654> >.

Rubin, B. S.; Lee, C. E.; King, J. C. A reduced proportion of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons express Fos protein during the preovulatory or steroid-induced LH surge in middle-aged rats. **Biol Reprod**, v. 51, n. 6, p. 1264-72, Dec

1994. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7888504> >.

Santoro, N. et al. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 4, p. 1495-501, Apr 1996. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636357> >.

Santoro, N.; Randolph, J. F. Reproductive hormones and the menopause transition. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 38, n. 3, p. 455-66, Sep 2011. ISSN 1558-0474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961713> >.

Shaw, N. D. et al. Differential effects of aging on estrogen negative and positive feedback. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 2, p. E351-5, Aug 2011. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558550> >.

Sherwin, B. B. Estrogenic effects on memory in women. **Ann N Y Acad Sci**, v. 743, p. 213-30; discussion 230-1, Nov 1994. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7802415> >.

_____. Hormones, mood, and cognitive functioning in postmenopausal women. **Obstet Gynecol**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 20S-26S, Feb 1996. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8559550> >.

Simonian, S. X.; Herbison, A. E. Differential expression of estrogen receptor and neuropeptide Y by brainstem A1 and A2 noradrenaline neurons. **Neuroscience**, v. 76, n. 2, p. 517-29, Jan 1997. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015335> >.

Steger, R. W. et al. Changes in control of gonadotropin secretion in the transition period between regular cycles and constant estrus in aging female rats. **Biol Reprod**, v. 22, n. 3, p. 595-603, Apr 1980. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6770920> >.

Sullivan, J. M.; Fowlkes, L. P. The clinical aspects of estrogen and the cardiovascular system. **Obstet Gynecol**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 36S-43S, Feb 1996. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8559552> >.

Szawka, R. E. et al. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 363-74, Jan 2013. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150494> >.

_____. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. **J Neuroendocrinol**, v. 21, n. 7, p. 629-39, Jul 2009. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490365> >.

Temel, S. et al. Expression of estrogen receptor-alpha and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3974-83, Oct 2002. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239109> >.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, **Population Division: World Population Prospects: The 2012 Revision**. New York, 2013

Wang, Y. et al. Age affects spontaneous activity and depolarizing afterpotentials in isolated gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 4938-47, Oct 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18583421> >.

Wild, R. A. Estrogen: effects on the cardiovascular tree. **Obstet Gynecol**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 27S-35S, Feb 1996. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8559551> >.

Wintermantel, T. M. et al. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. **Neuron**, v. 52, n. 2, p. 271-80, Oct 2006. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046690> >.

Wise, P. M. Alterations in proestrous LH, FSH, and prolactin surges in middle-aged rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 169, n. 3, p. 348-54, Mar 1982. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801673> >.

Wise, P. M. et al. Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 243-8, Jun 1999. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368769> >.

Wright, D. E.; Jennes, L. Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-containing areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. **Brain Res**, v. 621, n. 2, p. 272-8, Sep 1993. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694764> >.

Xue, H. et al. Morphological changes of gonadotropin-releasing hormone neurons in the rat preoptic area across puberty. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 13, p. 1303-12, Jul

2014. ISSN 1673-5374. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221583> >.

Yin, W.; Gore, A. C. Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 403-14, Mar 2006. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16514184> >.

_____. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1204, p. 113-22, Aug 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738281> >.

Zhang, G. et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 211-6, May 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636330> >.

ANEXO A

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - UNESP



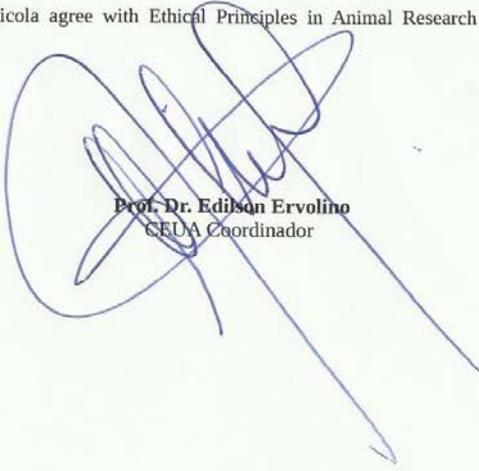
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**Atividade dos neurônios noradrenérgicos do *Locus Coeruleus* no envelhecimento reprodutivo de ratas**” sob responsabilidade do Pesquisador **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** e colaboração de Larissa Brazolotto Ferreira e Angela Cristina de Nicola está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo **2013-01018**.

CERTIFICATE

We certify that the research “**Noradrenergic neurons activity of *Locus Coeruleus* in aging reproductive in female rats**”, protocol number **2013-01018**, under responsibility of **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** and with collaboration of Larissa Brazolotto Ferreira and Angela Cristina de Nicola agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edison Ervolino
CEUA Coordenador