

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

ANGELA CRISTINA DE NICOLA

**ATUAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO RELÓGIO NA SENESCÊNCIA REPRODUTIVA
DE RATAS WISTAR**

ARAÇATUBA

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

ATUAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO RELÓGIO NA SENESCÊNCIA REPRODUTIVA
DE RATAS WISTAR

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Angela Cristina de Nicola

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

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Maristela de Oliveira Poletini

ARAÇATUBA

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N634a Nicola, Angela Cristina de.
Atuação das proteínas do relógio na senescência reprodutiva de ratas Wistar / Angela Cristina de Nicola. – Araçatuba, 2017
114 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles
Coorientadora: Profa. Maristela de Oliveira Poletini

1. Núcleo supraquiasmático 2. Envelhecimento 3. Ritmo circadiano 4. Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas 5. Clock genes I. T.

CDD 612

Angela Cristina de Nicola

Atuação das proteínas do relógio na senescência reprodutiva de ratas Wistar

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

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

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Maristela de Oliveira Poletini

Sessão Pública: 12/12/2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles – UNESP - Araçatuba

Prof. Dr. Maristela de Oliveira Poletini – UFMG

Prof. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Luciana Pinato

Instituição: Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília – FFCM/UNESP

Prof. Dr. Rovená Clara Galvão Januário Engelberth

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Prof. Dr. Cristiane Mota Leite

Instituição: Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Nascimento: 12.11.1983, Birigui - SP

Filiação: Vitor de Nicola

Eurides Garbuio de Nicola

2003/2006: Curso de Graduação em Licenciatura para Ciências Biológicas Fundação Educacional de Penápolis – FUNEPE – Penápolis – SP.

2008/2010: Curso de Pós-Graduação *Latu-Sensu* em Planejamento Ambiental - Fundação Educacional de Penápolis – FUNEPE – Penápolis – SP.

2011/2013: 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.

2013/2017: Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

A Deus, pelo dom concedido

A minha família, pelo apoio incansável

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Titular Wilson Roberto Poi pelo apoio.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio à pesquisa.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio financeiro durante as viagens para realização de disciplinas.

A todos os funcionários da UNESP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios de realização desta pesquisa.

Ao Prof^o Emérito da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Dr^o José Antunes Rodrigues, pela acolhida e valiosa colaboração de seu laboratório.

Ao Prof. Dr^o João César Bedran de Castro pelos pareceres semestrais emitidos nos relatórios.

À Prof^a Dr^a Maristela de Oliveira Poletini pela co-orientação.

A todos os professores do Departamento de Ciências Básicas.

Aos novos amigos do laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina da USP/Ribeirão Preto, sob a direção dos Professores Dr José Antunes Rodrigues e Dr^a Lucila Leico Kagohara Elias.

Às técnicas Maria Valci Aparecida dos Santos, Milene Mantovani Mata e Marina Holanda pelo suporte.

À Dr^a Tatiane Vilhena Franco (FMRP/USP) por toda ajuda na realização das imunohistoquímicas.

À Dr^a Cristiane Mota Leite pelo empréstimo das sondas de qPCR para realização de testes do gene para Kiss1, Kiss1-r, AVPR1a

À Dr^a Gloria Hoffman (Morgan State University/Baltimore/USA) por todos esclarecimentos e orientações prestados via email.

Ao Prof^o Celso Rodrigues Franci pela gentil dosagem hormonal realizada.

Aos meus antigos e recém-chegados amigos de laboratório, pela companhia de todas as horas.

Ao técnico Fauze Ribas de Toledo, que prestou valorosa contribuição na confecção do sistema de iluminação utilizado durante os experimentos do período noturno.

À Professora Dr^a Margaret de Castro da divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, que gentilmente cedeu alíquota de sonda para nossos testes de qPCR.

Ao Professor Dr. Eduardo Santos da UFMG pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas sobre as análises circadianas.

Aos meus amigos Leandro dos Santos Figueiredo, Sabrina Tristão e Susana Quiros Cognuck por sempre cederem um espaço em suas casas para que eu me hospedasse durante a realização dos experimentos no departamento de Fisiologia da FMRP/USP

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte das novas descobertas aqui relatadas.

Ao meu eterno companheiro, hoje marido, Dennis, que incondicionalmente soube compreender minhas ausências e incansavelmente apoiou-me nesta caminhada.

A meus pais, por seus impagáveis incentivos e socorro diante dos obstáculos encontrados.

As minhas “pequenas”, por cederem suas vidas em *prol* de novas descobertas científicas.

A minha orientadora Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles, que desde o mestrado deu-me a oportunidade de tê-la como minha dirigente na busca pelo conhecimento científico, cuja confiança no bom desenvolvimento da pesquisa a mim confiada, o apoio diante dos desafios e o cuidado, que como orientadora, sempre dispendeu para a boa formação acadêmica de seus alunos.

À Dr^a Maristela de Oliveira Poletini (UFMG/MG), que prontamente aceitou nosso convite de co-orientação deste trabalho.

A **DEUS** principalmente, que me proporcionou chegar até aqui, tornando-me capaz de realizar um bom trabalho e proveu-me de espírito investigativo em busca do conhecimento que move um cientista.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

NICOLA, AC. Atuação das proteínas do relógio na senescência reprodutiva de fêmeas *Wistar*. 2017. 114f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

O envelhecimento é considerado processo multidimensional no qual fatores ambientais podem proteger ou, inversamente, agravar seus sinais, de maneira não linear, nos processos fisiológicos e neurocomportamentais. Durante este processo, os ritmos circadianos são interrompidos ou fragmentados com dissociação consequente dos ritmos circadianos do indivíduo e disfunções relacionadas ao relógio circadiano contribuem para o envelhecimento e para patologias a ele relacionadas. O objetivo deste estudo foi averiguar possível alteração temporal do sistema *CLOCK* no eixo HPG e a relação com às alterações hormonais que caracterizam a periostropausa. Foram utilizadas fêmeas adultas com ciclo estral regular (CD) na fase do diestro e fêmeas senis com ciclo estral irregular e persistência da fase do diestro (IDP). Para análises de expressão gênica dos *clock* genes *Per2*, *Rev-erba* e *Bmal1* no eixo HPG, foram utilizados *punchs* das regiões do NSQ, onde também foi analisado RNAm de AVP, APO e HMB destes animais, além da adenohipófise e ovários dos quais se extraiu o RNA para confecção do cDNA e realização de qPCR. A determinação da atividade neuronal vasopressinérgica no NSQ foi realizada por imunistoquímica com dupla marcação para cFos e AVP em tecido previamente fixado com paraformaldeído. A concentração plasmática de gonadotrofinas foi determinada por radioimunoensaio. De modo geral, os animais IDP revelaram alterações no perfil de expressão gênica durante o fotoperíodo, com redução de amplitude, deslocamento/desalinhamento de fase e ausência de antifase. O NSQ de animais IDP apresentou menor expressão de *Rev-erba* e maior expressão de RNAm para AVP em relação ao grupo CD. A quantificação relativa de *Bmal1* foi semelhante em ambos os grupos e não houve diferenças entre grupos na expressão de *Per2*. Na APO, animais IDP apresentaram maior expressão de *Per2* e menor quantidade de RNAm para *Rev-erba*. No HMB observou-se menor expressão para *Per2* e *Rev-erba* e maior expressão de *Bmal1* nas fêmeas IDP. *Per2* e *Bmal1* na adenohipófise tiveram menor expressão que o gene *Rev-erba* no grupo senil e o ovário destes animais revelou maior expressão para *Per2* e *Rev-erba*, em comparação com os animais CD. As concentrações plasmáticas de FSH foram maiores nas fêmeas com ciclo irregular ($2,05 \pm 0,44$ ng/mL), principalmente durante a fase clara, assim como o LH ($0,24 \pm 0,07$ ng/mL), cujos maiores valores foram encontrados durante a fase escura e com perfil semelhante ao RNAm de AVP. As imunomarcações revelaram alta atividade vasopressinérgica na porção dorsomedial do NSQ das fêmeas IDP.

Juntos estes dados permitem concluir que há desarranjo na expressão temporal dos genes *Per2*, *Rev-erba*, *Bmal1* que compõem a maquinaria molecular do relógio circadiano, bem como de RNAm para AVP no NSQ, de fêmeas *Wistar* na periostropausa. Além disso, a maior atividade neuronal vasopressinérgica e a ausência de oscilação de *Rev-erba* e *Bmal1* no NSQ destes animais, comprometem a correta comunicação do relógio central do NSQ com o eixo HPG, inviabilizando a manutenção da fertilidade feminina e contribuindo para a senescência reprodutiva.

PALAVRAS-CHAVE: Envelhecimento reprodutivo, Clock genes, Vasopressina, Ritmo circadiano, Eixo HPG

ABSTRACT

NICOLA, AC. Clock protein action in the senescence reproductive of female *Wistar* rats. 2017. 114f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Aging is considered a multidimensional process in which environmental factors can protect or, conversely, aggravate its signals, non-linearly, in physiological and neurobehavioral processes. During this process, circadian rhythms are disrupted or fragmented with consequent dissociation of the individual's circadian rhythms and circadian clock-related dysfunctions contribute to aging and related pathologies. The objective of this study was to investigate possible temporal alteration of the CLOCK system in the HPG axis and the relation with the hormonal changes that characterize peri-estropause. Adult females with regular estrus cycle in the diestrous phase (RD) and old females with irregular estrous cycle and persistent diestrous phase (IPD). For analyzes of the gene expression of the genes *Per2*, *Rev-erba* and *Bmall* in the HPG axis, punches from the NSQ regions were used, where AVP, POA and MBH RNAm from these animals were also analyzed, as well as the adenohipophysis and ovaries from which they were extracted the RNA for cDNA production and qPCR performance. The determination of the vasopressinergic neuronal activity in the NSQ was performed by immunohistochemical with double labeling for cFos/AVP in tissue previously fixed with paraformaldehyde. The plasma concentration of gonadotrophins was determined by radioimmunoassay. In general, the IPD animals show alterations in the gene expression profile during the period analyzed, with amplitude reduction, phase shift / misalignment and absence of antiphase. The NSQ of IPD animals presented lower expression of *Rev-erba* and higher RNAm expression for *AVP* than RD group. The relative quantification of *Bmall* was similar in both groups and there were no differences between groups in the expression of *Per2*. In PAO, IPD animals showed higher expression of *Per2* and less amount of RNAm for *Rev-erba*. MBH showed lower expression for *Per2* and *Rev-erba* and higher *Bmall* expression in IPD females. *Per2* and *Bmall* in the adenohipophysis had lower expression than the *Rev-erba* gene in the old group and the ovary of these animals showed higher expression for *Per2* and *Rev-erba*, in related to to the RD animals. Plasma concentrations of FSH were higher in females with irregular cycle (2.05 ± 0.44 ng / mL), mainly during the light phase, as well as LH (0.24 ± 0.07 ng / mL) whose values were found during the dark phase and with a profile similar to *AVP* RNAm. Immunolabeling demonstrated high vasopressinergic activity in the dorsomedial portion of the NSQ of the IPD females.

Together these data allow us to conclude that there is a breakdown in the temporal expression of the *Per2*, *Rev-erba*, *Bmall* genes that make up the molecular machinery of the circadian clock, as well as RNAm for *AVP* in NSQ of *Wistar* females in peri-masterpause. In addition, the increased vasopressinergic neuronal activity and the absence of *Rev-erba* and *Bmall* oscillation in the NSQ of these animals compromise the correct communication of the central clock of the NSQ with the HPG axis, making it impossible to maintain female fertility and contributing to reproductive senescence.

KEY WORDS: Reproductive aging, Clock genes, Vasopressin, Circadian rhythm, HPG axis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da localização anatômica do núcleo supraquiasmático e de suas subdivisões conforme neurotransmissores liberados.

Figura 2 - Representação esquemática do funcionamento do relógio molecular em mamíferos.

Figura 3 - Coleta do lavado vaginal e visão microscópica do lavado vaginal nas diferentes fases do ciclo estral em fêmeas com ciclo regular e irregular com persistência o diestro.

Figura 4 - Delineamento experimental do estudo.

Figura 5 - Diagrama esquemático de cortes coronais representando as localizações dos punches da APO, NSQ e HMB.

Figura 6 - Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR no NSQ realizadas a partir de *pool* de amostras dos grupos experimentais.

Figura 7 - Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR na APO realizadas a partir de *pool* de amostras dos grupos experimentais.

Figura 8 - Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR no HMB realizadas a partir de *pool* de amostras dos grupos experimentais.

Figura 9 - Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR na adenohipófise realizadas a partir de *pool* de amostras dos grupos experimentais.

Figura 10 - Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR no ovário realizadas a partir de *pool* de amostras dos grupos experimentais.

Figura 11 – Secções médio-caudais do NSQ consideradas em todos os grupos experimentais para a contagem de neurônios vasopressinérgicos imunorrativos para cFos.

Figura 12 - Oscilações na expressão relativa de Per 2, Rev-erb α , Bmal1 e AVP no NSQ.

Figura 13 - Oscilações na expressão relativa de Per 2, Rev-erb α e Bmal1 na APO.

Figura 14 - Oscilações na expressão relativa de Per 2, Rev-erb α e Bmal1 no HMB.

Figura 15 - Oscilações na expressão relativa de Per 2, Rev-erb α e Bmal1 na adenohipófise.

Figura 16 - Oscilações na expressão relativa de Per 2, Rev-erb α e Bmal1 no ovário.

Figura 17 – Perfil hormonal de gonadotrofinas plasmáticas ao longo de 24h.

Figura 18 – Atividade de neurônios vasopressinérgicos imunorreativos para cFos no NSQ ao longo de 24h.

Figura 19 – Fotomicrografias de neurônios vasopressinérgicos da porção dorsomedial do NSQ imunorreativos para cFos em ratas ciclando em diestro e ratas com ciclo irregular em diestro persistente

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Sequências e concentrações dos *primers* utilizados e número de acesso do gene

LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento

$\Delta\Delta Ct$ – delta delta Ct

°C – grau Celsius

μL – microlitro

μm – Micrômetro

3V – terceiro ventrículo

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – análise de variância

APO – área pré-óptica

APO-AH - área pré-óptica anterior

APOm – área pré-óptica medial

APOr – área pré-óptica rostral

ARC – núcleo arqueado

ARNTL – gene Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1

AVP – arginina-vasopressina

AVPe – núcleo anteroventral periventricular

Bmal1 – gene brain and muscle arnt-like protein 1

BMAL1 – proteína brain and muscle arnt-like protein 1

BSA – albumina sérica bovina

CCGs – genes controlados pelos genes do relógio

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA – comitê de ética no uso animal

cFos – proteína cFos integrante da grande família Fos de fatores de transcrição

CGs- células da granulosa

CK1 ϵ – caseína quinase 1 epsilon

CLOCK - proteína circadian locomotor output cycles kaput

Clock – gene Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

Clock Δ 19 – deleção no éxon 19 do gene *Clock*

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

Cry 1 e 2 – gene cryptochrome 1 e 2

Ct – threshold cycle

DAB – diaminobenzidina 3,3'

DBT – proteína Doubletime

DHEA – deidroepiandrosterona

DM – porção dorsomedial

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxinucleotídeo trifosfatos

E-box - *enhancer box*

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

Eff% - taxa de eficiência de amplificação

ER – receptor de estrógeno

FSH – hormônio folículo estimulante

GABA – ácido gama-aminobutírico

GH – hormônio do crescimento

Glu – glutamato

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

h – hora

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H3 – histona 3

H3K27me – histona 3 metilada na lisina 27

H3K4me3 – histona 3 trimetilada na lisina 4

H3K9ac – histona 3 acetilada na lisina 9

H3K9me - histona 3 metilada na lisina 9

H4 – histona 4

H4K16 – histona 4 desacetilada na lisina 16

HCl – ácido clorídrico

HDAC – histona desacetilase

HDM – hipotálamo dorsomedial

HMB – hipotálamo médio basal

HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal

HPG – hipotálamo-hipófise-gônadas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

ip - intraperitoneal

Kg – quilograma

Kiss- proteína kisspeptina codificada pelo gene *Kiss1*

LED - light emitting diode ou diodo emissor de luz

LH – hormônio luteinizante

M – molar

mg – miligrama

mg/Kg – miligramas/quilogramas

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetros

n – número amostral

ng – nanogramas

ng/mL – nanograma/mililitro

NiSO₄ – sulfato de níquel

nm – nanômetros

nM – nanomolar

NPAS - neuronal PAS 1

NPAS1 – proteína de domínio PAS 1 neuronal

NR1D1 - subfamília de receptor nuclear 1, grupo D, membro 1

OC – quiasma óptico

OVLТ – órgão vasculoso da lamina terminalis

PACAP – polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase

PB – tampão fosfato

PBS – tampão fosfato salina

pc/ip – peso corporal/intraperitoneal

PER – proteína Period

Per 1, 2 e 3 – gene *period 1, 2 e 3*

Per2 – gene *Period 2*

PFA – paraformaldeído

pH – potencial hidrogeniônico

PR – receptor de progesterona

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa

R^2 – coeficiente de determinação

Rev-erba ou NR1D1 – gene Rev-Erba alpha ou receptor nuclear receptor subfamília

1, grupo D, membro 1

RIE – radioimunoensaio

RNA – ácido ribonucleico

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

RORs - receptores órfãos relacionados ao ácido retinóico

rpm – rotação por minuto

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction ou reação em cadeia da

polimerase de transcrição reversa

NSQ – núcleo supraquiasmático

SIRT - sirtuína

SIRT1 – sirtuína1

TIM – proteína Timeless

TSH – hormônio tiroestimulante

VIP – peptídeo vasoativo intestinal

VL – porção ventrolateral

AVP1a – receptor de vasopressina 1a

SUMÁRIO

1. Introdução	31
2. Hipótese	45
3. Objetivos.....	45
3.1.Objetivos gerais	45
3.2.Objetivos específicos	45
4. Delineamento Experimental	47
4.1.Experimento 1: Avaliação da expressão dos genes Per2, Bmal1, Rev-erba nos núcleos HMB, NSQ, APO, adenohipófise e ovários; e de AVP no NSQ de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.....	47
4.2.Experimento 2: Atividade dos neurônios vasopressinérgicos do núcleo supraquiasmático (NSQ) durante ritmo circadiano de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.	47
4.3.Experimento 3: Determinação das concentrações plasmáticas de FSH e LH de ratas cíclicas em diestro e ratas com ciclo irregular em diestro persistente	48
5. Material e Métodos.....	50
5.1. Animais.....	50
5.2. Ciclo estral.....	50
5.3. Experimento I – Avaliação da expressão dos genes Per2, Bmal1, Rev-erba nos núcleos HMB, NSQ, APO; adenohipófise e ovários de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.	52
5.3.1 Ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR): Extração de RNA total, reação de transcriptase reversa (RT-PCR) e qPCR	54
5.4. Experimento II: Atividade dos neurônios vasopressinérgicos do núcleo supraquiasmático (NSQ) de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.	61
5.4.1. Coleta das Amostras	61

5.4.1.1. Perfusão	61
5.4.1.2. Imunoistoquímica	62
Obtenção dos cortes.....	62
Preparação do tecido.....	62
Incubação com os anticorpos.....	63
Montagem dos cortes.....	64
Análises imunoistoquímicas	64
6. Resultados.....	68
6.1. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba, Bmal1 e AVP no NSQ e RNAm para Per 2, Rev-erba, Bmal1 na APO e HMB de ratas adultas cíclicas em diestro e senis com ciclos irregulares em diestro persistente.	68
6.1.1 Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba, Bmal1 e AVP RNAm no NSQ	68
6.1.2. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 na APO	71
6.1.3. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 no HMB.....	73
6.1.4. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 na Adenohipófise	75
6.1.5. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 no Ovário.....	77
6.2. Análises Imunoistoquímicas.....	79
6.3. Dosagens Plasmáticas de Gonadotrofinas	81
7. Discussão.....	84
8. Conclusão	98
9. Referências Bibliográficas.....	101

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O envelhecimento é considerado processo multidimensional no qual fatores ambientais podem proteger ou, inversamente, agravar seus sinais, de maneira não linear, nos processos fisiológicos e neurocomportamentais (SCHMIDT; PEIGNEUX; CAJOCHEN, 2012). Este fenômeno está promovendo alteração na estrutura da pirâmide demográfica em todo o mundo. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE-2008) revelam que em 2000, para cada pessoa com 65 anos ou mais, 12 estavam na faixa potencialmente ativa, i.e, de 15 a 64 anos. Entretanto, em 2050, teremos pouco menos de 3 pessoas na faixa etária potencialmente ativa para cada idoso. As alterações no sistema nervoso que ocorrem no período do envelhecimento determinam mudanças na forma como os indivíduos sentem e percebem o mundo bem como as interações com ele. Desta forma, o conhecimento das bases neurobiológicas que estão determinando esta fase sobre os componentes desses sistemas é de interesse da comunidade científica. O aumento da expectativa de vida e de doenças degenerativas que provocam alterações cognitivas, determinam a grande necessidade de conhecimento sobre o processo de envelhecimento cerebral saudável.

Nos últimos anos, estudos sobre o relógio biológico em diversos órgãos vem lançando luz sobre os caminhos subjacentes envolvidos no período do envelhecimento, com a promessa de intervenções para prolongar a vida saudável (CORNELISSEN; OTSUKA, 2017). Entre os desafios dos biogerontologistas está a questão da extensa variabilidade entre os indivíduos idosos e a necessidade de conhecimento sobre a forma como o cérebro envelhece, o que possibilitará a maioria dos indivíduos desfrutar de melhor qualidade de vida em idade avançada.

Seres vivos, animais e vegetais, possuem mecanismos rítmicos internos de adaptação frente à alterações do ambiente denominados de relógio biológico. A temporização interna é mantida por eventos bioquímicos que ocorrem de maneira circadiana, ultradiana ou

infradiana, respectivamente, em períodos aproximados de 24h, maiores que 24h e menores que 24h. Durante o envelhecimento dos organismos é possível detectar, em período de 24 h, diminuição na amplitude e precisão de ritmos metabólicos, comportamental e endócrino, regulados por marca-passo circadiano central (núcleo supraquiasmático (NSQ), e por osciladores locais nos tecidos periféricos de mamíferos (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Disfunções no relógio circadiano contribuem para patologias e doenças (JENWITHEESUK et al., 2014), pois controla sistemas associados ao envelhecimento, tais como: o controle do metabolismo, a resposta ao estresse oxidativo e a reparação do DNA (KHAPRE; SAMSA; KONDRATOV, 2010; KONDRATOVA; KONDRATOV, 2012).

O funcionamento do relógio biológico é alvo de estudos desde a década de 70, com a descoberta na oscilação diária das proteínas PER (period), TIM (timeless), DBT (doubletime) que conferem ritmicidade circadiana de atividade locomotora em *Drosophila melanogaster*, cujos mecanismos moleculares são curiosamente conservados em mamíferos (KOH et al., 2006). Mamíferos exibem sistema circadiano organizado de forma hierárquica, no qual marcapasso mestre no NSQ regula diariamente os osciladores dos tecidos periféricos (KO; TAKAHASHI, 2006) de acordo com o fotoperíodo, que por sua vez, determina a fase dos relógios celulares periféricos através de variedade de relés de sinalização, incluindo ritmos endócrinos e ciclos metabólicos (LIU; CHANG, 2017).

O NSQ, pequeno núcleo localizado bilateralmente acima do quiasma óptico na zona ventral periventricular do hipotálamo, é composto, em roedores, por aproximadamente 20 mil pequenos neurônios interconectados (SOLLARS; PICKARD, 2015) e com distribuição anatômico-fisiológica bem definida. Estes neurônios recebem informação luminosa a partir de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis que expressam melanopsina na retina através do trato retino-hipotalâmico e sincronizam a fase do relógio circadiano com a variação do ciclo claro e escuro (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010) (Figura 1).

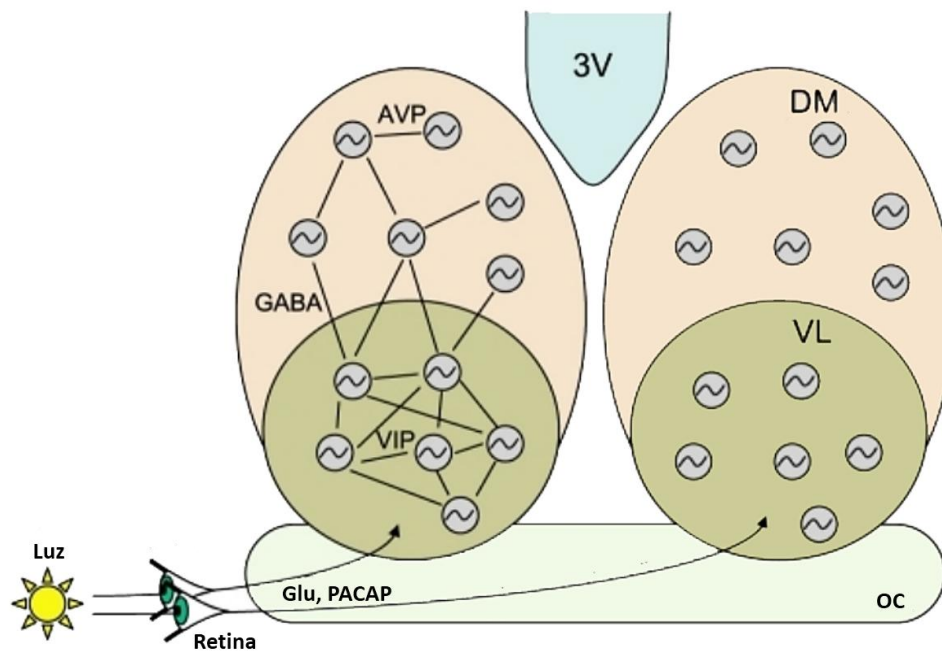


Fig. 1 – Representação da localização anômica do núcleo supraquiasmático e de suas subdivisões conforme neurotransmissores liberados. Abreviações Glu: Glutamato, PACAP: polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase, VIP: Peptídeo vasoativo intestinal, GABA: ácido gamaaminobutírico, AVP: arginina-vasopressina, DM: porção dorsomedial ou “shell”, VL: porção ventrolateral ou “core”, OC: quiasma óptico, 3V: terceiro ventrículo (Fonte: Adaptado de (HAFNER; KOEPPL; GONZE, 2012).

O substrato molecular para temporização circadiana consiste de sistema de alças de retroalimentação transcricional-translacional envolvendo família de genes do relógio (*clock genes*) que interagem (TAKAHASHI et al., 2008). Dentro da alça principal, os genes transativadores *Bmallou ARNTL* (gene Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) e *Clock* conduzem a transcrição dos genes repressores *Period* (*Per1*, *Per2*) e *Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*), que após a tradução suprimem a atividade de BMAL1:CLOCK.

Com o envelhecimento, os ritmos circadianos são alterados ou fragmentados com dissociação consequente dos ritmos circadianos do indivíduo (SATINOFF et al., 1993). Apesar das evidências para comprometimento circadiano em animais velhos e às respostas adversas (DAVIDSON et al., 2008), pouco se sabe sobre as alterações nos osciladores circadianos e a senescência reprodutiva, uma vez que o processo do envelhecimento é

fortemente influenciado por mecanismos epigenéticos, dos quais o remodelamento da cromatina, incluindo as modificações em histonas, podem exercer efeito crucial na regulação gênica, mesmo em células como os neurônios (TANIURA; SNG; YONEDA, 2007).

O hipotálamo consiste de conjunto de células neurosecretoras distintas localizadas na base do cérebro que interpretam, integram e respondem a sinais externos e internos ao e do organismo visando sua homeostasia. Processos vitais sob controle hipotalâmico incluem a regulação da temperatura corporal, ingestão de nutrientes e equilíbrio energético, ciclos de sono-vigília, comportamento sexual, ciclicidade reprodutiva, equilíbrio hidroeletrólítico, adaptação ao estresse, crescimento e ciclos circadianos ou ultradianos (KRONENBERG, 2013; LARSEN, 2003). Durante o envelhecimento, a capacidade de resposta desses neurônios diminui, comprometendo negativamente as atividades do organismo (CHEN; MAEVSKY; UCHITEL, 2015).

O declínio reprodutivo e o envelhecimento feminino resultam da deterioração de funções hipotalâmicas (WISE, 1999; WISE et al., 1997; WISE; SMITH, 2001; WISE et al., 1999). Fêmeas de roedores em meia-idade (10-12 meses) exibem atrasos no horário e início do pico do hormônio luteinizante (LH), com alterações em sua amplitude (NASS et al., 1984; WISE, 1982). Durante esta fase de vida, estes animais também apresentam alterações na expressão de neuromediadores, neuropeptídeos e receptores (KRAJNAK et al., 1998), bem como na ritmicidade de diferentes ritmos biológicos, cuja perda geral é devida a alterações no funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (KRAJNAK; ROSEWELL; WISE, 2001). Em mulheres, o envelhecimento é caracterizado pela cessação da função ovariana e dos ciclos reprodutivos, além de ser processo acompanhado pelo declínio da saúde cardiovascular, do controle motor, da integridade óssea e das faculdades cognitiva e psicossocial (UTIAN, 2005).

Os genes do relógio são expressos de maneira circadiana em neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), nos gonadotrofos hipofisários e nos ovários, onde sinais neuronais dependentes do ciclo claro/escuro são necessários para a indução do aumento de LH, cujo controle é dado pelo relógio biológico (FRANKE, 2003). A expressão destes genes está intimamente relacionada com a função dos componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG), cujo funcionamento determina a reprodução (YIN; GORE, 2010). Este eixo coordena o mecanismo reprodutivo através do GnRH que, secretado por neurônios dos núcleos hipotalâmicos, estimula a liberação das gonadotrofinas hipofisárias, as quais estimulam a secreção dos esteroides ovarianos.

A organização temporal da atividade pulsátil no eixo HPG é essencial para a geração do pico pré-ovulatório de LH e manutenção dos ciclos reprodutivos femininos. Neurônios de estruturas como o núcleo anteroventral periventricular (AVPe) projetam-se diretamente para os neurônios GnRH, são imunorreativos ao estradiol (PETERSEN; OTTEM; CARPENTER, 2003) e desempenham função essencial no controle da liberação desse decapeptídeo e na indução, pelos esteroides ovarianos, da concentração máxima (pico) do LH (BU; LEPHART, 2007; SMITH, 2008). Estes neurônios expressam família de neuropeptídios codificados pelo gene *Kiss1*, coletivamente chamada de kisspeptinas (Kiss), os quais respondem positivamente ao estradiol no horário do pico pré-ovulatório de LH (SMITH; CLIFTON; STEINER, 2006), apresentam padrão circadiano de atividade em escuro constante (ROBERTSON et al., 2009). Neurônios Kiss localizados no AVPe e núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo médio basal controlam, sob controle circadiano, diferencialmente o pico pré-ovulatório: ARC, responsável pela pulsatilidade do GnRH, atua regulando o *feedback* negativo e o AVPe, responsável pela geração do pico de GnRH, atua sobre o *feedback* positivo dos esteróides sexuais (YAP et al., 2016). Também está evidenciado que os neurônios secretores de GnRH do hipotálamo e da área pré-óptica anterior (APO-AH) de roedores são as principais células que regulam a função

reprodutiva (GORE; ROBERTS, 1995), sendo o momento do declínio reprodutivo relacionado à idade, dependente de complexa interação de alterações que ocorrem em todos os níveis do eixo HPG (OTTINGER, 2010).

Em roedores, neurônios GnRH localizam-se em diferentes regiões cerebrais, incluindo estruturas septais, olfatórias, pré-ópticas e hipotalâmicas (SILVERMAN; JHAMANDAS; RENAUD, 1987). A população destes neurônios, com atividade intensa durante o pico de GnRH, concentra-se na área pré óptica rostral (APOr), composta por APOm (área pré-óptica medial) e AVPe, com localização próxima à região do órgão vasculoso da lâmina terminalis (OVLt) (LEE; SMITH; HOFFMAN, 1990; WINTERMANTEL et al., 2006).

Assim como em humanos, o momento da ovulação em roedores é controlado por estímulos hormonais (com destaque para o estradiol), que indicam a maturação do oócito, associados ao controle do relógio biológico, que determinam o comportamento sexual e o período do dia em que a liberação do óvulo acontece (SIMONNEAUX; BAHOUAGNE, 2015). Atrasos ou adiantamentos no início do período de luz provocam alterações no horário da ovulação (HOFFMANN, 1969) e, em fêmeas de camundongos e hamsters, alterações em seu período circadiano de atividade são acompanhadas por alterações no horário do pico de LH, podendo levar à infertilidade (LUCAS et al., 1999; MILLER et al., 2004).

A interação reprodutiva com o fotoperíodo representa mecanismo adaptativo que evoluiu para otimizar as possibilidades de fertilização e, em última análise, assegurar a sobrevivência da espécie (CAVIGELLI et al., 2005; HORVATH, 1998; LEVINE, 2002; NELSON, 2011). Em mamíferos, o NSQ é responsável por numerosas funções fisiocomportamentais (PILORZ; STEINLECHNER; OSTER, 2009) e cabe a ele a função de sincronizar os múltiplos relógios periféricos, sendo considerado o relógio central capaz de gerar ritmos circadianos (SILVER et al., 1996). Através da liberação programada de sinais neuro-humorais, o NSQ controla a ritmicidade do comportamento reprodutivo, o ciclo estral e

parâmetros endócrinos (PILORZ et al., 2009). Neurônios do NSQ projetam-se diretamente para neurônios GnRH (KALSBECK; BUIJS, 2002), onde o pico pré-ovulatório é primariamente controlado por duas redes de aferência, uma vasopressinérgica de controle indireto, e outra de controle direto, através do peptídeo vasoativo intestinal (VIP), que possivelmente também modula, de maneira indireta, neurônios do hipotálamo dorso-medial (HDM) (SIMONNEAUX; BAHOUAGNE, 2015). Além disso, redes de interneurônios que circundam os neurônios GnRH também são importantes moduladores de sua atividade mediante regulação hormonal exercida por folículos ovarianos em maturação (LEVINE, 1997; VAN DER BEEK, 1996) para a indução dos níveis de secreção de GnRH associados ao pico de LH (MILLER et al., 2006). Ausência ou desregulação em uma destas redes abole o pico de GnRH, levando à anovulação (KALRA, 1993) e a ablação do NSQ ou a desconexão de suas projeções neuronais para a APO resulta em aciclicidade estral, indicando ação fundamental destes núcleos na função reprodutiva (BROWN-GRANT; RAISMAN, 1977; WIEGAND; TERASAWA, 1982; WIEGAND et al., 1980).

Os “genes do relógio”, como *Per1* e *Per2*, compõem a maquinaria molecular do relógio biológico e regulam a expressão de centenas de produtos gênicos (PILORZ et al., 2009). A expressão do gene promotor alvo *Per 1* ocorre de maneira circadiana nos neurônios GnRH (GILLESPIE et al., 2003) e a expressão de todos os cognatos dos genes de relógio foi detectada nos gonadodrofos hipofisários (OLCESE; SIKES; RESUEHR, 2006; RESUEHR et al., 2007; RESUEHR; RESUEHR; OLCESE, 2009). A descoberta de que os genes de relógio exibem expressão de maneira circadiana em vários tecidos periféricos e em várias regiões cerebrais (BALSALOBRE, 2002) evidencia que o relógio biológico é composto, além do relógio central, por osciladores periféricos (POLETINI, 2012). Estudos realizados por Funabashi e colaboradores (2000) e Watson e colaboradores (1995) demonstraram densa inervação vasopressinérgica na APO, eferente da porção dorsomedial do NSQ, sugerindo que

sinais circadianos são comunicados sinapticamente para neurônios, responsivos ao estradiol, do AVPe. Além disso, RNAm de receptores para arginina-vasopressina (AVP) foi detectado em neurônios da APOm, onde o aumento induzido nos níveis extracelulares de AVP de animais com o NSQ intacto, tem efeito estimulador sobre o pico de LH (PALM et al., 2001). Este efeito está restrito a período de tempo específico, que coincide com a janela de tempo sensível para sinal neuronal antes do pico de LH (EVERETT; SAWYER, 1950) e com o pico da secreção de AVP por neurônios NSQ (GILLETTE; REPERT, 1987; KALSBECK et al., 1995). A completa ausência de qualquer sinal circadiano do NSQ não induz variação em níveis basais de LH, no entanto, a administração de AVP, durante 2 horas, na APOm é suficiente para reestabelecer o aumento repentino de LH, que é comparável com oscilações (forma e amplitude) induzidas por estrogênios em animais NSQ intactos (PALM et al., 1999). A secreção aumentada de AVP por terminais de neurônios eferentes do NSQ na APOm é o sinal circadiano essencial para a geração do pico de LH (KALSBECK; BUIJS, 2002)

Animais submetidos à mutação do gene dominante negativo *Clock* Δ 19 (*Clock* delta 19) possuem ciclos estrais prolongados, com extenso período da fase de estro (DOLATSHAD et al., 2006; MILLER et al., 2004) e ausência do pico pré-ovulatório de LH no proestro (MILLER et al., 2004), sugerindo anormalidade no ritmo de AVP expressa em neurônios NSQ, bem como reduzida expressão do receptor AVP1a em NSQ em regiões-alvo do hipotálamo (MILLER et al., 2006). Embora a identidade molecular do sinal temporal do NSQ seja desconhecida, o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e, em particular, a AVP, têm sido reportados no controle temporal de secreção do GnRH (KALSBECK; BUIJS, 2002; VAN DER BEEK et al., 1997). A expressão de AVP é regulada pelos genes do relógio ativadores de transcrição *Clock* e *Arntl*, os quais induzem a expressão do receptor por ligação a elementos de E-box no promotor de AVP (GRACE; FINK; QUINN, 1999; LOWREY; TAKAHASHI, 2004; MUNOZ; BREWER; BALER, 2002).

O mecanismo molecular para o funcionamento do relógio biológico está relacionado com a expressão das proteínas do relógio através de retroalimentação transcricional que envolve pelo menos dez genes (BUHR; TAKAHASHI, 2013) (Fig. 2). Em mamíferos, os genes *Clock*, *Bmal1*, *Per* (1, 2 e 3) e *Cry* (1 e 2), promovem a tradução de proteínas cuja expressão é autorregulada por alças de retroalimentação positiva e negativa, com taxas de transcrição/tradução que variam durante período aproximado de 24 horas (ALBRECHT et al., 1997; SHEARMAN et al., 1997). No citoplasma, as proteínas PER 1, 2 e 3 juntamente com as proteínas CRY 1 e 2, dimerizam-se para compor a alça de retroalimentação negativa, e após serem fosforiladas pela ação da enzima caseína-quinase1 epsilon (CK1 ϵ), entram no núcleo nas horas iniciais da fase escura para inibir a ação dos dímeros CLOCK - BMAL1 e CLOCK - NPAS1 (neuronal PAS 1, membro da família basic helix-loop-helix-PAS), responsáveis pela alça de retroalimentação positiva na região promotora dos genes *Per* (1, 2 e 3) e *Cry* (1 e 2), assim como no gene *Rev-erba* ou *NR1D1* (membro da família dos receptores órfãos do ácido retinóico) e *Rors* (a, b, c). CRY 1 e 2 e PER 2 também regulam a transcrição de *Bmal1*, através dos genes *Reverb- α* (inibidor da transcrição de *Bmal1* via elementos ROR) (RORE) e *Rors* (estimulador da transcrição de BMAL1) (FROY, 2013), reiniciando a formação dos dímeros de CLOCK e o ciclo de ativação (REPPERT; WEAVER, 2002). Camundongos com mutações genéticas que abolem a expressão dos genes *Cry* 1 e 2, assim como *Per* 1 e 2 deixam de apresentar comportamentos rítmicos circadianos (OKAMURA et al., 1999). Estes mecanismos de transcrição-tradução caracterizam a ferramenta molecular pelo qual o núcleo NSQ sincroniza (ou determina) o ritmo circadiano (REPPERT; WEAVER, 2002).

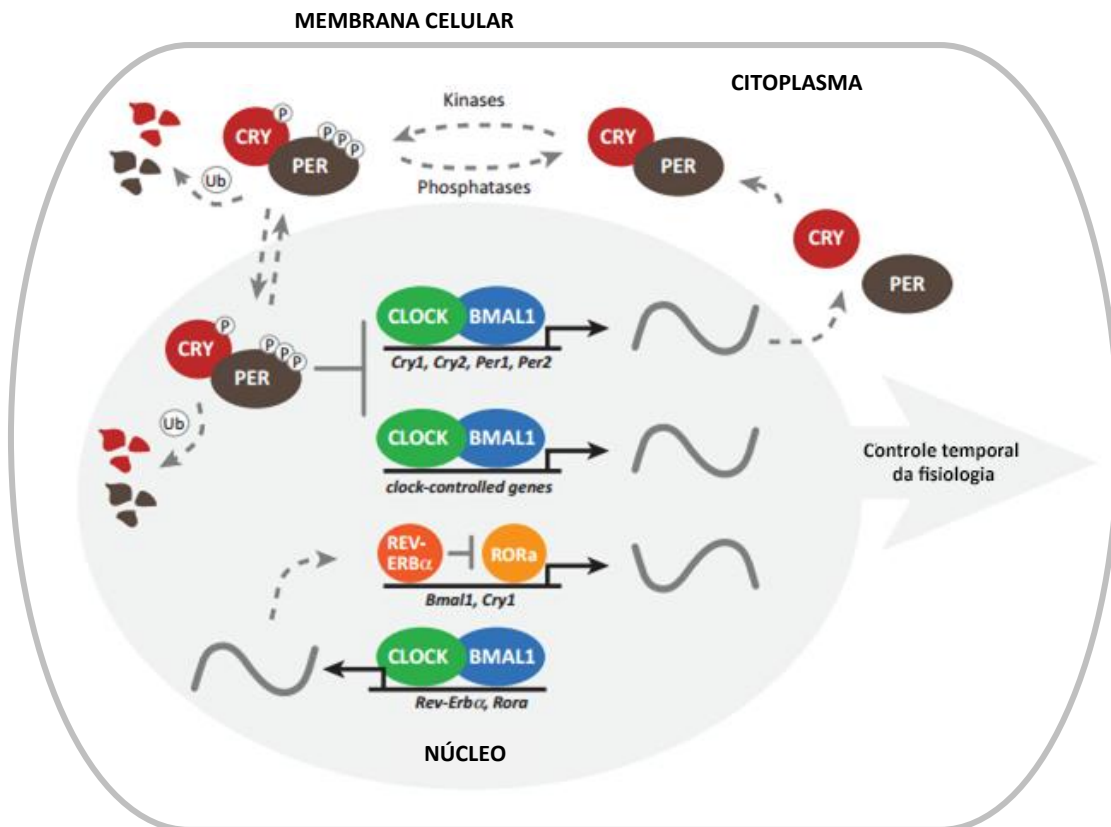


Fig. 2 - Representação esquemática do funcionamento do relógio molecular em mamíferos. Alças autorregulatórias de transcrição/tradução funcionam juntas para produzir ritmos robustos de 24 horas de expressão gênica. As proteínas CLOCK e BMAL1 dimerizadas compõem a alça de ativação diurna desta maquinaria, enquanto REV-ERB α e PER/CRY associados à quinases são componentes repressores da ação transcricional de Clock/Bmal1. As proteínas do relógio molecular também controlam a expressão de vários genes, chamados de genes sob o controle do sistema clock (CCGs) que também exibem atividade circadiana. Abreviações: BMAL1, *brain and muscle ARNT-like1*; CLOC *circadian locomotor output cycles kaput*; CRY, *cryptochrome*; PER, *period* (Adaptado de (PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014) .

O ritmo de expressão dos clock genes também é regulado por hormônios como melatonina e glicocorticoides. A principal fonte de melatonina em vertebrados é a glândula pineal, no entanto, células da retina, células na glândula do Harder em animais quadrúpedes e alguns grupos de células somáticas do trato gastrointestinal igualmente sintetizam este hormônio (TRIVEDI et al., 2017), secretado primariamente à noite e com controle de síntese regulado durante o ciclo claro-escuro (HARDELAND, 2008). A expressão de seus receptores explica a ação direta da melatonina em muitos órgãos, uma vez que sua produção circadiana e a presença destes receptores no NSQ, representam a associação entre a produção de

melatonina e a maquinaria do ritmo circadiano (JENWITHEESUK et al., 2014). De forma recíproca, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) influencia fortemente a atividade/ritmo circadiano do sistema CLOCK através dos glicocorticóides (NADER; CHROUSOS; KINO, 2010), cujas concentrações circulantes flutuam naturalmente e são fortemente regulados de maneira circadiana, em animais diurnos, incluindo os seres humanos (CHROUSOS, 1995; CHROUSOS, 2001). A influência exercida pela liberação rítmica diária deste hormônio na atividade do eixo HPA, é orquestrada por eferências do NSQ aos neurônios corticotróficos (CRH)/vasopressinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (BAO et al., 2008), e permite o “reset”/reajuste dos relógios periféricos frente à situações de estresse, além de suas oscilações periféricas em alguns tecidos (FUKUOKA et al., 2005; SEGALL et al., 2006).

O princípio de qualquer relógio circadiano está no ciclo de retroalimentação dos processos de transcrição/tradução, fortemente modulados por mecanismos epigenéticos (SWEATT et al., 2013). A acetilação de histonas H3 e H4 relacionado com os promotores de genes que fazem parte do mecanismo de relógio molecular são diferentemente regulados durante o ciclo circadiano (BELLET; SASSONE-CORSI, 2010; NARUSE et al., 1999). Desmetilação de regiões específicas no interior do locus do gene GNRH desempenha função na ativação *in vivo* da transcrição de GnRH. Metilação na lisina 9 e 27 da histona 3 (H3K9me e H3K27me) geralmente é observada em genes silenciados (RUTHENBURG et al., 2007; WANG et al., 2008), enquanto que a trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) é característica de transcrição ativa (BERGER, 2007; WANG et al., 2008).

Em mamíferos são encontradas proteínas histonas desacetilases (HDAC) conhecidas como sirtuinas (SIRT), que originalmente foram identificadas como fator de silenciamento genético (HERSKOVITS; GUARENTE, 2013). A ativação de SIRT1 diminui a acetilação de H3, e deste modo a repressão de genes circadianos de modo tempo-específico (BELLET et

al., 2013), além de, alterar a estrutura da cromatina por desacetilação na lisina 16 da histona 4 (H4K16) e na lisina 9 da histona 3 acetilada (H3K9ac) (VAQUERO; REINBERG, 2009), ambas relacionadas com a ativação gênica (GUTTMAN et al., 2009; RUTHENBURG et al., 2007; WANG et al., 2008). De abundante expressão no ARC (CAKIR et al., 2009; DIETRICH et al., 2010), SIRT1 promove a metilação na lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) (VAQUERO; REINBERG, 2009), modificação associada com o silenciamento gênico (GUTTMAN et al., 2009; RUTHENBURG et al., 2007; SCHAEFER et al., 2009; WANG et al., 2008). Em tecidos periféricos, tais como o fígado, foi demonstrado que SIRT1 pode influenciar o ritmo circadiano de célula autônoma por diversos mecanismos (CHANG; GUARENTE, 2013), como por exemplo, a desacetilação de BMAL1, que afeta sua atividade (NAKAHATA et al., 2008) ou de PER2 que altera sua estabilidade (ASHER et al., 2008).

Diversos estudos (KRAJNAK et al., 2001; LLOYD; HOFFMAN; WISE, 1994) têm demonstrado que a capacidade do relógio temporal circadiano do cérebro na condução dos eventos neuroquímicos diurnos é reduzida com a idade, explicando a ocorrência da atenuação e dessincronização nos ritmos de vários neurotransmissores envolvidos com a secreção de GnRH-LH durante a instauração da senescência reprodutiva. Em nosso laboratório, analisamos a atividade neuronal de núcleos envolvidos com o processo reprodutivo de fêmeas Wistar com 18 meses, no período caracterizado como diestro persistente (NICOLA, 2013). Os resultados evidenciaram alteração na atividade neuronal do AVPe e Locus Coeruleus e que estas alterações ocorrem primariamente às ovarianas, possivelmente devido à mudanças no microambiente celular e sua maquinaria genética. Também foi detectada maior atividade dos neurônios noradrenérgicos, porém, menor conteúdo de noradrenalina em neurônios da APO e de GnRH no hipotálamo médio basal. Sugerimos que a temporização circadiana em todo o eixo HPG encontra-se alterada, resultando em descompasso para síntese e liberação de

gonadotrofinas com conseqüente ausência do pico pré-ovulatório, caracterizando a aciclicidade reprodutiva.

A literatura destaca a ação de diversos hormônios controladores dos ritmos biológicos, tais como melatonina, TSH, Fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), GH, DHEA (Dehydroepiandrosterona), hormônios do eixo HPA: ACTH (hormônio adreormnocorticotrófico) e CRH (hormônio liberador de corticotrofina), glicocorticoides, conforme há o avanço da idade; no entanto, o comportamento dos hormônios reprodutivos sobre a atividade do NSQ e vice-versa durante a instauração da senescência reprodutiva feminina, ainda carece de maiores esclarecimentos.

Mediante essas informações e tendo em vista a existência de sistemas circadianos multiosciladores em cada componente do eixo HPG (SELLIX; MENAKER, 2010), nossa proposta é analisar o comportamento dos *clock* genes no eixo HPG de fêmeas de roedores no período da periestro-pausa, uma vez que as alterações hormonais neste período somadas à fatores epigenéticos na maquinaria do sistema CLOCK, podem determinar a perda da organização temporal endógena, favorecendo a progressão para o término da fertilidade determinando a estropausa (roedores) ou menopausa (mulheres).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

2. Hipótese

Hipotetizamos a ocorrência de alterações nos ritmos circadianos no eixo HPG e que estas alterações desempenham função importante para a condução da senescência reprodutiva.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Averiguar possível alteração temporal do sistema *CLOCK* no eixo HPG e a relação com às alterações hormonais que caracterizam a periostropausa.

3.2. Objetivos específicos

A partir da caracterização de modelo para estudo fisiológico do envelhecimento reprodutivo feminino realizamos análises de regiões centrais a fim de caracterizar as alterações que ocorrem neste período para melhor compreender a senescência reprodutiva. Portanto, neste estudo buscou-se testar se:

- há alteração temporal (ao longo de 24h), *in vivo*, na expressão de RNAm dos genes *Per2*, *Rev-erba*, *Bmal1* nos núcleos anteroventralperiventricular (AVPe) e supraquiasmático (NSQ), no hipotálamo médio basal (HMB), na adenohipófise e nos ovários de animais senis (18 meses) em diestro persistente comparado com o de animais adultos (4 meses) na fase de diestro?

- ocorre alteração temporal na expressão gênica de arginina-vasopressina (AVP) no NSQ de animais adultos (4 meses) na fase de diestro e animais senis (18 meses) em diestro persistente?

- há diferença de atividade vasopressinérgica na porção dorsomedial do NSQ de animais adultos (4 meses) na fase de diestro e animais senis (18 meses) em diestro persistente?

- de que forma possíveis alterações na maquinaria circadiana contribuem para a persistência da fase do diestro em fêmeas de roedores?

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4. Delineamento Experimental

4.1. Experimento 1: Avaliação da expressão dos genes *Per2*, *Bmal1*, *Rev-erba* no HMB, NSQ, APO, adenohipófise e ovários; e de AVP no NSQ de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.

Ratas Wistar adultas (4 meses) com ciclo regular em diestro (Grupo CD) e senis (18 meses) com ciclo irregular em diestro persistente (Grupo IDP), foram decapitadas a cada 6 horas (8h, 14h, 20h, 02h), do dia do diestro (n= 5-10 animais/horário), após análise de 3 ciclos estrais consecutivos para determinação da regularidade/irregularidade do ciclo. Os órgãos-alvo foram removidos com instrumentais autoclavados e descontaminados com *RNAse away* (Sigma®). Os encéfalos foram imediatamente congelados a -80° C e hipófise e ovários foram acondicionados em *ependorffs RNAse free* autoclavados, para rapidamente serem congelados em nitrogênio líquido. Todos os tecidos foram armazenados em -80°C até o devido processamento. As regiões cerebrais foram microdissecadas segundo as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (2007) e posteriormente foi realizada a extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR para avaliação quantitativa de RNAm para os respectivos alvos nos respectivos tecidos.

4.2. Experimento 2: Atividade dos neurônios vasopressinérgicos do núcleo supraquiasmático (NSQ) durante ritmo circadiano de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.

Neste segundo experimento também foram utilizados animais distribuídos segundo descrito acima (n= 7-10 animais/horário), para serem perfundidos transcardiacamente, sob anestesia, a cada 6 horas (8h, 14h, 20h, 02h) por período de 24h, no dia do diestro. Seus cérebros foram removidos, pós fixados em PFA 4%, saturados em sacarose 30%, congelados em isopentano a -50°C e armazenados a -80° C. Posteriormente foram realizados cortes histológicos

seriados de 30 µm do NSQ para realização de dupla imunomarcação das proteínas cFos e AVP.

4.3. Experimento 3: Determinação das concentrações plasmáticas de FSH e LH de ratas cíclicas em diestro e ratas com ciclo irregular em diestro persistente

Para análise das concentrações plasmáticas de gonadotrofinas, foi coletado sangue diretamente do tronco encefálico dos animais experimentais submetidos à decapitação. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, na temperatura de 2° C durante 15 min. O plasma foi aliquotado em eppendorfs de 500 µL e armazenado em freezer (-20° C) para dosagem dos hormônios hipofisários: FSH e LH, por radioimunoensaio (RIE).

MATERIAL E MÉTODOS

5. Material e Métodos

5.1. Animais

Todos os procedimentos animais foram aprovados (CEUA: 2014-00269) pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, SP, Brasil), estando em conformidade com o guia de cuidados para uso de animais de laboratório.

Após a aprovação do protocolo experimental, fêmeas *Wistar* nas idades de 4 e 18 meses (n=10 animais/horário/experimento), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) foram mantidas em caixas coletivas (4 animais/caixa), em ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 10\%$) e ciclo de luz (12/12 h - luzes acesas às 7h), com acesso livre à água e ração (Presence[®] ratos e camundongos). Os procedimentos experimentais durante a fase escura do fotoperíodo, foram realizados com o auxílio de sistema de iluminação variável com emissão de comprimento de onda específico na faixa espectral de 720 nm (luz vermelha), sob fonte de radiação por *light emission diodo* (LED) com intensidade menor que 1 lux (POLETINI et al., 2007; SELLIX et al., 2006), controlado por luxímetro (Minipa[®] digital lux meter MLM-1011). Todos os animais experimentais foram submetidos à decapitação ou perfusão transcardíaca em quatro horários distintos na fase do diestro: 08, 14, 20, 02 horas, perfazendo total de 12h de fase clara e 12h de fase escura do fotoperíodo.

5.2. Ciclo estral

O acompanhamento do ciclo estral de todos os animais (Fig. 3 A) foi realizado diariamente através do esfregaço vaginal colhido no período matutino (9h), para determinação da regularidade (Fig. 3B) do ciclo estral bem como a irregularidade do ciclo (Fig. 3C), com a persistência da fase do diestro nos animais de 18 meses. O esfregaço vaginal diário foi analisado a fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de Long e Evans (1922) por 15 dias

consecutivos, durante o terceiro e décimo sétimo mês das ratas. Foram utilizadas para este estudo somente os animais adultos que apresentaram ciclo estral regular e ratas senis com irregularidade estral, ou seja, que apresentaram diestro persistente durante o período correspondente a três ciclos consecutivos.

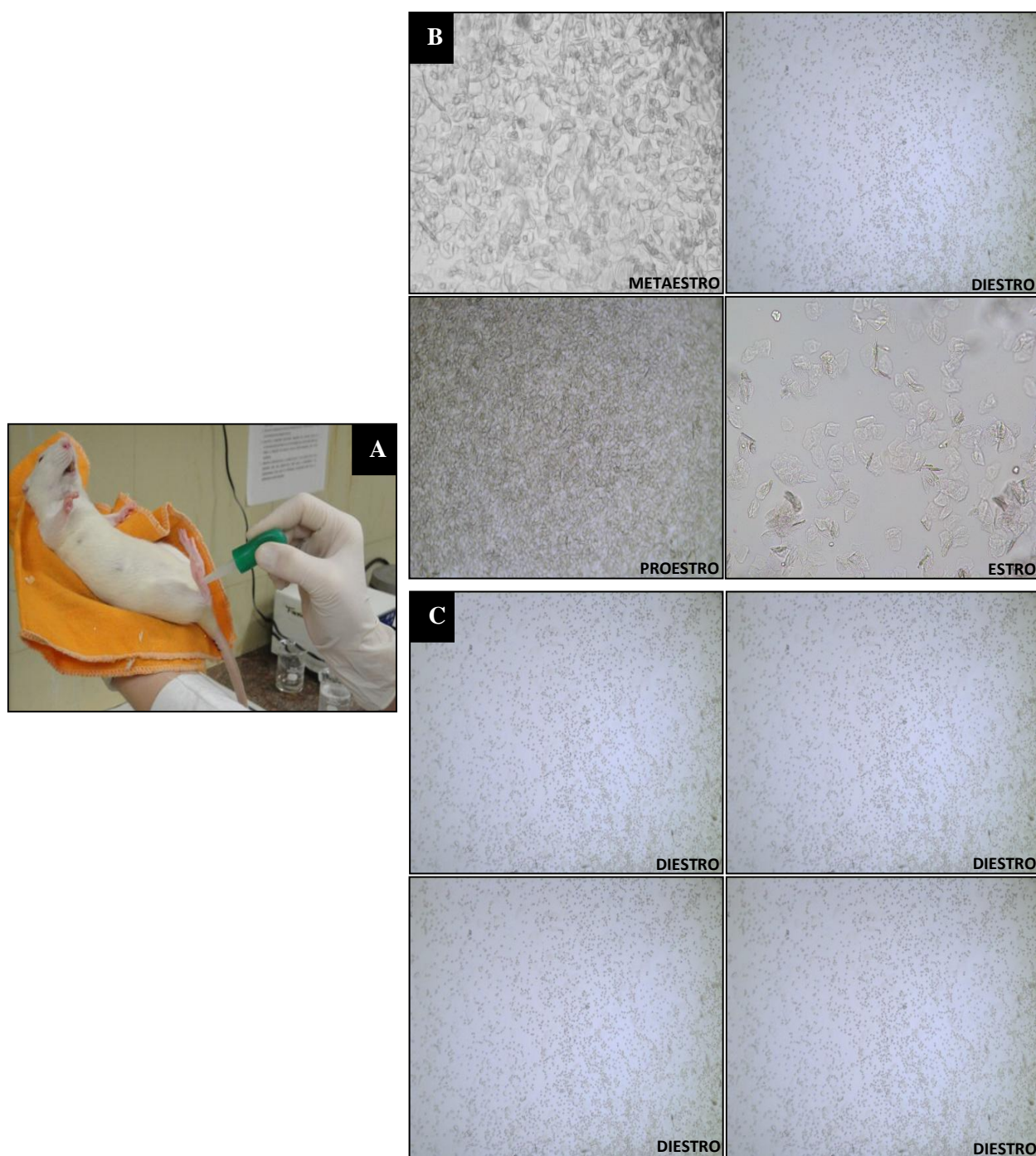
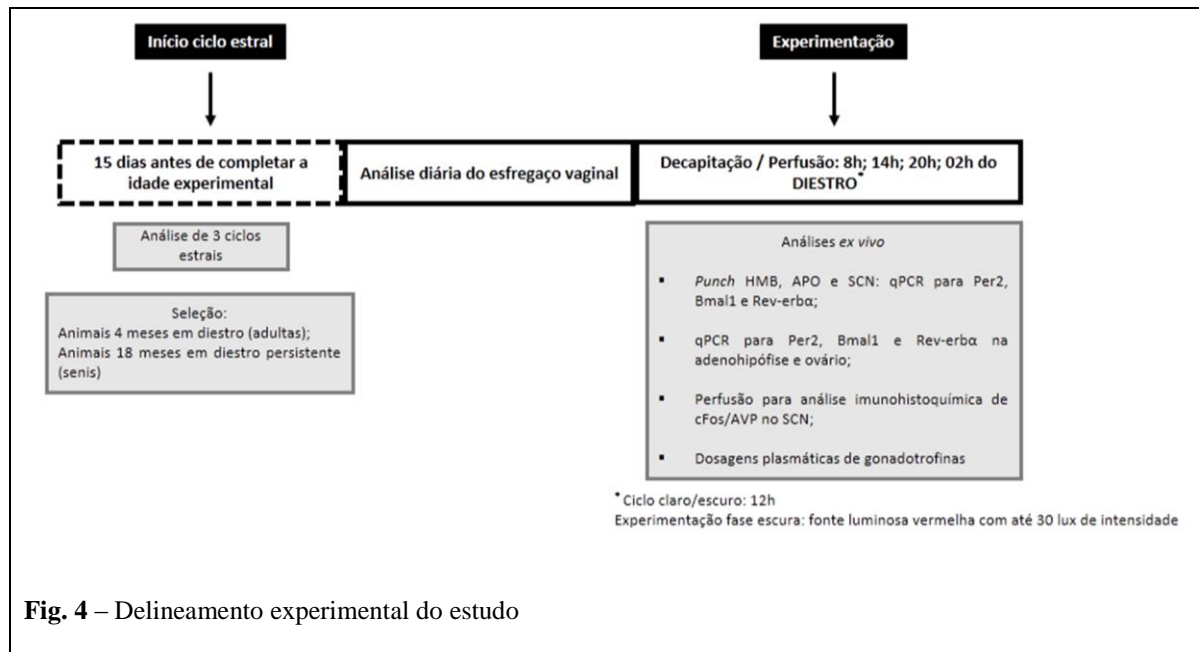


Fig. 3 - (A) Coleta do lavado vaginal. Visão microscópica do lavado vaginal nas diferentes fases do ciclo estral em fêmeas com ciclo regular (B) e irregular com persistência do diestro (C). *Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento.*

A Figura 4 apresenta resumidamente o organograma do delineamento experimental, coleta e análises das amostras dos grupos experimentais.



5.3. Experimento I – Avaliação da expressão dos genes *Per2*, *Bmal1*, *Rev-erba* no HMB, NSQ, APO, adenohipófise e ovários de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.

Para a remoção do APO, HMB e NSQ foi utilizada a técnica de “*punch*” descrita por Palkovits (1973), conforme indicado na Figura 5. Em criostato, sob condições estéreis e livres de RNase, o cérebro foi fixado à plataforma recoberta com meio próprio para congelamento (Tissue-tek o.c.t. compound, Miles INC.) adaptada ao equipamento, com temperatura mantida à -20°C . Foi realizada única fatia de 1000 μm a partir de + 0,48mm ântero-posterior ao bregma para o APO (agulha redonda de 1.5 mm), única fatia de 600 μm imediatamente após o APO será feita para o NSQ a partir de -0,48 mm posterior ao bregma (agulha de 1.0 mm redonda) e duas

fatias subsequentes de 1000 μm para o HMB a partir de -1,72 mm posterior ao bregma (agulha de 1mm quadrada). O NSQ foi microdissecado com auxílio de agulha redonda com 1 mm de diâmetro posicionada centralmente ao 3^oV (Figura 5B), o HMB foi microdissecado com auxílio de agulha quadrada com 1 mm de diâmetro posicionada centralmente ao 3^oV (Figura 5C-D), tendo a base do cérebro como referência, e a APO microdissecada com agulha redonda com 1 mm de diâmetro, posicionada acima do quiasma óptico (Figura 5A). As microdissecções da APO e HMB já foram anteriormente validadas conforme descrito em Nicola e colaboradores (2016) e Leite e colaboradores (2016) (LEITE et al., 2016) e o NSQ microdissecado como descrito em De Araújo e colaboradores (2016), com adaptações.

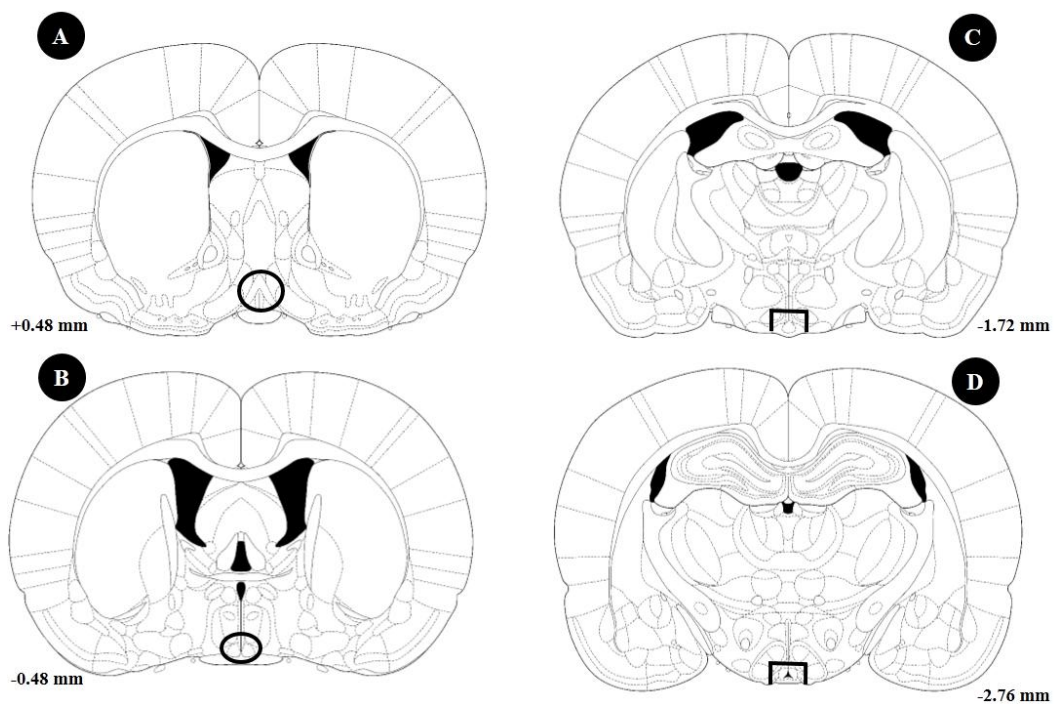


Fig. 5 - Diagrama esquemático de cortes coronais representando as localizações dos punchs da APO, NSQ e HMB. As coordenadas indicam a distância do bregma à face rostral de cada seção, de acordo com o Atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007). APO foi dissecada a partir de 0,48 mm do bregma (círculo) utilizando-se agulha de 1,0 mm de diâmetro, posicionada acima do quiasma óptico (A) e o NSQ a partir de -0,48 mm do bregma, com agulha redonda de 1,0 mm de diâmetro (círculo), posicionada centralmente ao 3V (B). HMB dissecado com agulha quadrada de 1,0 mm da terceira e quarta seções, iniciando aproximadamente -1,72 e -2,76 mm a partir do bregma, respectivamente (quadrado) (C-D).

5.3.1 Ensaio de PCR Quantitativo (qPCR): Extração de RNA total, reação de transcriptase reversa (RT-PCR) e qPCR

O RNA total dos tecidos isolados foi extraído com *Tri-Reagent-LS* (Life Technologies, E.U.A.), conforme instruções do fabricante, ressuspendido em 10 μL de H_2O DEPC (Life Technologies, E.U.A.) e tratado com DNase I (2U/ μL) conforme instruções do fabricante (turbo-DNA-freeTM, Life Technologies, E.U.A.).

A concentração de RNA foi determinada por leitura de absorbância em 260 nm (NanoDrop 2000/2000c, E.U.A.). A reação de transcriptase reversa (RT-PCR) foi realizada com 5 μL de RNA total (500 ng), utilizando 2,5 μL de RT Random Primers 10X (Tabela 1), 1 μL de dNTPs (100mM), 2,5 μL de tampão de PCR 10X, 1,5-2,0 μL do inibidor de ribonuclease, 1,25 μL de MultiScribeTM Reverse Transcriptase - 50 U/ μL , Thermo Fisher Scientific) e 12,75 μL de H_2O RNase free, totalizando volume de 25 μL por reação. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada em termociclador Veriti[®] Thermal Cycler (Life Technologies, E.U.A.) por 10 min/ 25°C e 120 min/37°C, seguido de resfriamento a 4°C. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo (em tempo real) utilizando-se Sybergreen (Invitrogen). Para esses ensaios, serão preparadas soluções contendo os primers dos genes-alvo e *housekeeping* (10 nM) e o mix de Sybergreen (Invitrogen). Essa solução será aliquotada em tubos eppendorf (10 μL /poço) e o cDNA de cada amostra, dos grupos experimentais descritos, adicionado ao tubo (2 μL /poço). As soluções com cDNA foram distribuídas nos poços da placa de experimento, totalizando volume final da reação de 12 μL /poço.

Os *housekeeping* 18S e 26S foram testados e analisados através do software RefFinder, para a escolha do melhor gene normalizador para os experimentos, sendo escolhido o gene 26S. Os ensaios foram realizados em StepOneTM Real-Time PCR System

(Applied Biosystems) nas seguintes condições: Holding Stage: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos (Cycling Stage) de 15s a 95 °C e 1 min a 60 °C, 15s a 95 °C, 1 min a 60°C e 15s a 95°C, com aumento gradativo de 0,3°C (Melt Curve Stage). Antes do início de cada ensaio, foi realizada curva-teste (iniciando em 1:2 até 1:64) para verificação da eficiência do primer/sonda a partir de pool de 2 µL de todas as amostras, a fim de definir a melhor diluição das amostras (com base nos menores valores de Ct) e escolha do método a ser empregado: $\Delta\Delta Ct$ (taxa de eficiência do primer/sonda entre 90 a 110%) ou curva-padrão relativa (taxas de eficiência do primer/sonda inferiores ou superiores a 90 e 110%), conforme recomendações contidas no manual da Applied Biosystems (Figuras 6-10). Para os ensaios com amostras dos núcleos APO, HMB, hipófise e ovário foram utilizadas amostras diluídas em 1:4, enquanto que para o NSQ foi utilizada a diluição de 1:5, definidas pelo melhor valor de Ct obtido pela curva-teste. As análises foram realizadas através do método $\Delta\Delta Ct$ (Livak; Schmittgen, 2001).

Para PCR semi-quantitativa em Tempo Real (qPCR), do gene *Bmal1* foi utilizado ensaio inventariado por TaqMan® (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) Rn00577590_m1 Arntl (Applied Biosystems) e Rat ACTB 20x (NM_031144.2, Applied Biosystems), como controle endógeno, com cDNA diluído 1:2 para todas as amostras, após realização de curva-teste. As análises foram realizadas pelo método da curva padrão relativa, no qual as amostras são pipetadas de maneira a termos, na mesma placa, uma curva com os pontos 1:2 a 1:64 contendo o controle endógeno + *pool* de amostras da região-alvo e *Bmal1* + *pool* de amostras da região-alvo, bem como, amostras + controle endógeno e amostras + *Bmal1*, totalizando volume final de reação de 12 µL/poço. Os resultados da expressão foram calculados pela divisão do valor do gene alvo normalizado pelo controle endógeno pelo valor do grupo calibrador. Valores acima de 0,2 entre as replicatas foram automaticamente excluídos. Todos os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de expressão gênica.

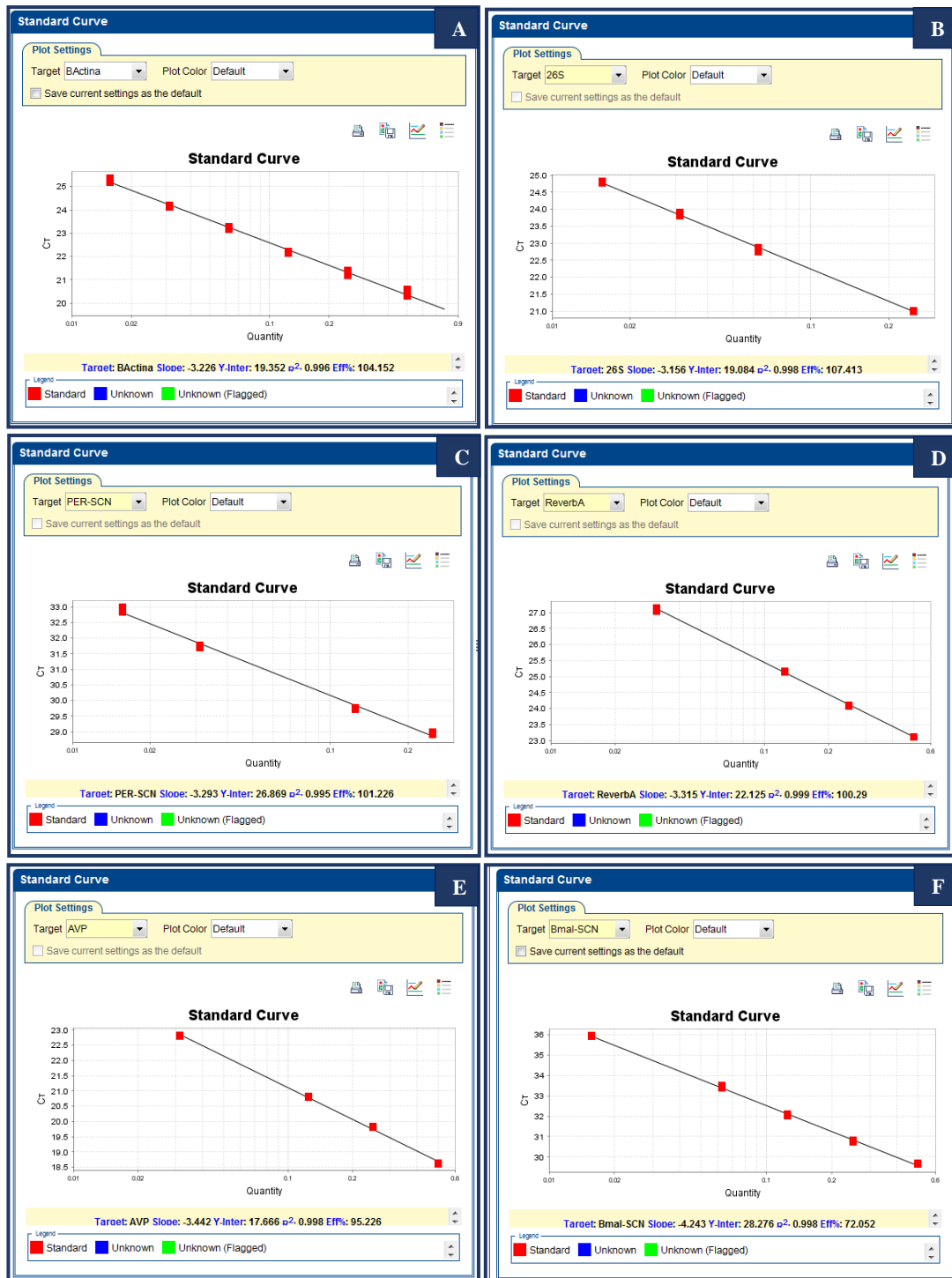


Fig. 6 – Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR no NSQ realizadas a partir de *pool* de amostras dos grupos experimentais. (A) Gene constitutivo β actina; (B) Gene constitutivo 26S; (C) Gene Per2; (D) Gene Rev-erb α ; (E) Gene AVP; (F) Gene Bmal1. R^2 =coeficiente de determinação, Eff%= taxa de eficiência de amplificação do primer/sonda

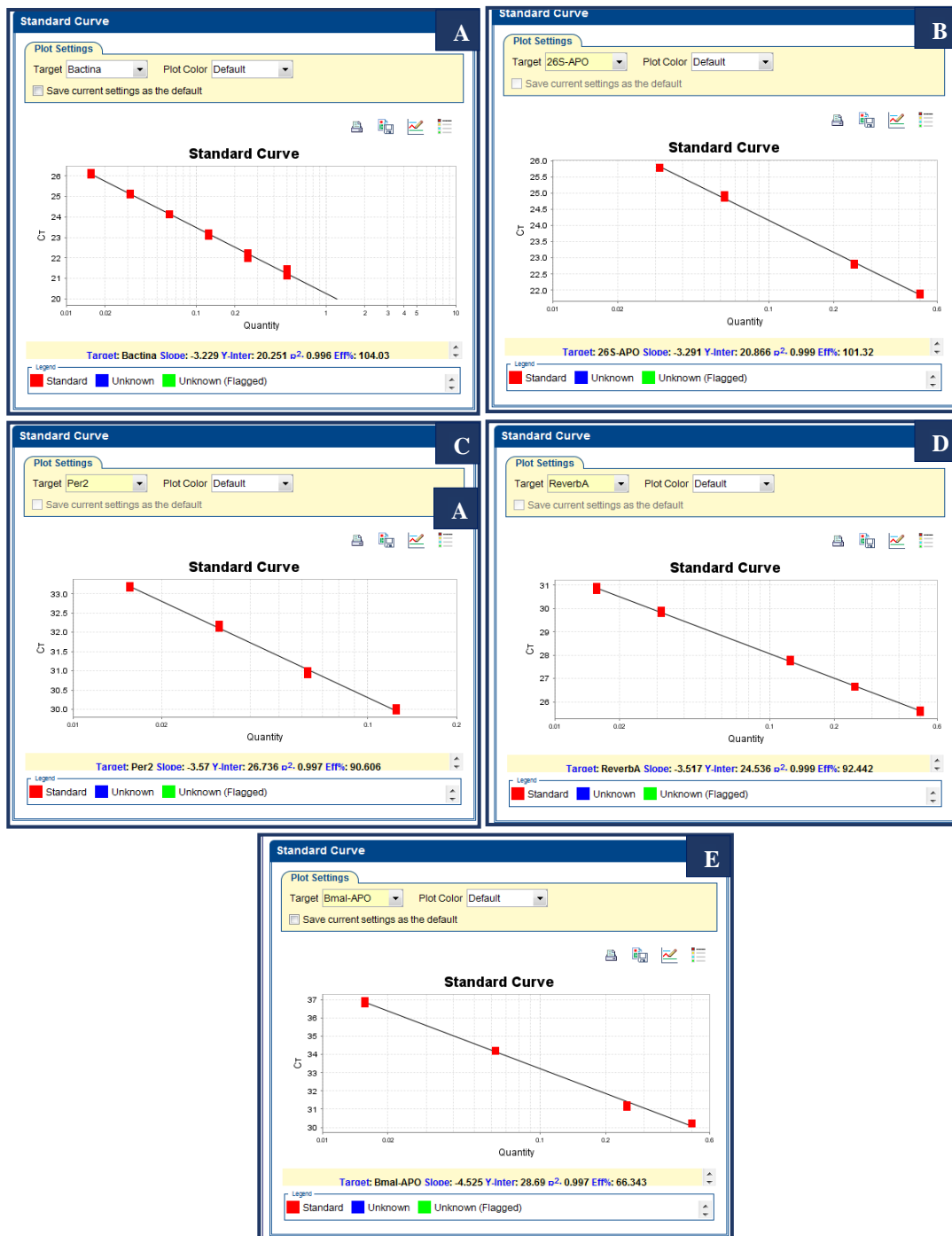


Fig. 7 – Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR na APO realizadas a partir de pool de amostras dos grupos experimentais. (A) Gene constitutivo β actina; (B) Gene constitutivo 26S; (C) Gene Per2; (D) Gene Rev-erb α ; (E) Gene Bmal1. R^2 =coeficiente de determinação, Eff%= taxa de eficiência de amplificação do primer/sonda.

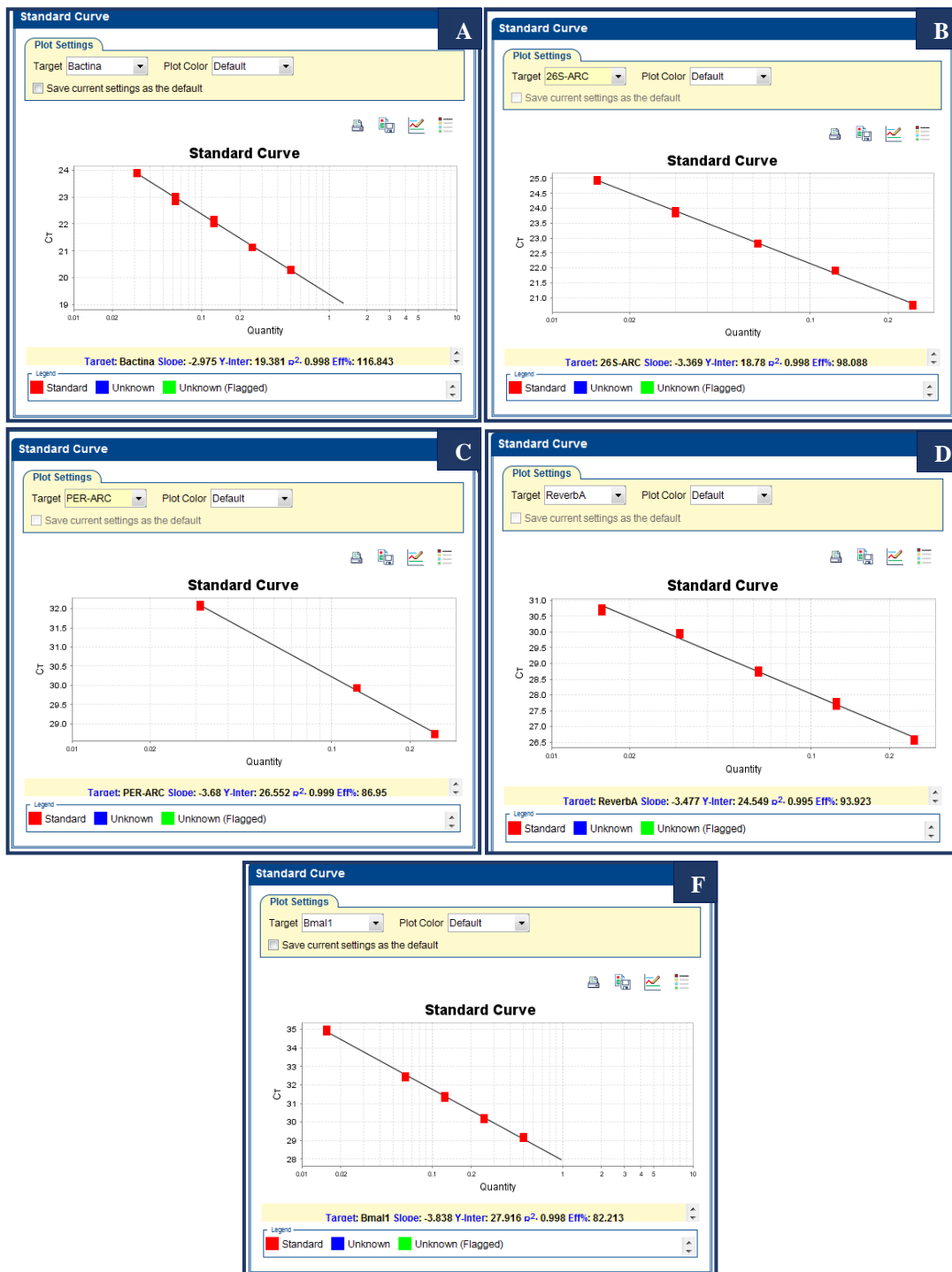


Fig. 8 – Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR no HMB realizadas a partir de pool de amostras dos grupos experimentais. (A) Gene constitutivo β actina; (B) Gene constitutivo 26S; (C) Gene Per2; (D) Gene Rev-erba; (E) Gene Bmal1. R^2 =coeficiente de determinação, Eff%= taxa de eficiência de amplificação do primer/sonda.

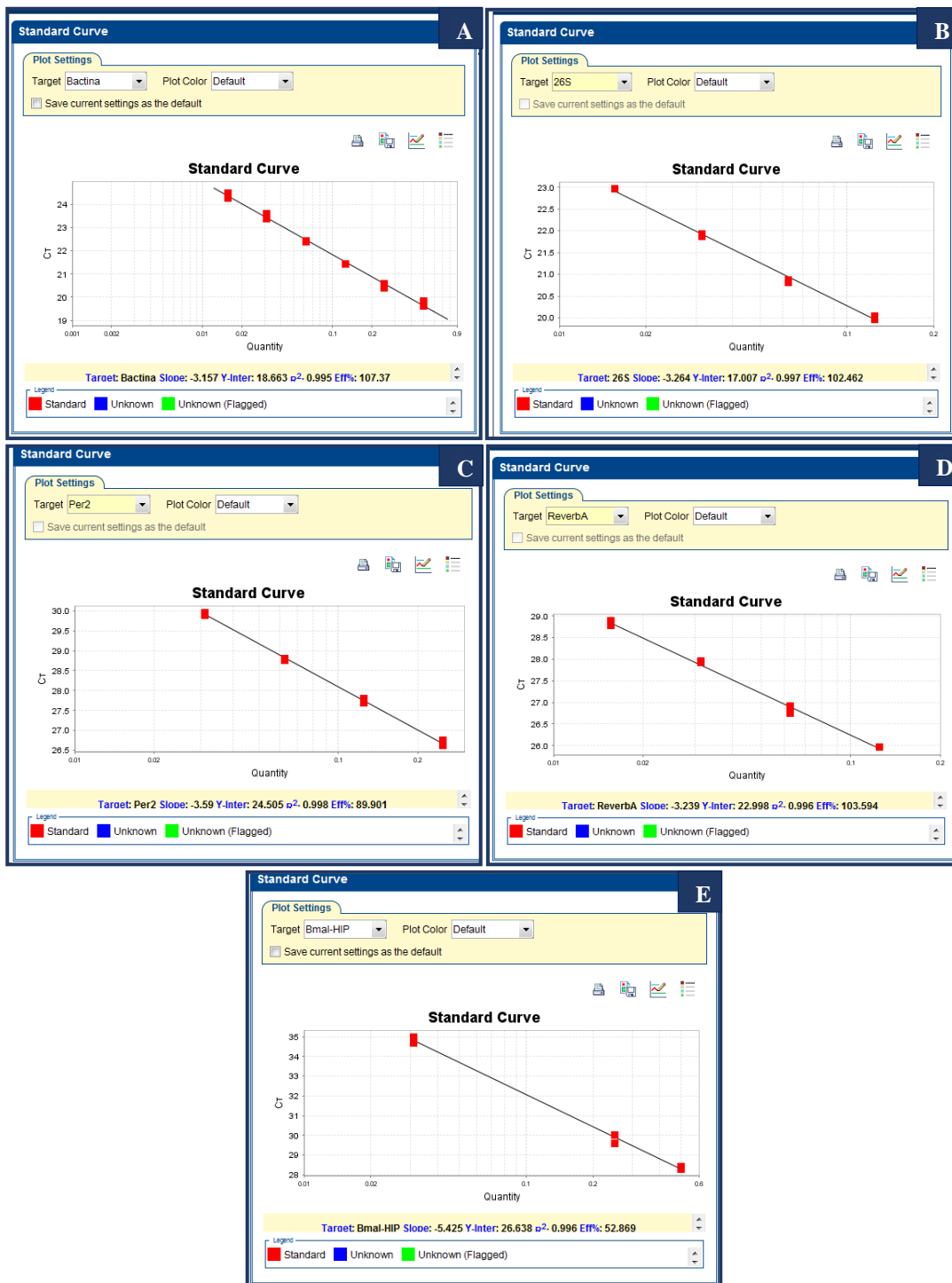


Fig. 9 – Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR na adenohipófise realizadas a partir de pool de amostras dos grupos experimentais. (A) Gene constitutivo β actina; (B) Gene constitutivo 26S; (C) Gene Per2; (D) Gene Rev-erba; (E) Gene Bmal1. R^2 =coeficiente de determinação, Eff%= taxa de eficiência de amplificação do primer/sonda

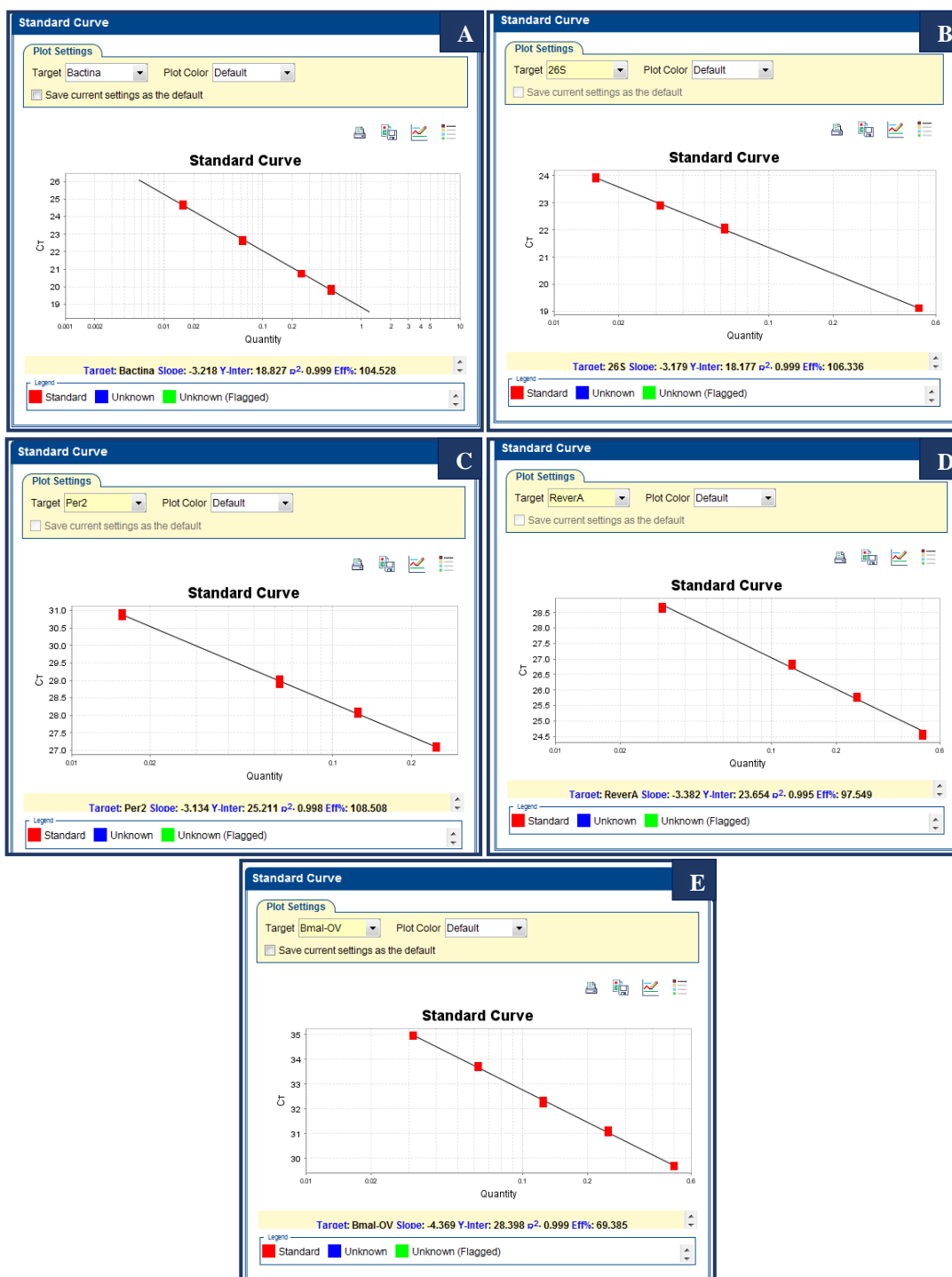


Fig. 10 – Curvas-teste de eficiência de sonda/primer para qPCR no ovário realizadas a partir de pool de amostras dos grupos experimentais. (A) Gene constitutivo β actina; (B) Gene constitutivo 26S; (C) Gene Per2; (D) Gene Rev-erb α ; (E) Gene Bmal1. R^2 =coeficiente de determinação, Eff%= taxa de eficiência de amplificação do primer/sonda

Template access numbers	Primers and probes	Concentração Final
<i>mPer2</i> (NM_031678.1)	Forward: 5'-GGTCGAGCAAAGGACCGAC-3' Reverse: 5'-GCTGCTCATGTCCACGTCTT-3' Forward: 5'-TGCCTGCTACTTCCAGAAGTGC-3'	10 µM
<i>mAVP</i> (NM_016992.2)	Reverse: 5'-AGGGGAGACACTGTCTCAGCTC-3'	10 µM
<i>mRev-erba</i> (NM_001113422.1)	Forward: 5'-ACAGCTGACACCACCCAGATC-3' Reverse: 5'-CATGGGCATAGGTGAAGATTCT-3'	10 µM
26S RNA (NM_013224)	Forward: 5'-CGATTCCCTGACAACCTTGCTA-3' Reverse: 5'-CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT-3'	10 µM
<i>mBMAL1</i> (NM_024362.2)	(Rn00577590_m1)	
<i>mACTB</i> (NM_031144.2)	(Rn00667869_m1)	*

Tabela1 – Sequências e concentrações dos primers utilizados e número de acesso do gene. * Conforme ensaio inventariado fornecido pelo fabricante (Thermofisher Scientific).

5.4. Experimento II: Atividade dos neurônios vasopressinérgicos do núcleo supraquiasmático (NSQ) de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.

5.4.1. Coleta das Amostras

5.4.1.1. Perfusão

Animais adultos e senis foram perfundidos transcardiacamente nos horários das 08, 14, 20 e 02 horas do diestro. Para a experimentação, os animais foram previamente anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Syntec® 80 mg/Kg pc/ip) e Cloridrato de Xilazina (Syntec® 40 mg/Kg pc/ip) e tiveram sua região torácica exposta para incisão de cânula no ventrículo esquerdo. Após o clampeamento da artéria aorta abdominal foi introduzida cânula conectada à bomba de perfusão (Miniplus 3 GILSON®) até atingir a artéria aorta ascendente para o clampeamento de todo o conjunto (músculo cardíaco e bomba).

Durante a perfusão, utilizou-se aproximadamente 40 mL de tampão fosfato salina (PBS) a 0,01 M para a lavagem sistêmica do animal (fluxo 8 mL/min, por aproximadamente 5 min) e limpeza do cérebro. Posteriormente, volume aproximado de 400 mL de paraformaldeído (PFA) a 4% (obtido a partir da mistura de solução PBS 0,2 M e PFA 8% na proporção 1:1) foi injetado no animal para a fixação do tecido cerebral, durante 50 minutos. Após a remoção, o encéfalo foi mantido no mesmo fixador (PFA 4%) durante 2 horas, em geladeira. Após este período, foi retirado e imerso em solução de sacarose 30% diluída em PB 0,2 M, onde permaneceu até a saturação. Em seguida, o mesmo foi cuidadosamente seco em papel absorvente para ser congelado através de mergulho rápido em isopentano (Sigma Aldrich® St. Louis, Missouri, EUA) à -50°C durante 1 min. Logo após, foi armazenado a -70° C para processamento e análise posteriores.

5.4.1.2. Imunoistoquímica

Obtenção dos cortes

Cortes coronais seriados de 30 µm da região do NSQ (CARD et al., 1988) (Figura 11) foram obtidos em criostato (Leica® CM3050 S) a -22° C, conforme Atlas de Watson e Paxinos para coordenadas estereotáxicas em cérebro de rato (2007), armazenados em tubos com 1,5 mL de solução crioprotetora e estocados a -20°C para serem processados imunoistoquimicamente um em cada série de quatro cortes (distanto 120 µm/série) para cFos/AVP.

Preparação do tecido

A imunoistoquímica foi realizada pelo método “free-floating”. Antes do início da imunoistoquímica os cortes foram lavados três vezes, por 5 minutos, em PB 0.01M, pH=7.2, para remoção da solução crioprotetora. Todas as etapas da preparação do tecido foram realizados à temperatura ambiente, com soluções diluídas em PB 0.1M, pH 7.2, intercalados por três lavagens com PB 0.01M durante 5 minutos.

Os cortes foram imersos em água oxigenada (H₂O₂ 1%) durante 30 minutos, para eliminação da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram lavados com PB 0.01M até a eliminação da água oxigenada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 60 minutos em albumina bovina (BSA 5%).

Incubação com os anticorpos

Uma vez que cFos é considerado marcador celular de atividade neuronal (PETERFI et al., 2004) e que a porção dorsomedial do NSQ possui ritmo de produção espontânea desta proteína (SUMOVA et al., 1998), foi realizada dupla marcação para cFos/AVP nos grupos experimentais.

Um em cada quatro cortes foi incubado à temperatura ambiente e sob agitação por 18h com anticorpo policlonal produzido em coelho (1:10.000; anti cFos AB5, PC38, Calbiochem®), em solução contendo TX-100 0,3% e soro normal de cabra (S1000 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 2% em PB 0,1M. 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 1:200 em PB 0,1M contendo TX-100 0,3%, durante 1h. Após as lavagens com PB 0,01M, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (1:100; KIT ABC Elite PK 6000, Vectastain) por 60 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado o substrato cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (0,075 mg/mL DAB, Sigma), intensificado com solução de sulfato de níquel (NiSO₄) e cloreto de cobalto (CoCl₂) 1% (Êxodo Científica®, Sumaré, Brasil) acrescidos de 0,5 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em tampão fosfato 0,1M (pH=7.2), por 23 minutos em média. A reação foi interrompida transferindo-se os cortes para o PB0,01M e novo bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com BSA 5% por 1h30 min. Posteriormente foram incubados com o anticorpo anti-AVP, produzido em coelho (anti-AVP, Bachem T4563), diluído 1:20.000 em solução de PB 0,1M contendo TX-100 0,3% e soro normal de cabra 2% (S1000 Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA), durante 48 h à 4°C. Depois de lavados, os cortes foram incubados com 2º anticorpo biotilado, anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000, Vector), diluído 1:200 em solução contendo TX-100 0,3% e soro normal de cabra 2% em PB 0,1M durante 1 h. Após as lavagens com PB 0,01M, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (1:100, KIT ABC Elite PK 4100, Vectastain), por 60 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado DAB (0,075 mg/mL e 0,3 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em tampão fosfato (pH=7,2), por 15 minutos e a reação foi interrompida transferindo-se os cortes para o PB 0,01M.

Montagem dos cortes

Os cortes imersos em PBS foram montados em lâminas gelatinizadas e após secarem por algumas horas, foram desidratados em álcool etílico nas concentrações de 75, 95 e 100% e diafanizados em xilol, para serem recobertos por lamínula com o uso de Entelan (Merck) e guardadas até o momento da análise.

Análises imunoistoquímicas

Utilizando-se microscópio óptico (Leica DM 4000B LED) associado a sistema para análise de imagens (LAS V.4) foi realizada contagem bilateral dos neurônios duplamente imunorreativos à cFos e AVP na porção dorsomedial em aumento de 400X. Foram considerados nesta análise neurônios vasopressinérgicos com alta e média intensidade de marcação nuclear.

Após serem fotografados (câmera Leica DFC 450), os cortes histológicos do NSQ de cada animal (Figura 18) foram cuidadosa e individualmente analisados, de modo que a contagem bilateral dos neurônios vasopressinérgicos imunorreativos à cFos ocorresse nas secções comuns a todos os animais. Nesta análise foi utilizada objetiva de 40 X e foram consideradas apenas as regiões do bregma -0.60 mm e -0.72 mm (plates 38 e 39) do atlas para coordenadas estereotáxicas em cérebro de rato de Paxinos (PAXINOS; WATSON, 2007), conforme Figura 11

abaixo:

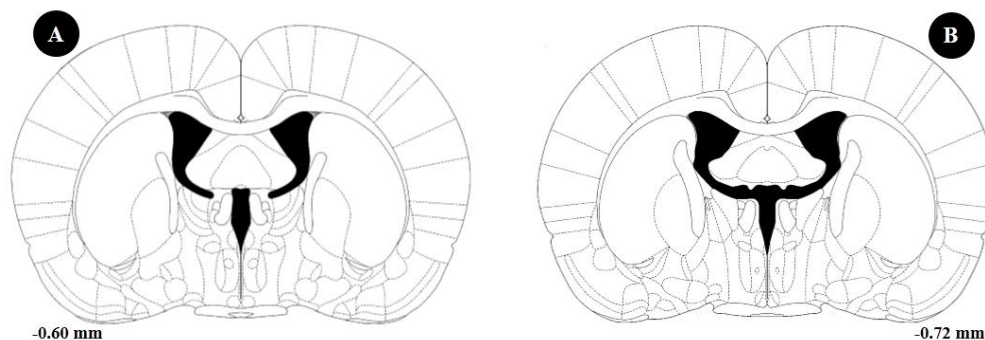


Fig. 11 – Secções médio-caudais do NSQ consideradas em todos os grupos experimentais para a contagem de neurônios vasopressinérgicos imunorreativos à cFos. (A) Bregma -0.60 mm (plate 38) e (B) Bregma -0.72 mm (plate 39).

5.5. Experimento III: Determinação das concentrações plasmáticas de FSH e LH de ratas cíclicas em diestro e com ciclo irregular em diestro persistente.

As concentrações plasmáticas de LH, FSH foram determinadas por método de radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo utilizando reagentes provindos do National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA, Torrance, CA). Os anticorpos específicos (anti-rat) utilizados foram LH-S10, FSH-S11 diluídos em tampão fosfato com soro de coelho. As preparações de referências padrões LH- RP3 LH, FSH-RP3 ng/mL foram diluídas em tampão fosfato gel de 0,1% (0,01 M, pH = 7,5). Os hormônios foram iodinados e purificados no Laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Brasil), onde também foi produzido, em ovelha, o anticorpo inespecífico para precipitação da reação nos ensaios. Todas as amostras foram dosadas em duplicata no mesmo ensaio. A dose mínima detectável foi de 0,04 ng/mL para LH, 0,09 ng/mL para FSH. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram 1,8% e 3% para LH e FSH, respectivamente.

5.6. Análise estatística

Após realização do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, as diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de duas vias usando Graph Pad Prism[®] software (CA, USA), versão 7.0 para Windows, seguido do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos nos gráficos utilizando-se os valores da média \pm EPM . O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ para todas as comparações.

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba, Bmal1 e AVP RNAm no NSQ e Per 2, Rev-erba, Bmal1 na APO e HMB de ratas adultas cíclicas em diestro e senis com ciclos irregulares em diestro persistente.

6.1.1 Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba, Bmal1 e AVP RNAm no NSQ

Os resultados de expressão relativa de RNAm para genes de relógio relacionados com as alças principal e auxiliar de inibição transcripcional/translacional no eixo HPG demonstram alterações temporais na amplitude do ritmo circadiano em animais senis com idade de 18 meses, cujos ciclos são irregulares e permanecem em persistente diestro. Análise estatística para Rev-erba, Bmal1 e AVP no NSQ apontou interação dos fatores idade e fotoperíodo ($\alpha\text{xb}_{\text{Rev-erba}} < 0,0001$; $\alpha\text{xb}_{\text{Bmal1}} < 0,001$ e $\alpha\text{xb}_{\text{AVP}} < 0,0001$). Observa-se que há maior expressão às 20h do perfil gênico de Per2 (Fig. 12A, E) entre os grupos, com conseqüente alteração de amplitude e no perfil de expressão entre o período claro e escuro. O grupo em diestro persistente não apresentou diferença estatística entre os horários da fase clara e escura, enquanto que o grupo de ratas adultas cíclicas no diestro (CD) apresentou menor expressão do gene às 8h ($p < 0,0001$) e 14h ($p < 0,05$) comparado com às 20h. A comparação intergrupos também não apontou diferença estatística.

A expressão temporal para RNAm de Rev-erba no NSQ do grupo cíclico foi maior às 14h ($p < 0,0001$) diminuindo às 20 e 02h, enquanto que para os animais com ciclo irregular em diestro persistente (IDP), esta expressão quase não se altera, sendo maior às 20h em relação às 8h ($p < 0,05$) (Figura 12B, F). Diferenças temporais intergrupos foram observadas às 14 ($p < 0,01$) e às 20h ($p < 0,01$), com interação da idade e fotoperíodo extremamente significativa ($\alpha\text{xb} < 0,0001$) (Figura 12B).

Diferenças estatísticas na expressão relativa de RNAm para Bmal1 foram observadas na

fase clara do grupo cíclico em relação à fase escura ($p_{14 \times 20h} < 0,01$; $p_{8 \times 20h} < 0,0001$; $p_{8 \times 02h} < 0,01$), entretanto nos animais IDP não houve diferenças estatísticas (Figura 12C,G). Foi observada interação idade e fotoperíodo ($p < 0,001$). A vasopressina nos animais cíclicos foi maior às 02h em relação às 8h ($p < 0,01$); nos animais senis foi maior às 20 e 2h em relação aos horários das 8 ($p < 0,0001$) e 14h ($p < 0,0001$) (Fig. 11D, H). A interação da idade e fotoperíodo foi extremamente significativa ($p < 0,0001$) com diferença entre os grupos às 20h ($p < 0,0001$).

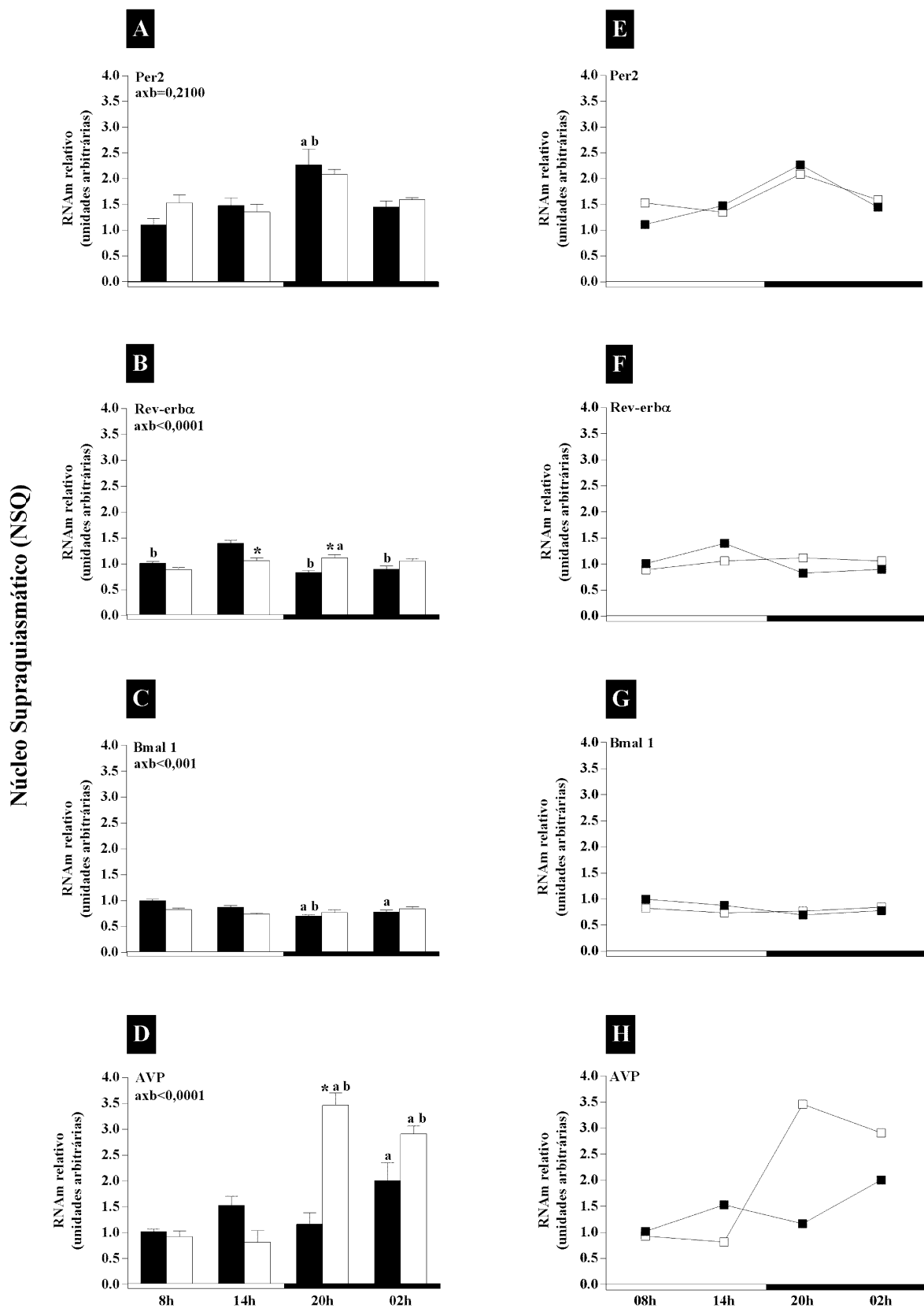


Fig. 12 - Oscilações diárias na expressão relativa de RNAm para Per 2, Rev-erba, Bmal1 e AVP no NSQ (n=3-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00,

quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Todas as amostras foram coletadas seis horas após o primeiro horário (8h), durante 24 horas. Ciclo claro / escuro 12/12 h. (A, E) Expressão temporal relativa de RNAm para Per2; (B, F) Rev-erb α ; (C, G) Bmal1 e (D, H) AVP em animais com ciclo regular em diestro e ciclo irregular em diestro persistente * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^avs 8h; ^bvs.14h e ^cvs. 20h. axb = interação de idade e fotoperíodo. axb_{Per2}=0,2100; axb_{ReverbA}<0,0001; axb_{Bmal1}<0,001; axb_{AVP}<0,0001 Replicatas com variação acima de 0,2 foram automaticamente excluídas dos grupos. $\Delta\Delta Ct$ para Per2 e ReverbA; curva-padrão relativa para Bmal1.

6.1.2. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erb α e Bmal1 na APO

A análise para RNAm de Per2, Rev-erb α e Bmal1 na APO apontou interações dos fatores idade e fotoperíodo para Per2 e Rev-erb α (axb_{Per2}<0,0001, axb_{Rev-erb α} <0,05, axb_{Bmal1}= 0,0834). O grupo com IDP revelou maior expressão gênica de RNAm para Per2 às 20h comparado com os demais horários (p<0,0001) enquanto que o grupo CD apresentou diferença estatística durante os horários da fase escura em relação às 8h (p_{20h}<0,0001 e p_{02h}<0,05) (Figura 13A, D). Rev-erb α em animais CD apresentou maior expressão às 14h (p_{14hx08h}<0,01; p_{14hx02h}<0,001) e às 20h (p_{20hx08h}<0,05; p_{20hx02h}<0,001), quando comparados às 8h e às 02h (Figura 13B, E). Já os animais com IDP expressaram menor quantidade de RNAm para Rev-erb α , com quantidades semelhantes expressas na fase clara e início da fase escura, porém com baixas quantidades às 02h (p_{08x02h}<0,0001; p_{14x02h}<0,001; p_{20x02h}<0,0001) e não diferindo das ratas CD neste mesmo horário.

Bmal1 (Fig. 13C, F) em animais CD apresentou diferença estatística nos horários das 8 (p<0,05) e 02h (p<0,01), comparado com às 20h, contrastando com o grupo em diestro persistente, cuja diferença foi observada no horário das 14h em relação às 20h (p<0,05). Ratas CD e IDP, quando comparadas temporalmente, mostraram diferenças às 20h para Per2 e às 14h para Rev-erb α .

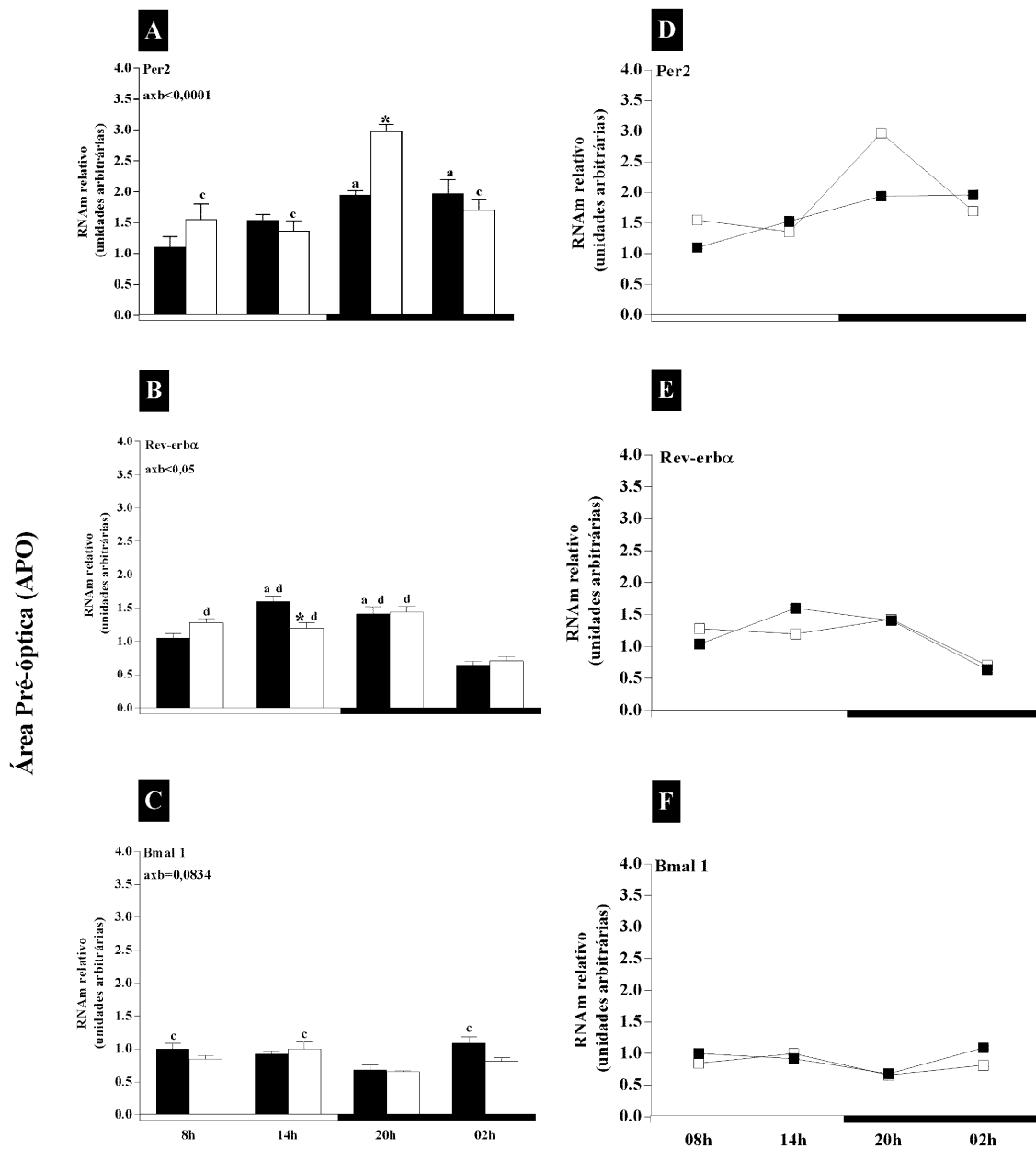


Fig. 13 - Oscilações diárias na expressão relativa de RNAm para Per 2, Rev-erba e Bmal1 na APO (n=3-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00, quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Todas as amostras foram coletadas seis horas após o primeiro horário (8h), durante 24 horas. Ciclo claro / escuro 12/12 h. (A, D) Expressão temporal relativa de RNAm para Per2; (B, E) Rev-erba; (C, F) Bmal1 em animais com ciclo regular em diestro e ciclo irregular em diestro persistente. * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^avs 8h; ^cvs. 20h e ^dvs. 02h. axb = interação de idade e fotoperíodo. axb_{Per2}<0,0001; axb_{Rev-erba}<0,05. Replicatas com variação acima de 0,2 foram automaticamente excluídas dos grupos. ΔΔCt para Per2 e Rev-erba; curva-padrão relativa para Bmal1.

6.1.3. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 no HMB

Na região do HMB o RNAm para Per2 foi significativamente menor durante a fase clara e início da fase escura no grupo em IDP ($p < 0,0001$), enquanto o CD mostrou diferença às 02h em relação às 14h ($p < 0,01$) (Figura 14A, D). Rev-erba apresentou maior expressão em ratas cíclicas às 8 e 14h em relação às 20 e 02 h ($p < 0,05$). O gene Bmal1 revelou-se estatisticamente significativo às 14h ($p < 0,001$) e às 02 h ($p < 0,01$) em relação às 20h no grupo cíclico. O grupo IDP não apresentou diferenças entre o fotoperíodo. Diferenças entre os grupos CD e IDP foram observadas nos horários das 8h ($p < 0,0001$), 14h ($p < 0,0001$) e 20h ($p < 0,0001$) para Per2 e às 8h ($p < 0,01$) e 14h ($p < 0,0001$) para Rev-erba (Figura 14A-B; D-E). Interação dos fatores idade e fotoperíodo ocorreu somente para as análises de Per2 ($axb < 0,0001$) e Rev-erba ($axb < 0,0001$) (Figura 14A-C; D-F).

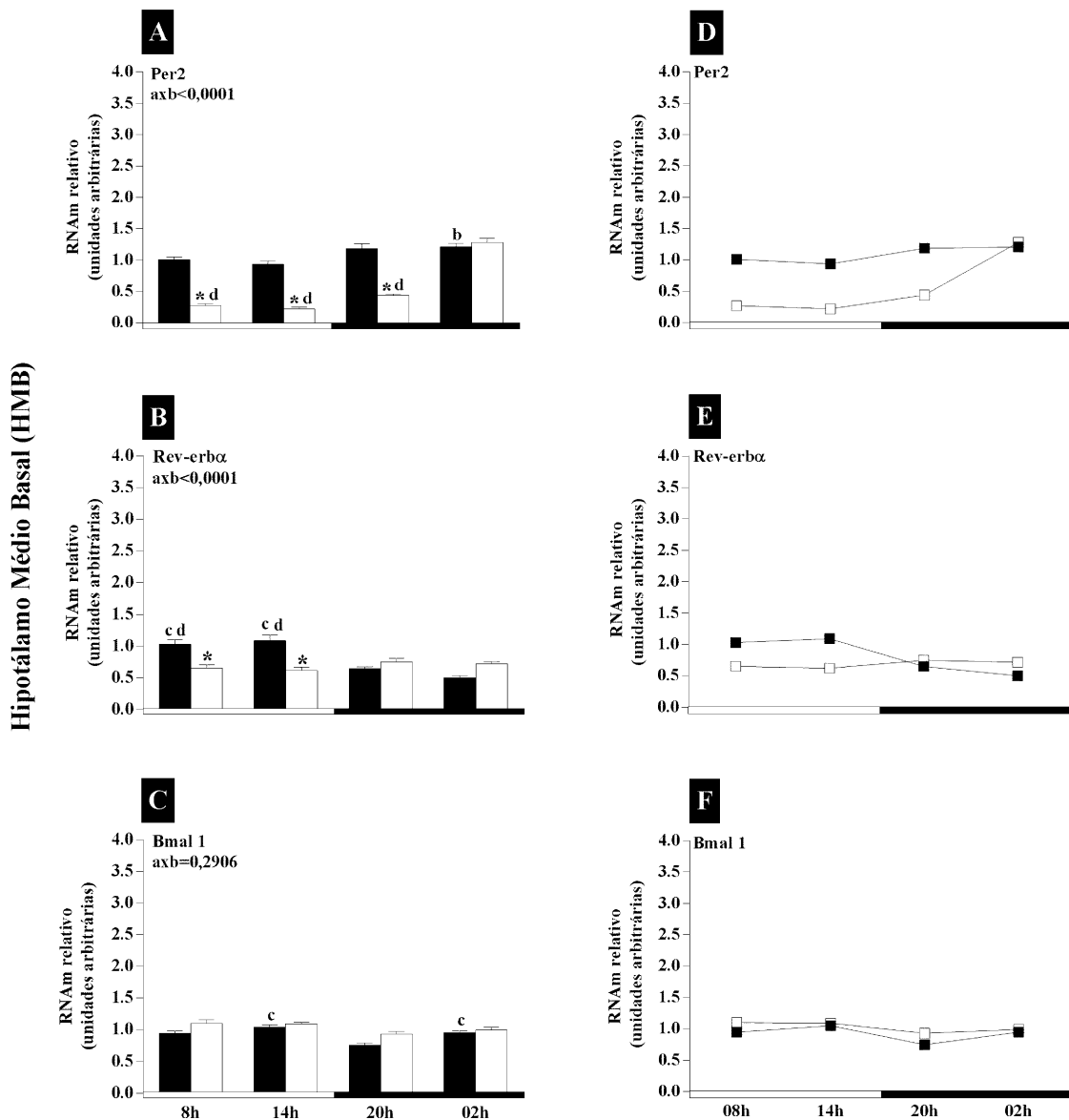


Fig. 14 - Oscilações diárias na expressão relativa de RNAm para Per 2, Rev-erbα e Bmal1 no HMB (n=3-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00, quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Todas as amostras foram coletadas seis horas após o primeiro horário (8h), durante 24 horas. Ciclo claro / escuro 12/12 h. (A, D) Expressão temporal relativa de RNAm para Per2; (B, E) Rev-erbα e (C, F) Bmal1 em animais com ciclo regular em diestro e ciclo irregular em diestro persistente. * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^bvs.14h; ^cvs. 20h e ^dvs. 02h. axb = interação de idade e fotoperíodo. axb_{Per2}<0,0001; axb_{Rev-erbα}<0,0001; axb_{Bmal1}=0,2906. Replicatas com variação acima de 0,2 foram automaticamente excluídas dos grupos. ΔΔCt para Per2 e Rev-erbα; curva-padrão relativa para Bmal1.

6.1.4. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 na Adenohipófise

A expressão de RNAm para Per2 na adenohipófise de ratas CD (Figura 15A, D) demonstrou expressiva interação dos fatores idade e fotoperíodo ($axb_{Per2} < 0,0001$), com pico de expressão do gene às 20h ($p_{08h \times 20h} < 0,0001$; $p_{14h \times 20h} < 0,0001$) e mínimo de expressão às 8h. O grupo IDP revelou diferença estatística às 20h em comparação às 8h ($p < 0,05$). Ratas CD e IDP quando comparadas, apontaram diferenças às 20h ($p < 0,0001$). A análise do gene Rev-erba também demonstrou interação expressiva dos fatores idade e fotoperíodo ($axb < 0,001$). O grupo CD (Figura 15B, E) exibiu maior expressão às 20h em relação aos horários das 8h e 02h ($p < 0,001$). O grupo IDP revelou máximo de expressão às 20h comparado aos horários das 8h, 14h e 02h ($p < 0,0001$). Diferenças estatísticas para o RNAm de Bmal1 (Figura 15C, F) foram encontradas nos mesmos horários em ratas CD e IDP, sendo 14h, 20h e 02h os horários de menor expressão do gene em relação às 8h ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$ para IDP 8h vs. 02h). Neste gene não foi observada interação dos fatores idade e fotoperíodo ($axb = 0,3964$). Ratas CD e IDP quando comparadas, apresentaram diferenças significantes às 14h ($p < 0,01$), 20h ($p < 0,0001$) e 02h ($p < 0,0001$) para Bmal1, Per2 e Rev-erba, respectivamente.

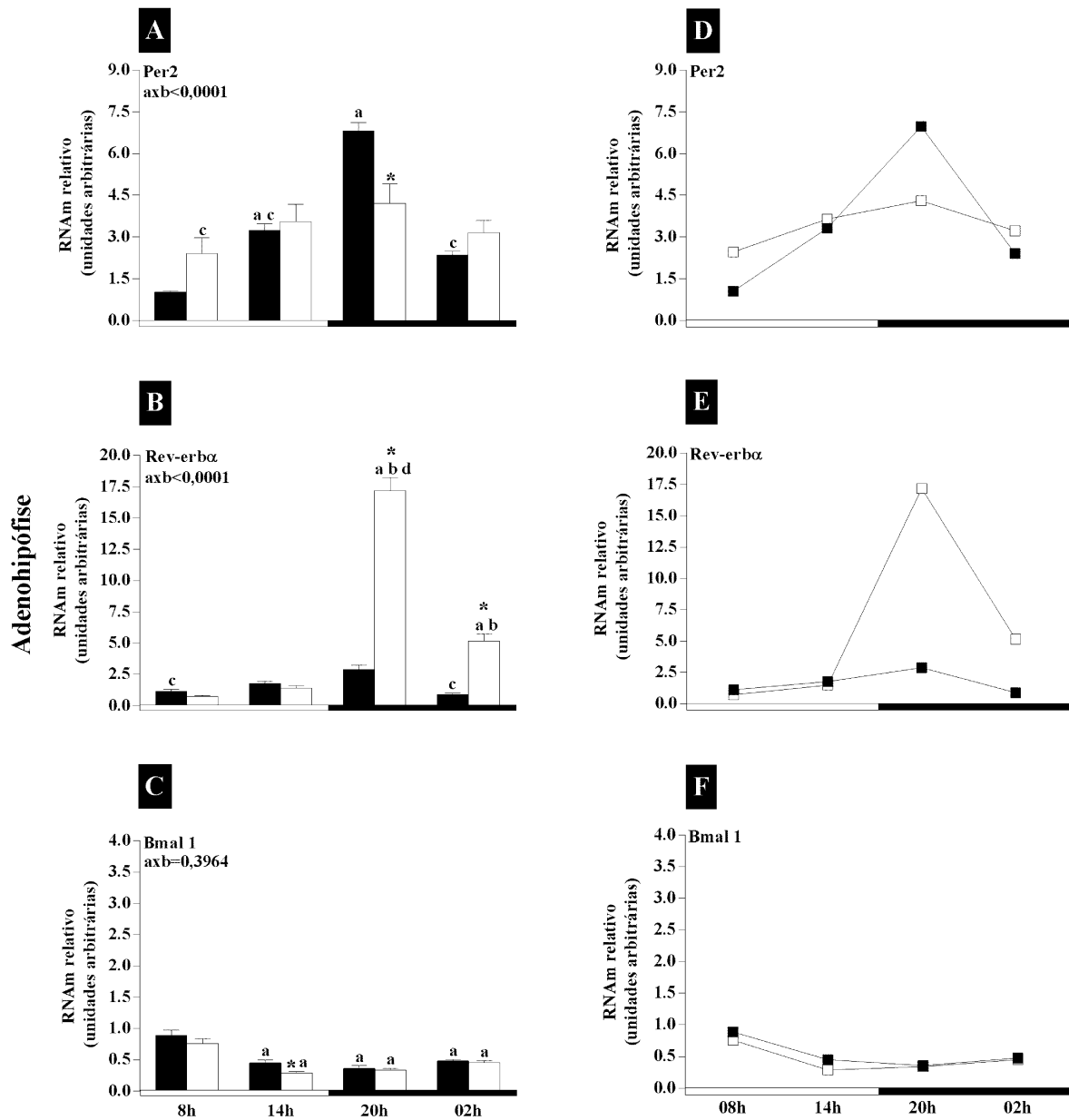


Fig. 15 - Oscilações diárias na expressão relativa de RNAm para Per 2, Rev-erba e Bmal1 na hipófise (n=3-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00, quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Todas as amostras foram coletadas seis horas após o primeiro horário (8h), durante 24 horas. Ciclo claro / escuro 12/12 h. (A, D) Expressão temporal relativa de RNAm para Per2; (B, E) Rev-erba e (C, F) Bmal1 em animais com ciclo regular em diestro e ciclo irregular em diestro persistente * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^avs.08h; ^bvs.14h e ^dvs. 02h. axb = interação de idade e fotoperíodo. axb_{Per2}<0,0001; axb_{Rev-erba}<0,0001; axb_{Bmal1}=0,3964. Replicatas com variação acima de 0,2 foram automaticamente excluídas dos grupos. $\Delta\Delta Ct$ para Per2 e Rev-erba; curva-padrão relativa para Bmal1.

6.1.5. Expressão relativa de RNAm para Per2, Rev-erba e Bmal1 no Ovário

O tecido ovariano dos animais IDP apresentou maior expressão de RNAm para Per2 do que os animais cíclicos na mesma fase (Figura 16A, D), sendo que o maior ponto de expressão no grupo CD foi às 20h ($p < 0,0001$), enquanto que o grupo IDP apresentou diferenças estatísticas às 14h, 20h e 02h às 8h ($p < 0,0001$) e às 20h comparado às 02h ($p < 0,0001$). Diferenças intergrupos foram observadas às 8 h ($p < 0,05$), 14 h e 02 h ($p < 0,0001$). A interação dos fatores idade e fotoperíodo foi extremamente significativa ($axb < 0,0001$), inclusive para os genes Rev-erba e Bmal1 ($axb < 0,0001$) (Figura 16B, E). Os grupos CD e IDP apresentaram perfil de expressão gênica semelhante para Rev-erba, com altos valores de expressão no final da fase clara e início da fase escura. Diferenças estatísticas no grupo CD foram observadas às 14 e 20h em comparação com às 8h ($p < 0,0001$), às 20h ($p < 0,001$) e 02h ($p < 0,0001$) em relação às 14h, e às 20h comparado com as 02h ($p < 0,0001$). O grupo IDP apresentou diferenças estatísticas nos horários das 14 ($p < 0,0001$) e 02h ($p < 0,05$) em relação às 8h, no horário das 20 e 02h ($p < 0,0001$) comparado com às 14h e no horário das 20h em relação às 02h ($p < 0,0001$). Diferenças intergrupos foram verificadas às 8h ($p < 0,001$) e às 20h ($p < 0,0001$).

Expressão significativa para RNAm de Bmal1 (Fig. 16C, F) foi observada em ambos os grupos. Animais CD e IDP tiveram maior expressão às 8h ($p_{CD14 \text{ e } 20h} < 0,001$ e $p_{IDP14 \text{ e } 20h} < 0,0001$) e menor expressão às 14 e 20h em relação às 2h ($p_{CD8 \text{ e } 20h} < 0,0001$; $p_{CD14h} < 0,05$ e $p_{IDP14 \text{ e } 20h} < 0,0001$). Diferença estatística intergrupo foi verificada no horário das 02h ($p < 0,0001$) e a interação dos fatores idade e fotoperíodo foi extremamente significativa ($axb < 0,0001$).

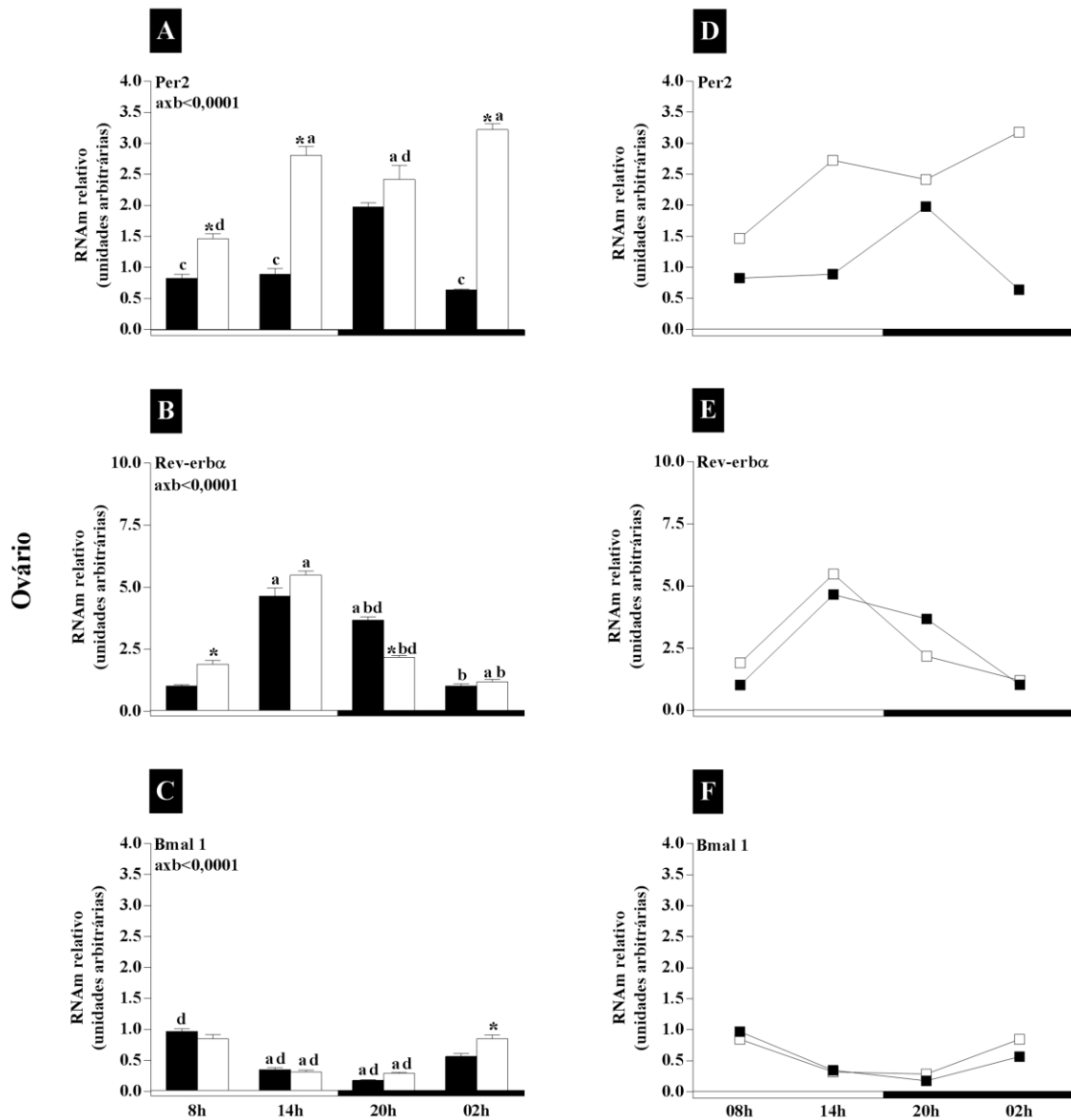


Fig. 16 - Oscilações diárias na expressão relativa de Per 2, Rev-erba e Bmal1 no ovário (n=3-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00, quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Todas as amostras foram coletadas seis horas após o primeiro horário (8h), durante 24 horas. Ciclo claro / escuro 12/12 h. (A, D) Expressão temporal relativa de RNAm para Per2; (B, E) Rev-erba e (C, F) Bmal1 em animais com ciclo regular em diestro e ciclo irregular em diestro persistente * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^avs.08h; ^bvs.14h; ^cvs.20h e ^dvs. 02h. axb = interação de idade e fotoperíodo. $axb_{Per2} < 0,0001$; $axb_{Rev-erba} < 0,0001$; $axb_{Bmal1} < 0,0001$. Replicatas com variação acima de 0,2 foram automaticamente excluídas dos grupos. $\Delta\Delta Ct$ para Per2 e Rev-erba; curva-padrão relativa para Bmal1.

6.2. Análises Imunoistoquímicas

Após análise estatística, observou-se que houve interação da idade e fotoperíodo ($axb < 0,05$). Animais CD não revelaram diferenças estatísticas durante o fotoperíodo, enquanto que os animais IDP demonstraram maior atividade vasopressinérgica às 20h em relação às 08h ($p < 0,05$) e às 02h ($p < 0,001$), bem como às 14h em relação às 02h ($p < 0,05$). A análise intergrupos apontou diferença estatística no horário das 20h ($p < 0,01$) (Fig. 18 A-B).

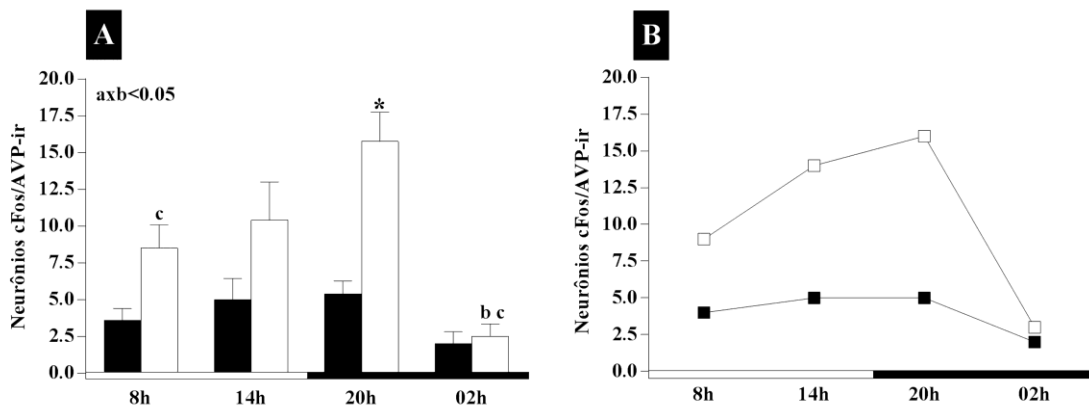


Fig. 18 – Atividade de neurônios cFos/AVP imunorreativos no NSQ ao longo de 24h (A, B). Coletas realizadas a cada seis horas após o primeiro horário (8h) (n=5-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00, quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Ciclo claro / escuro 12/12 h. * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^bvs.14h; ^cvs.20h. axb = interação de idade e fotoperíodo. axb<0.05.

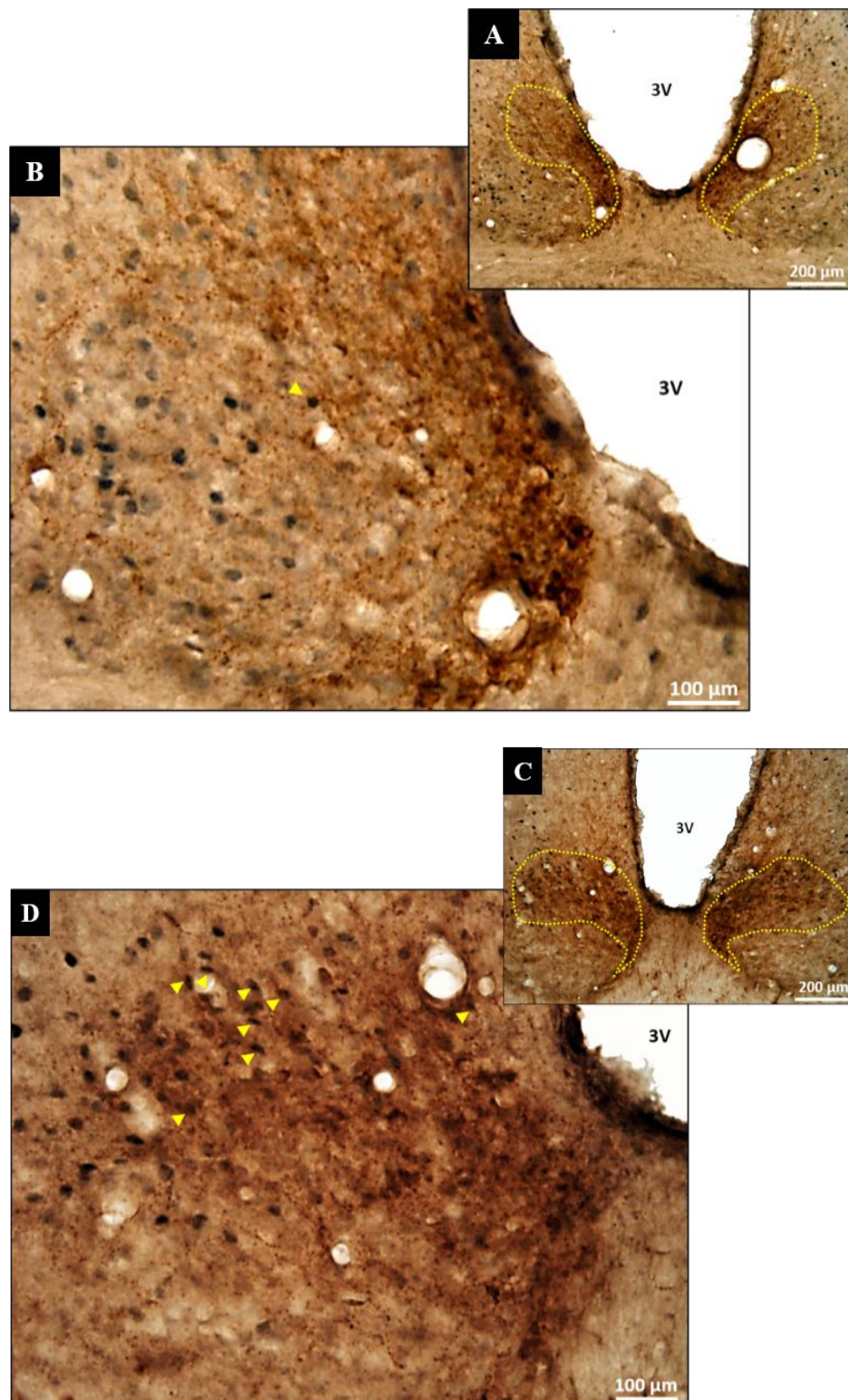


Fig. 18 – Fotomicrografias de neurônios vasopressinérgicos da porção dorsomedial do NSQ duplamente marcados com cFos (setas) às 20h do dia do diestro. Animal CD em aumento de 200x (A) e de 400x (B); Animal IDP em aumento de 200x (C) e de 400X (D)

6.3. Dosagens Plasmáticas de Gonadotrofinas

Análise estatística das concentrações plasmáticas de FSH e LH apontaram interação da idade e fotoperíodo ($\alpha\beta_{\text{FSH}} < 0,0001$ e $\alpha\beta_{\text{LH}} < 0,001$). Os dados de FSH (Fig. 17A, C) para o grupo CD não revelaram diferenças estatísticas, enquanto que para o grupo IDP foram estatisticamente significantes nos horários da 20h e das 02h em comparação com às 08h ($p_{20h} < 0,0001$; $p_{02h} < 0,05$) e às 14h ($p_{20h} < 0,0001$; $p_{02h} < 0,05$), bem como às 02h em comparação com as 20h ($p_{02h} < 0,05$). Análise intergrupos revelou diferença estatística no horário das 08h ($p < 0,0001$).

Os resultados para LH (Fig. 17B, D) no grupo CD não foram significantes. Para os animais IDP houve maior concentração plasmática de LH no início da fase escura quando comparada ao período claro ($p < 0,01$). Animais CD e IDP apresentaram diferenças às 20h ($p < 0,01$).

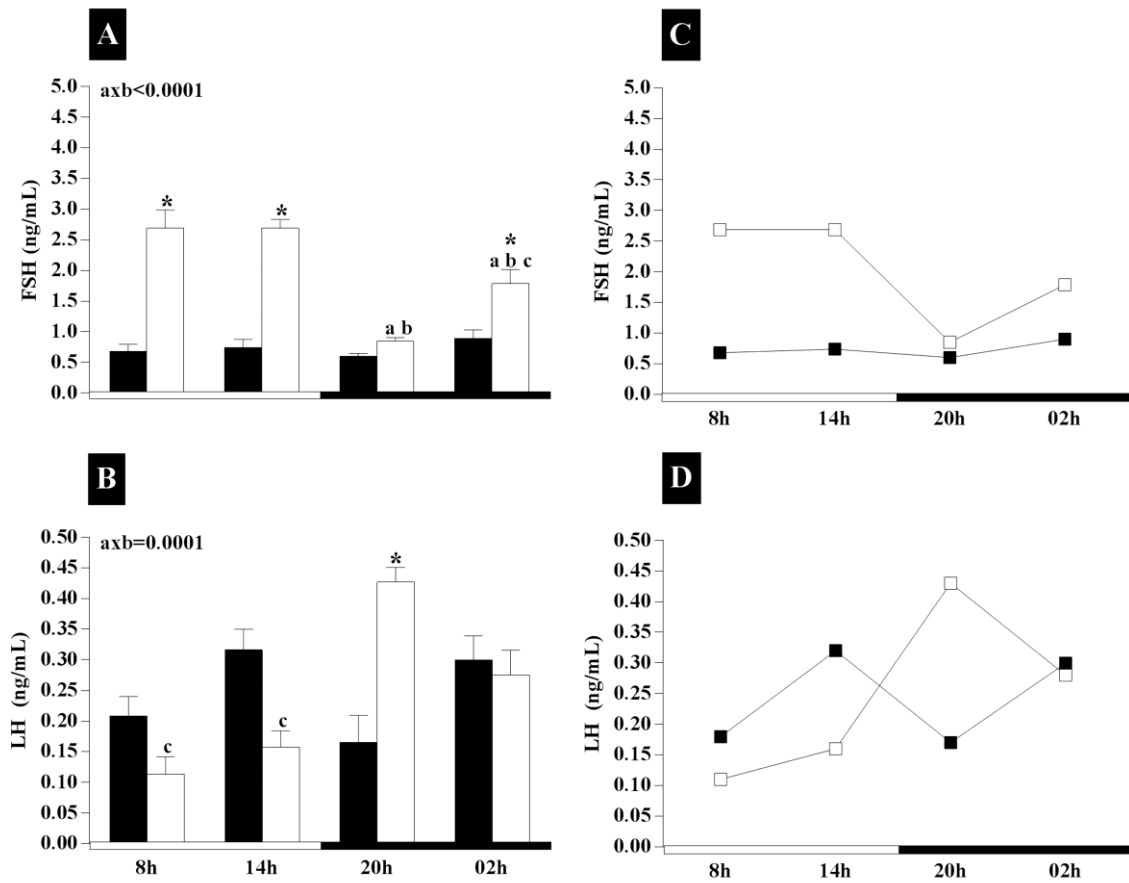


Fig. 17 – Perfil hormonal de gonadotrofinas plasmáticas ao longo de 24h. Coletas realizadas a cada seis horas após o primeiro horário (8h) (n=5-7). Fase clara e escura estão representadas ao longo do eixo “X” pelos respectivos horários. Início da fase clara às 07h00, quando as luzes foram acesas e início da fase escura às 19h00. Ciclo claro / escuro 12/12 h. (A, C) FSH; (B, D) LH. * Indica variação intergrupos no mesmo horário: (■) Cíclico em diestro x (□) Ciclo irregular com diestro persistente. Letras indicam variação temporal dentro do grupo. ^avs.08h; ^bvs.14h; ^cvs.20h. axb = interação de idade e fotoperíodo. axb_{FSH}<0,0001; axb_{LH}<0,001.

DISCUSSÃO

7. Discussão

No presente estudo observou-se, durante o período que antecede a cessação dos ciclos ovulatórios em roedores, alteração na sincronia temporal de autorregulação do sistema *Clock* no eixo HPG de fêmeas. O conhecimento sobre como ocorre o controle dos genes do relógio em ovários, hipófise e hipotálamo de fêmeas durante a transição para a senescência reprodutiva ainda é pouco explorado, sendo a compreensão da relação reprodução/ritmicidade circadiana obtido a partir de animais mutantes ou com lesões no NSQ. É importante ressaltar que o modelo animal utilizado neste estudo infere as alterações fisiológicas centrais e periféricas que ocorrem durante determinado período do organismo, resultando no envelhecimento. Os resultados aqui descritos propiciam esclarecimentos iniciais acerca de questões sobre o modo como alterações nas estruturas do eixo HPG contribuem para a senescência biológica.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *Per2* no NSQ de fêmeas no período de diestro persistente não difere do perfil de expressão de animais cíclicos em diestro. No entanto, durante a fase clara do período analisado nota-se que os animais IDP possuem ligeiro aumento de expressão do gene que se mantém no final desta fase, diferentemente do que ocorre com os animais CD. Fêmeas *Wistar* no período de periostropausa também revelaram que a expressão gênica de *Per2* no NSQ ao longo de 24 horas ocorre sob desalinhamento do fotoperíodo, possivelmente por ser este período de grandes flutuações neurohumorais influenciadas pelo descompasso do ritmo biológico, cujo reflexo primário é diretamente observado na amplitude de oscilação de eventos controlados pelo ritmo circadiano.

O gene *Rev-erba*, considerado potente repressor transcricional, exhibe naturalmente picos de expressão diurnos em camundongos selvagens e está fisicamente quase ausente à

noite (GERHART-HINES et al., 2013). Juntamente com *Rev-erb β* , *Rev-erba* é crítico para o comportamento circadiano e expressão gênica (CHO et al., 2012). Nossos resultados para RNAm de *Rev-erba* em animais CD, demonstram claramente a ocorrência de maior expressão às 14h. Entretanto, os animais IDP não exibem ritmicidade na expressão do gene *Rev-erba*, como os animais cíclicos. *Rev-erbs* são necessários para o ritmo de *Bmal1*, que é diretamente reprimido por *Rev-erba* (PREITNER et al., 2002), enquanto os RORs são dispensáveis, indicando que os *Rev-erbs* desempenham função mais proeminente do que os RORs no circuitos transcrpcionais do relógio (LIU et al., 2008). Tal comportamento é claramente observado nas ratas cíclicas em diestro e não tão evidente em animais senis com ciclo irregular. É importante salientar que nossos resultados de RNAm para os *clock* genes analisados exibem antifase no perfil de expressão gênica em animais com ciclo regular, o que não se observa nos animais com ciclo irregular, demonstrando perda de sincronia.

Entre os genes do relógio da via canônica, *Bmal1* é o único cuja eliminação resulta em perda completa de ritmos circadianos (BUNGER et al., 2000; YANG et al., 2016). *Bmal1* é importante regulador de condições associadas ao envelhecimento, uma vez que camundongos *knockout* para *Bmal1* sofrem série de condições relacionadas ao envelhecimento, como sarcopenia, catarata, inflamação da córnea, osteoporose, perda prematura de cabelo e armazenamento inadequado de tecido adiposo visceral e subcutâneo e infertilidade (KONDRATOV et al., 2006). Em estudos anteriores com machos de hamsters sírios senis (17-20 meses) ficou evidenciado menor expressão de *Bmal1* no NSQ no período de envelhecimento destes animais quando expostos à escuridão constante (KOLKER et al., 2003). Duncan e colaboradores (2013) também demonstraram em estudo com machos de hamsters de 17-21 meses, que ocorre declínio na expressão de *Bmal1* em diversas regiões cerebrais, como hipocampo, córtex motor e estriado, indicando que esta atenuação seja característica comum no envelhecimento cerebral. Embora em nosso estudo não se tenha

encontrado menor expressão gênica de *Bmal1* no NSQ de animais CD e IDP, observa-se que este gene em fêmeas CD apresenta maior transcrição na fase clara e redução desta expressão na fase escura dos períodos analisados, enquanto que nas fêmeas IDP esta diferença não ocorre. *Bmal1* possui o mesmo perfil de expressão de RNAm, em ambos os grupos, na APO e adenohipófise e entre NSQ e ovário.

Nossos resultados mostram que em ratas CD há alterações na quantificação relativa do RNAm de AVP no NSQ, com aumento no início da fase clara e no final da fase escura, sendo aumento significativo às 2h. Além disso, ressaltamos ocorrência de deslocamento da expressão da fase clara para a escura em animais IDP, onde há ocorrência de único aumento na expressão do gene a partir das 20h, sem que haja ocorrência de aumento na fase clara com deslocamento. Hofman e Swaab (1994), observaram em humanos com mais de 50 anos de idade, sutil oscilação diurna do neuropeptídeo, com amplitude de expressão menor e ocorrendo à noite. Tominaga e colaboradores (1992) observaram que não há influência direta da iluminação ambiental no conteúdo de AVP da porção dorsomedial do NSQ, sugerindo que o ritmo de liberação de AVP é endogenamente regulado pelo marcapasso circadiano, que conforme nossos resultados para animais IDP, parece apresentar dessincronização no período inicial do envelhecimento feminino.

Ao relacionarmos o perfil de expressão gênica de *AVP* e *Per2* no NSQ de fêmeas CD, observamos que *Per2* exibe maior expressão no início da fase escura, exatamente quando a expressão de RNAm para *AVP* é mais baixa e o contrário ocorre no final da fase escura, quando *AVP* mostra aumento. Estes dados são compatíveis com a descrição de Hamada e colaboradores (2001), que relata ritimicidade na expressão *Per1*, *Per2* e *Per3* especificamente no compartimento do NSQ onde o AVP é sintetizado, em contraste com a localização da expressão de VIP no compartimento central do NSQ que não está sob regulação circadiana endógena. O mesmo não é observado no perfil de expressão de *Per2* e *AVP* no NSQ de

fêmeas IDP, onde maiores expressões destes genes acontecem simultaneamente no início da fase escura já com maior expressão de RNAm para *AVP*, sugerindo perda de sincronia nestes animais. Nas ratas CD é bem evidente a sincronia de *Per2* e *AVP* na fase escura, com maior expressão de *Per2* e menor a de *AVP* às 20h. Nos animais IDP, nos 4 períodos analisados, existe esta sincronia porém durante o dia há maior expressão de *Per2* e à noite maior expressão *AVP*.

A literatura ainda é bem controversa sobre as consequências do envelhecimento de neurônios que compõem o NSQ na senescência biológica. Estudos têm indicado que não há alteração no tamanho e número de células do NSQ durante o envelhecimento, entretanto, o ritmo de atividade neuronal em cultura de células do NSQ de animais velhos é diminuído (KOLKER et al., 2003). Foi verificado que implantes de NSQ fetal em animais idosos restauram os ritmos diários do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de atividade locomotora (CAI et al., 1997; LI; SATINOFF, 1995), sugerindo haver neste período, ocorrência de alterações entre as células do NSQ ou em sua maquinaria celular que gera a ritmicidade (KOLKER et al., 2003). No entanto Roberts e colaboradores (2012) demonstraram que há diminuição no número de neurônios de ambas as porções, dorsomedial e ventrolateral, em fêmeas de macaco *Rhesus*. Estudos nas décadas de 80 e 90 mostraram que a transmissão sináptica e uma série de neurotransmissores foram implicados na sincronização e amplificação de sinais circadianos no NSQ, integração do sinal luminoso e transmissão do ritmo do NSQ para outras regiões do cérebro. Há relatos na literatura da ocorrência de diminuição na amplitude da atividade elétrica das células do NSQ, em ratos de meia-idade (NAKAMURA et al., 2011) possivelmente por alterações nas propriedades da membrana celular (FARAJNIA et al., 2012). Dentre os neurotransmissores, *AVP* parece desempenhar ação excitadora importante ao ativar os receptores *V1a* (INGRAM et al., 1998) aumentando a amplitude das taxas de disparo no NSQ durante o dia (MIHAI; JUSS; INGRAM, 1994), cuja

ocorrência pode ser inferida em animais IDP, onde há aumento linear na atividade de neurônios cFos/AVP-ir que se perdura até o início da fase escura, o que não acontece em animais CD, onde a atividade neuronal vasopressinérgica permanece constante até o final da fase escura, onde ocorre sua redução. Embora não se tenha dado enfoque para a quantidade de neurônios no NSQ, nossa análise para neurônios cFos/AVP imunorreativos revelou que roedores fêmeas IDP apresentam maior atividade em relação à fêmeas CD, com pico de atividade/expressão gênica no início da fase escura, conforme também foi demonstrado em primatas idosos não-humanos (AUJARD et al., 2006; CAYETANOT; BENTIVOGLIO; AUJARD, 2005), sugerindo mecanismo compensatório de perda, uma vez que parte da perda de capacidade reprodutiva nestes animais se deve à redução na habilidade do NSQ em estimular os circuitos neurais subjacentes ao funcionamento ovulatório (KRIEGSFELD, 2013).

É sabido que duas áreas hipotalâmicas têm participação essencial na deflagração do pico pré-ovulatório de GnRH, e que a ativação receptores de estrógeno (E₂) e Progesterona (P₄) nestas áreas em mecanismos de *down* e *upregulation* são essenciais neste processo de controle indireto da rede neuronal GnRH. Foi demonstrado por Nicola e colaboradores (2016) que animais IDP possuem baixo e invariável conteúdo de GnRH, mesmo sob maiores concentrações de estradiol. Dados da literatura apontam que mesmo na presença de elevadas concentrações de estradiol, a ablação do NSQ ou a interrupção das projeções neuronais do NSQ para o APO, incluindo neurônios secretores de kisspeptina, resulta em aciclicidade estral, evidenciando a ação crucial que o NSQ desempenha na função reprodutiva (SMARR; MORRIS; DE LA IGLESIA, 2012; WIEGAND; TERASAWA, 1982; WIEGAND et al., 1980), uma vez que neurônios do NSQ fazem conexões diretas com neurônios GnRH e conexões indiretas em que os neurônios NSQ fazem sinapse com interneurônios concentradores de estradiol adjacentes aos neurônios GnRH na APO anterior (DE LA

IGLESIA; MEYER; SCHWARTZ, 2003; VAN DER BEEK et al., 1997). Neste estudo observa-se que a expressão de RNAm para *Per2* na APO de animais IDP é mais expressiva do que o grupo CD, com pico de expressão no início da fase escura, que não é observado em animais CD. Além disso, os demais genes, *Rev-erba* e *Bmal1*, comportam-se de forma a apresentar antifase durante o ciclo claro/escuro, o que não é observado nos animais IDP, indicando que há desalinhamento no comportamento de expressão gênica durante o período circadiano, que é facilmente observado pelo perfil oposto na expressão de *Rev-erba* e *Bmal1* durante a fase clara do fotoperíodo. *Rev-erba* em fêmeas IDP é expresso em menor quantidade com pico de expressão no início da fase escura. O mesmo perfil oposto de expressão é observado para *Bmal1*.

Este estudo evidenciou, no período da periestrofpausa, desalinhamento de fase durante o fotoperíodo com maior concentração plasmática de LH na fase escura, entretanto, nas fêmeas adultas e com ciclo estral regular há evidente alinhamento das fases clara e escura. Essas alterações estão associadas a déficits na ativação das células secretoras de GnRH (KRIEGSFELD, 2013), cujo conteúdo no HMB não varia ao longo do dia em fêmeas IDP (NICOLA et al., 2016). Em fêmeas jovens, com ciclo estral regular, 34-40% dos neurônios GnRH têm expressão imediata de genes iniciais do processo ovulatório na tarde do proestro, enquanto somente 9-14% estão expressos em animais de meia-idade (LLOYD et al., 1994). Assim como em pássaros, mamíferos apresentam perfil de expressão temporal de *clock* genes de modo estável sob vários horários do fotoperíodo, o que parece permitir que os animais mantenham fase fotoinduzível em estado estacionário (YASUO et al., 2003). De fato, observa-se certa linearidade no perfil de expressão gênica dos *clock* genes no HMB de fêmeas IDP. No entanto, o perfil de expressão gênica no HMB de fêmeas CD apresenta alterações. Observa-se que *Per2* e *Rev-erba*, nos animais IDP, são expressos em menor quantidade e possuem perfil de expressão oposto na fase clara em relação à animais CD, com *Rev-erba*,

não apresentando alterações temporais de expressão. *Bmal1* oscila temporalmente, apresentando dois picos de expressão do gene, um no final da fase clara e outro na fase escura em animais CD, exatamente como RNAm de AVP e a concentração plasmática de LH, o que não acontece em animais IDP, onde a expressão de *Bmal1* é relativamente constante nos tempos analisados. Paradoxalmente, os efeitos de retroalimentação negativa dos esteróides sexuais mantêm o LH em baixas concentrações durante a maior parte do ciclo ovulatório e altas concentrações de estradiol são necessárias para desencadear a ovulação, orquestrado pelo NSQ (CHRISTIAN; MOENTER, 2010; DE LA IGLESIA; SCHWARTZ, 2006; KRIEGSFELD; SILVER, 2006). Estudo anterior realizado em nosso laboratório (NICOLA et al., 2016) constatou maior concentração plasmática de esteroides em ratas IDP e concentração plasmática menor e sem variação durante o período de luz, do LH, quando comparado com ratas CD. Uma vez que existe importante sítio de integração para os efeitos de retroalimentação positiva do estradiol com sinalização circadiana da rede estimuladora de kisspeptina no AVPe e da atividade de supressão de kiss no núcleo ARC (KRIEGSFELD, 2013; TREEN et al., 2016), a expressão dos genes do relógio no HMB de ratas CD pode ser relacionados com concentrações menores de estradiol em neurônios kisspeptinérgicos nestes animais e por ação das concentrações maiores de estradiol no AVPe de ratas IDP, proporcionando aumento na expressão de RNAm para *Per2* já no início da fase escura.

Ao relacionarmos a expressão de AVP com as concentrações plasmáticas de LH, observamos que ambos obedecem ao mesmo perfil de expressão/secreção em ambos os grupos experimentais. No entanto, ao compararmos o RNAm de AVP com os *clock* genes analisados na APO e no HMB, observamos que há perfil de expressão semelhante entre AVP e *Bmal1* no HMB de animais CD, enquanto que animais IDP apresentaram similaridade entre AVP e *Per2* no HMB. Além do mais, células produtoras de AVP do NSQ, projetam-se diretamente para a maioria das células kisspeptina-ir (KRIEGSFELD, 2013) do AVPe, em

camundongos, sugerindo mecanismo comum de controle circadiano (VIDA et al., 2010). A secreção de AVP pelo NSQ na APOm de fêmeas de roedores, “molda” o pico de GnRH (VAN DER BEEK et al., 1997) e, conseqüentemente, a concentração de LH. Nossos dados apontam que a transcrição de *AVP* no NSQ de fêmeas IDP, possui ritmo alterado de expressão, sendo possivelmente um dos fatores que comprometem a sinalização para deflagração do pico pré-ovulatório de GnRH na APO de animais IDP, que mesmo permanecendo por longos períodos em diestro, exibem células nucleadas com características da fase de proestro, em algum momento do ciclo estral.

Estudos recentes mostram que os diferentes tipos de células que compõem a adenohipófise também contêm relógio molecular capaz de medir o tempo de forma autônoma (BECQUET et al., 2014), e que os gonadotrofos hipofisários também são osciladores circadianos com expressão autônoma de genes do relógio (SELLIX, 2013) cuja proliferação celular segue ritmo diurno e está sincronizada com o ciclo estral em ratas adultas (OISHI et al., 1993). Isto pode ser observado claramente na adenohipófise de animais CD, onde os genes *Per2*, *Rev-erba* e *Bmall* são expressos de maneira antifásica e sincronicamente ao longo fotoperíodo, o que não acontece com as fêmeas IDP, onde há redução de amplitude na expressão de *Per2*. Conforme observa-se em nossos dados, a hipófise de fêmeas CD exhibe o mesmo perfil de expressão de RNAm para *Per2* visto no NSQ, porém com maior quantidade de RNAm expresso na glândula deste animal. Atrasos na resposta de transcrição gênica em relação ao marcapasso central nestes animais podem ser observados no perfil gênico de *Rev-erba*, onde se nota deslocamento de fase em relação à expressão no NSQ. *Bmall* exhibe perfil transcricional semelhante ao NSQ, porém com oscilações distintas no tecido hipofisário. Na adenohipófise de animais IDP, *Per2* exhibe atenuação de expressão nos períodos analisados em relação aos animais CD, que possuem pico de expressão às 20h. *Rev-erba* na adenohipófise de IDP possui pico de expressão às 20h, o que não ocorre no NSQ destes animais, onde a

quantidade relativa de RNAm não se altera durante os períodos analisados. *Bmal1* na adenohipófise de animais CD e IDP apresenta redução significativa às 14h, o que no NSQ de animais CD ocorre às 20h e em animais IDP não se observa alteração. Fato interessante observado é que animais IDP apresentam o mesmo perfil de resposta para o RNAm de *AVP* no NSQ, *Rev-erba* na adenohipófise e concentração plasmática de LH, sugerindo que a não oscilação na expressão de *Bmal1* e *Reverb* no NSQ nos tempos analisados contribuem para o aumento na expressão de AVP no NSQ e do LH plasmático.

Lemos e colaboradores (2006) examinaram algumas glândulas adrenais de macacos Rhesus cujas hipófises também foram analisadas, e observaram ritmos circadianos claros na expressão dos genes do relógio central na adrenal, que entretanto, não estavam em sincronia com a hipófise, assim como observado por Sitzmann e colaboradores (2010), levando à conclusão de que cada tecido periférico, apesar de receber sinais do NSQ, pode regular sua própria expressão circadiana de genes dentro dos limites de suas restrições e demandas fisiológicas. Embora todos os tipos de células hipofisárias estejam sob o controle de fatores hipotalâmicos, também foi demonstrado que células adenohipofisárias contêm relógio molecular capaz de medir o tempo de forma autônoma (ABE et al., 2002). Na adenohipófise de nossos animais também se observa a existência de controle circadiano de sua atividade em prol da reprodução. Nota-se que em animais CD valores de expressão mais baixos para *Rev-erba* no início da fase escura contribuem para a maior expressão de *Per2* durante esta fase, o que em fêmeas IDP acontece de modo oposto, maior expressão de *Rev-erba* do que *Per2*, em resposta à ausência de feedback negativo por concentrações plasmáticas maiores de esteroides (NICOLA et al., 2016), uma vez que o próprio estrogênio altera os ritmos circadianos, aumentando a amplitude (ALBERS; GERALL; AXELSON, 1981; MORIN, 1980), mas esses efeitos são atenuados na presença de progesterona (NAKAMURA et al., 2010). A contínua redução de RNAm para *Bmal1* parece comprometer o padrão de oscilação

de LH nos animais IDP, o que provavelmente influencia na ausência de pico LH. Conforme se observa, animais IDP possuem aumento no comprimento do ciclo estral, com proestro intermitente. A importância dos relógios periféricos é suportada por camundongos com mutação condicional para *Bmal1* em que a deleção do gene nos gonadotrofos hipofisários resulta em maior variação no comprimento do ciclo estral com pouco efeito sobre amplitude de tempo de secreção de LH e FSH, que continuam férteis (CHU et al., 2013). Da mesma forma, quantidades insuficientes e arrítmicas de RNAm para *Bmal1*, contribuem para o estabelecimento de ciclo irregular e de função reprodutiva normal, uma vez que supressão adicional da expressão de RNAm pra *Bmal1* por RNA de interferência (siRNA) efetivamente reduz a expressão de GnRH-R (SELLIX, 2016).

Células periféricas de mamíferos, inclusive reprodutivas, são osciladores autônomos, pois expressam ritmicamente *clock* genes ou os CCGs, uma vez que possuem sequências Ebox em suas regiões promotoras para a ligação de complexos CLOCK/BMAL1 expressos ou regulados ritmicamente por outros fatores específicos de transcrição controlados pelo relógio biológico (BODEN et al., 2010; OISHI; FUKUI; ISHIDA, 2000). Deste modo, contribuem ativamente para a geração e manutenção dos ritmos biológicos sob intrínseca sincronização com os osciladores centrais, que se acredita ser principal, mas não exclusivamente, conduzido pelo NSQ (GERBER et al., 2015).

Tecidos periféricos exibem mudança de fase 3-9 h na oscilação nuclear de RNAm dos *clock* genes em comparação com o NSQ, sugerindo que estes podem estar recebendo “pistas” de tempo do oscilador mestre de forma retardada (MORSE; SASSONE-CORSI, 2002). O relógio interno ovariano contribui significativamente para a janela rítmica de sensibilidade ovariana ao LH e FSH, que por sua vez regula o tempo de ovulação (SELLIX, 2013), ou seja, para ser efetivo, o aumento ovário de LH é sincronizado com janela de tempo específica de sensibilidade ao que está sob influência do estradiol (SELLIX; MENAKER, 2010). A

fisiologia do ovário é fortemente regulada pelas gonadotrofinas, e alguns estudos indicaram que o LH estimula vários genes do relógio nos ovários, principalmente expressão de RNAm para *Per1*, *Per2* e *Bmal1*, especificamente em células foliculares maduras (HE et al., 2007b; KARMAN; TISCHKAU, 2006; SELLIX, 2015). Dados da literatura mostram que os ritmos de expressão dos *clock* genes são limitados às células da granulosa e lúteas maduras isoladas (CHU et al., 2011; HE et al., 2007a;2007b) e que o RNAm de *Bmal1*, *Per1* e *Per2* são rítmicamente expressos nos ovários, especificamente em células foliculares maduras, sob sinal mediado por gonadotrofinas (SELLIX, 2015).

Vários estudos (FAHRENKRUG et al., 2006; HE et al., 2007b; KARMAN; TISCHKAU, 2006) já demonstraram que há variações temporais nos componentes do relógio molecular em tecidos ovarianos de roedores. Em nosso estudo verificamos que além de variações temporais ocorrem alterações significantes na maquinaria gênica do relógio molecular ovariano de fêmeas que possuem ciclos irregulares onde há prevalência da fase do diestro. Observamos que em animais cíclicos em diestro o pico de expressão de RNAm para *Per2* ocorre no início da fase escura, conforme fora relatado por Nakamura e colaboradores (2010). No entanto, não há dados na literatura sobre esta expressão gênica no ovário de fêmeas IDP, que mostra-se semelhante à expressão do ovário de animais cíclicos. Nossos dados apontam ainda que há maior retardo na sensibilidade de resposta do ovário ao ritmo de expressão de NSQ em animais CD em comparação com a hipófise, uma vez que o aumento na expressão de *Per2* neste órgão só é observado na transição da fase clara para a escura, ao passo que no NSQ esta expressão já está aumentada no final da fase clara, ou seja, 6 horas após, conforme observado por Fahrenkrug e colaboradores (2006). Em fêmeas IDP, a transcrição de RNAm para *Per2* possui atraso de resposta ainda mais acentuado e sem oscilações na expressão ao longo do ciclo claro/escuro. O gene *Rev-erba* nas fêmeas CD também apresenta atraso de resposta ao NSQ, pois no início da fase escura no NSQ já é

observada significativa redução no seu RNAm, enquanto que no ovário esta redução acontece somente no final da fase escura. No ovário das fêmeas IDP, o aumento na expressão de *Rev-erba* é antecipado para o final do período claro. *Bmal1* em animais IDP também possui atraso em relação ao NSQ, e este é ainda mais significativo quando comparado com o animal CD. Como relatado por LIU e colaboradores (2014), *Bmal1* desempenha função intrínseca no relógio molecular de células esteroidogênicas ovarianas, com destaque para produção de progesterona através da enzima STAR. Porém, este mecanismo de regulação ainda requer maiores investigações. Em codornas foi observado que o nível de RNAm de StAR exhibe ritmo diurno coincidente com a expressão de *Per2* apenas no folículo dominante (NAKAO et al., 2007).

A função do relógio ovariano está relacionada ao tempo de expressão gênica em células de granulosa maduras (CGs), incluindo genes relacionados à esteroidogênese, capacidade de resposta às gonadotrofinas e ovulação (SELLIX, 2015), dentre os quais estão o receptor LH (*Lhcgr*), enzimas esteroidogênicas (*StAR*), prostaglandina sintase (*ptgs2*) e junções gap (CHEN; ZHAO; CHU et al., 2013; CHEN; ZHAO; KUMAZAWA et al., 2013; SELLIX; YOSHIKAWA; MENAKER, 2010).

Aos vinte e sete meses de idade, fêmeas de roedores mantêm grande número de corpo lúteo e folículos maduros que indicam desenvolvimento folicular e atividade ovulatória (LU et al., 1979), justificando maiores concentrações plasmáticas de E_2 e P_4 (NICOLA et al., 2016). Contudo, alta capacidade de resposta sincrônica de folículos dominantes pelo aumento pulsátil de LH, que leva à ativação gradual do relógio funcional (ZHANG et al., 2017), é perdida durante o envelhecimento reprodutivo, com baixos e constantes concentrações de GnRH/LH e dessincronização do relógio biológico no eixo HPG, uma vez que o aumento de LH pode fornecer sinal de reinicialização, em primeiro lugar, sincronizando o relógio em CGs, e este ritmo circadiano é continuamente mantido em células lúteas (LCs) (HE et al.,

2007b). Além do mais, foi constatado que camundongos Clock/Clock mutantes exibem ciclos irregulares prolongados, com proestro curto e estro mais longo, porém não apresentam pico de LH, embora suas concentrações E₂ e P₄ sejam normais nas fases do diestro e proestro (MILLER et al., 2004), evidenciando a importância do controle e do correto funcionamento da maquinaria circadiana no sucesso reprodutivo. Hipóteses sobre a possível “quebra” do sinal diário do NSQ para neurônios GnRH são lançadas, e que tal alteração esteja na rede interneuronal mediada por VIP e AVP (MILLER et al., 2004). Em nossos resultados esta hipótese começa a ser esclarecida, pois observa-se que em animais IDP, o perfil de LH obedece à expressão de RNAm de AVP no NSQ, com picos de expressão desalinhados e sem ritimicidade. Esses achados foram confirmados por estudos de ratos Clock Δ19 (FAHRENKRUG et al., 2006), onde o dímero CLOCK Δ19 / BMAL1 não é capaz de induzir transcrição, levando à menor ritimicidade nos tecidos central e periférico.

CONCLUSÃO

8. Conclusão

- Os resultados deste estudo permitem confirmar a hipótese de ocorrência de alterações nos ritmos circadianos no eixo HPG e que estas alterações desempenham função importante para a condução da senescência reprodutiva;
- Há alteração temporal do sistema *CLOCK* e de RNAm para AVP no eixo HPG de fêmeas com ciclo irregular em diestro persistente, e que esta alteração está intrinsicamente relacionada às alterações hormonais que caracterizam a periostropausa;
- Há maior atividade vasopressinérgica na porção dorsomedial do NSQ de animais senis em diestro persistente;
- A persistência da fase do diestro em fêmeas de roedores ocorre devido à dessincronização da janela de tempo sensível com o período de tempo específico ao sinal neuronal do NSQ dado pela falta de oscilação dos genes *Rev-erba* e *Bmal1*. Isto leva ao aumento não pulsátil ou frequente do RNAm de AVP, um gene controlado pelo relógio, e de LH plasmático fora da fase de proestro, impedindo a ocorrência da ovulação;
- Além disso, nossos resultados também demonstram que o componente periférico do eixo HPG de animais acíclicos não mantém controle de resposta circadiano adequado equivalente ao de animais cíclicos para *Per2*;
- Todas as alterações em fêmeas IDP ocorrem na transição da fase clara para a escura;
- Dessa forma, nossos resultados evidenciam o desarranjo na expressão temporal de gene que compõem a maquinaria molecular do relógio circadiano, bem como na atividade e comunicação do relógio central do NSQ com áreas hipotalâmicas fundamentais para a manutenção da fertilidade feminina, contribuindo para a senescência reprodutiva.

- Almejamos que as descobertas aqui descritas possam contribuir com estudos sobre homeostasia em regiões cerebrais claramente comprometidas com a diminuição da concentração de estradiol durante o envelhecimento feminino, fornecendo novas visões sobre doenças do/no SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

- ABE, M. et al. Circadian rhythms in isolated brain regions. **J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 350-6, Jan 01 2002.
- ALBERS, H. E.; GERALL, A. A.; AXELSON, J. F. Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. **Physiol Behav**, v. 26, n. 1, p. 21-5, Jan 1981.
- ALBRECHT, U. et al. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 1055-64, Dec 26 1997.
- ASHER, G. et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 317-28, Jul 25 2008.
- AUJARD, F. et al. Age-related effects on the biological clock and its behavioral output in a primate. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 451-60, 2006.
- BALSALOBRE, A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. **Cell Tissue Res**, v. 309, n. 1, p. 193-9, Jul 2002.
- BECQUET, D. et al. Evidence for an internal and functional circadian clock in rat pituitary cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, n. 2, p. 888-98, Feb 15 2014.
- BELLET, M. M. et al. Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 9, p. 3333-8, Feb 26 2013.
- BELLET, M. M.; SASSONE-CORSI, P. Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 22, p. 3837-48, Nov 15 2010.
- BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 407-12, May 24 2007.
- BODEN, M. J. et al. Reproductive biology of female Bmal1 null mice. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 1077-90, Jun 2010.
- BROWN-GRANT, K.; RAISMAN, G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 198, n. 1132, p. 279-96, Sep 05 1977.
- BU, L.; LEPHART, E. D. AVPV neurons containing estrogen receptor-beta in adult male rats are influenced by soy isoflavones. **BMC Neurosci**, v. 8, p. 13, Feb 01 2007.

BUHR, E. D.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the Mammalian circadian clock. **Handb Exp Pharmacol**, n. 217, p. 3-27, 2013.

BUNGER, M. K. et al. Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1009-1017, 2000/12/22/ 2000.

CAI, A. et al. Fetal grafts containing suprachiasmatic nuclei restore the diurnal rhythm of CRH and POMC mRNA in aging rats. **Am J Physiol**, v. 273, n. 5 Pt 2, p. R1764-70, Nov 1997.

CAKIR, I. et al. Hypothalamic Sirt1 regulates food intake in a rodent model system. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8322, Dec 15 2009.

CARD, J. P. et al. Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. **Cell Tissue Res**, v. 252, n. 2, p. 307-15, May 1988.

CAVIGELLI, S. A. et al. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. **J Endocrinol**, v. 184, n. 1, p. 153-63, Jan 2005.

CAYETANOT, F.; BENTIVOGLIO, M.; AUJARD, F. Arginine-vasopressin and vasointestinal polypeptide rhythms in the suprachiasmatic nucleus of the mouse lemur reveal aging-related alterations of circadian pacemaker neurons in a non-human primate. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 4, p. 902-10, Aug 2005.

CHANG, H. C.; GUARENTE, L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. **Cell**, v. 153, n. 7, p. 1448-60, Jun 20 2013.

CHEN, H. et al. FSH induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via a gap junction protein Cx43-dependent pathway. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 304, n. 6, p. E566-75, Mar 15 2013.

CHEN, H. et al. Downregulation of core clock gene Bmal1 attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 304, n. 12, p. C1131-40, Jun 15 2013.

CHEN, T. T.; MAEVSKY, E. I.; UCHITEL, M. L. Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: the central and peripheral roles of succinate. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 7, 2015.

CHO, H. et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 123-7, Mar 29 2012.

CHRISTIAN, C. A.; MOENTER, S. M. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. **Endocr Rev**, v. 31, n. 4, p. 544-77, Aug 2010.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **N Engl J Med**, v. 332, n. 20, p. 1351-62, May 18 1995.

CHROUSOS, G. P. Endocrinology and metabolism

In: FELIG, P.; BAXTER, J. D., *et al* (Ed.). 4th: New York : McGraw-Hill, 2001. cap. Glucocorticoid therapy, p.1562. ISBN 0070204489.

CHU, A. *et al*. Global but not gonadotrope-specific disruption of Bmal1 abolishes the luteinizing hormone surge without affecting ovulation. **Endocrinology**, v. 154, n. 8, p. 2924-35, Aug 2013.

CHU, G. *et al*. Alterations of circadian clockworks during differentiation and apoptosis of rat ovarian cells. **Chronobiol Int**, v. 28, n. 6, p. 477-87, Jul 2011.

CORNELISSEN, G.; OTSUKA, K. Chronobiology of Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 63, n. 2, p. 118-128, 2017.

DAVIDSON, A. J. *et al*. Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 3, p. 471-7, Mar 2008.

DE LA IGLESIA, H. O.; MEYER, J.; SCHWARTZ, W. J. Lateralization of circadian pacemaker output: Activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. **J Neurosci**, v. 23, n. 19, p. 7412-4, Aug 13 2003.

DE LA IGLESIA, H. O.; SCHWARTZ, W. J. Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1148-53, Mar 2006.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 517-49, 2010.

DIETRICH, M. O. *et al*. Agrp neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 30, n. 35, p. 11815-25, Sep 01 2010.

DOLATSHAD, H. *et al*. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. **Hum Reprod**, v. 21, n. 1, p. 68-79, Jan 2006.

EVERETT, J. W.; SAWYER, C. H. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. **Endocrinology**, v. 47, n. 3, p. 198-218, Sep 1950.

FAHRENKRUG, J. et al. Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3769-76, Aug 2006.

FARAJNIA, S. et al. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock. **J Neurosci**, v. 32, n. 17, p. 5891-9, Apr 25 2012.

FRANKE, A. N.; . **Fertility, aging and the brain. Neuroendocrinological studies in female rats.** . 2003. 176 (PhD). Department of Animal Sciences, Wageningen University

FROY, O. Circadian aspects of energy metabolism and aging. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 4, p. 931-40, Sep 2013.

FUKUOKA, Y. et al. Glucocorticoid administration increases hPer1 mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells in vitro or in vivo. **J Biol Rhythms**, v. 20, n. 6, p. 550-3, Dec 2005.

GERBER, A. et al. The systemic control of circadian gene expression. **Diabetes Obes Metab**, v. 17 Suppl 1, p. 23-32, Sep 2015.

GERHART-HINES, Z. et al. The nuclear receptor Rev-erb α controls circadian thermogenic plasticity. **Nature**, v. 503, n. 7476, p. 410-413, Nov 21 2013.

GILLESPIE, J. M. et al. Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5285-92, Dec 2003.

GILLETTE, M. U.; REPERT, S. M. The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: Circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. **Brain Research Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 135-139, 1987/07/01/ 1987.

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.

GRACE, C. O.; FINK, G.; QUINN, J. P. Characterization of potential regulatory elements within the rat arginine vasopressin proximal promoter. **Neuropeptides**, v. 33, n. 1, p. 81-90, Feb 1999.

GUTTMAN, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 223-7, Mar 12 2009.

HAFNER, M.; KOEPL, H.; GONZE, D. Effect of network architecture on synchronization and entrainment properties of the circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 3, p. e1002419, 2012.

HARDELAND, R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 13, p. 2001-18, Jul 2008.

HE, P. J. et al. The disruption of circadian clockwork in differentiating cells from rat reproductive tissues as identified by in vitro real-time monitoring system. **J Endocrinol**, v. 193, n. 3, p. 413-20, Jun 2007a.

_____. Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. **Mol Cell Biochem**, v. 302, n. 1-2, p. 111-8, Aug 2007b.

HERSKOVITS, A. Z.; GUARENTE, L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. **Cell Res**, v. 23, n. 6, p. 746-58, Jun 2013.

HOFFMANN, J. C. Light and reproduction in the rat: effect of lighting schedule on ovulation blockade. **Biol Reprod**, v. 1, n. 2, p. 185-8, Jun 1969.

HORVATH, T. L. An alternate pathway for visual signal integration into the hypothalamo-pituitary axis: retinorecipient intergeniculate neurons project to various regions of the hypothalamus and innervate neuroendocrine cells including those producing dopamine. **J Neurosci**, v. 18, n. 4, p. 1546-58, Feb 15 1998.

INGRAM, C. D. et al. Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. **Prog Brain Res**, v. 119, p. 351-64, 1998.

JENWITHEESUK, A. et al. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 9, p. 16848-84, Sep 22 2014.

KALRA, S. P. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. **Endocr Rev**, v. 14, n. 5, p. 507-38, Oct 1993.

KALSBECK, A.; BUIJS, R. M. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. **Cell Tissue Res**, v. 309, n. 1, p. 109-18, Jul 2002.

KALSBECK, A. et al. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. **Brain Res**, v. 682, n. 1-2, p. 75-82, Jun 05 1995.

KARMAN, B. N.; TISCHKAU, S. A. Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. **Biol Reprod**, v. 75, n. 4, p. 624-32, Oct 2006.

KHAPRE, R. V.; SAMSA, W. E.; KONDRATOV, R. V. Circadian regulation of cell cycle: Molecular connections between aging and the circadian clock. **Ann Med**, v. 42, n. 6, p. 404-15, Sep 2010.

KO, C. H.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Hum Mol Genet**, v. 15 Spec No 2, p. R271-7, Oct 15 2006.

KOH, K. et al. A Drosophila model for age-associated changes in sleep:wake cycles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 37, p. 13843-7, Sep 12 2006.

KOLKER, D. E. et al. Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters. **J Biol Rhythms**, v. 18, n. 2, p. 159-69, Apr 2003.

KONDRATOV, R. V. et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. **Genes Dev**, v. 20, n. 14, p. 1868-73, Jul 15 2006.

KONDRATOVA, A. A.; KONDRATOV, R. V. The circadian clock and pathology of the ageing brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 325-35, Mar 07 2012.

KRAJNAK, K. et al. Aging alters the rhythmic expression of vasoactive intestinal polypeptide mRNA but not arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei of female rats. **J Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 4767-74, Jun 15 1998.

KRAJNAK, K.; ROSEWELL, K. L.; WISE, P. M. Fos-induction in gonadotropin-releasing hormone neurons receiving vasoactive intestinal polypeptide innervation is reduced in middle-aged female rats. **Biol Reprod**, v. 64, n. 4, p. 1160-4, Apr 2001.

KRIEGSFELD, L. J. Circadian regulation of kisspeptin in female reproductive functioning. **Adv Exp Med Biol**, v. 784, p. 385-410, 2013.

KRIEGSFELD, L. J.; SILVER, R. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. **Horm Behav**, v. 49, n. 5, p. 557-74, May 2006.

KRONENBERG, S. M. K. P. P. R. L. H. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2013.

LEE, W. S.; SMITH, M. S.; HOFFMAN, G. E. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 13, p. 5163-7, Jul 1990.

LEITE, C. M. et al. Progesterone-induced amplification and advancement of GnRH/LH surges are associated with changes in kisspeptin system in preoptic area of estradiol-primed female rats. **Brain Res**, v. 1650, p. 21-30, Nov 01 2016.

LEVINE, J. E. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. **Biol Reprod**, v. 56, n. 2, p. 293-302, Feb 1997.

_____. Editorial: stressing the importance of sex. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4502-4, Dec 2002.

LI, H.; SATINOFF, E. Changes in circadian rhythms of body temperature and sleep in old rats. **Am J Physiol**, v. 269, n. 1 Pt 2, p. R208-14, Jul 1995.

LIU, A. C. et al. Redundant function of REV-ERB α and β and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. **PLoS Genet**, v. 4, n. 2, p. e1000023, Feb 29 2008.

LIU, F.; CHANG, H. C. Physiological links of circadian clock and biological clock of aging. **Protein Cell**, v. 8, n. 7, p. 477-488, Jul 2017.

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.

LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 5, p. 407-41, 2004.

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.

LUCAS, R. J. et al. Free running circadian rhythms of melatonin, luteinizing hormone, and cortisol in Syrian hamsters bearing the circadian tau mutation. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 758-64, Feb 1999.

MIHAI, R.; JUSS, T. S.; INGRAM, C. D. Suppression of suprachiasmatic nucleus neurone activity with a vasopressin receptor antagonist: possible role for endogenous vasopressin in circadian activity cycles in vitro. **Neurosci Lett**, v. 179, n. 1-2, p. 95-9, Sep 26 1994.

MILLER, B. H. et al. Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and Clock mutant mice. **Biol Reprod**, v. 75, n. 5, p. 778-84, Nov 2006.

MILLER, B. H. et al. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. **Curr Biol**, v. 14, n. 15, p. 1367-73, Aug 10 2004.

MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annu Rev Neurosci**, v. 35, p. 445-62, 2012.

MORIN, L. P. Effect of ovarian hormones on synchrony of hamster circadian rhythms. **Physiol Behav**, v. 24, n. 4, p. 741-9, Apr 1980.

MORSE, D.; SASSONE-CORSI, P. Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 12, p. 632-7, Dec 2002.

MUNOZ, E.; BREWER, M.; BALER, R. Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. **J Biol Chem**, v. 277, n. 39, p. 36009-17, Sep 27 2002.

NADER, N.; CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 5, p. 277-86, May 2010.

NAKAHATA, Y. et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 329-40, Jul 25 2008.

NAKAMURA, T. J. et al. Age-related decline in circadian output. **J Neurosci**, v. 31, n. 28, p. 10201-5, Jul 13 2011.

NAKAMURA, T. J. et al. Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. **Steroids**, v. 75, n. 3, p. 203-12, Mar 2010.

NAKAO, N. et al. Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3031-8, Jul 2007.

NARUSE, Y. et al. Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 24, p. 13691-6, Nov 23 1999.

NASS, T. E. et al. Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. **J Endocrinol**, v. 100, n. 1, p. 43-50, Jan 1984.

NELSON, R. J. In: (Ed.). **An Introduction to Behavioral Endocrinology**

4^a. Sunderland, United States: Sinauer Associates Inc.,U.S., 2011. cap. Biological rhythms, p.670.

NICOLA, A. C. et al. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. **Exp Gerontol**, v. 81, p. 19-27, Aug 2016.

NICOLA, A. C. D. **Atividade dos neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus e o conteúdo de GnRH em ratas Wistar acíclicas** 2013. 77 dissertação (mestre). Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista/UNESP, 2013.

OISHI, K.; FUKUI, H.; ISHIDA, N. Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 268, n. 1, p. 164-71, Feb 05 2000.

OISHI, Y. et al. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. **Anat Rec**, v. 235, n. 1, p. 111-20, Jan 1993.

OKAMURA, H. et al. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2531-4, Dec 24 1999.

OLCESE, J.; SIKES, H. E.; RESUEHR, D. Induction of PER1 mRNA expression in immortalized gonadotropes by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of protein kinase C and MAP kinase signaling. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 143-50, 2006.

OTTINGER, M. A. Mechanisms of reproductive aging: conserved mechanisms and environmental factors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1204, p. 73-81, Aug 2010.

P. REED LARSEN, H. M. K., SHLOMO MELMED, P. REED LARSEN, MELMED SHLOMO; . **Williams Textbook of Endocrinology**. 10^a. St. Louis, MO: Larsen Saunders/Elsevier, 2003.

PALM, I. F. et al. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 93, n. 2, p. 659-66, 1999.

_____. The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. **Brain Res**, v. 901, n. 1-2, p. 109-16, May 18 2001.

PARTCH, C. L.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. **Trends Cell Biol**, v. 24, n. 2, p. 90-9, Feb 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact**. 6th. Elsevier, 2007. 400

PETERFI, Z. et al. Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen. **Neuroscience**, v. 124, n. 3, p. 695-707, 2004.

PETERSEN, S. L.; OTTEM, E. N.; CARPENTER, C. D. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. **Biol Reprod**, v. 69, n. 6, p. 1771-8, Dec 2003.

PILORZ, V.; STEINLECHNER, S.; OSTER, H. Age and oestrus cycle-related changes in glucocorticoid excretion and wheel-running activity in female mice carrying mutations in the circadian clock genes *Per1* and *Per2*. **Physiol Behav**, v. 96, n. 1, p. 57-63, Jan 08 2009.

POLETINI, M. D. O. As proteínas de relógios e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal de fêmeas de roedores. **Revista da Biologia**, v. 9, p. 41-44, 2012.

POLETINI, M. O. et al. Knockdown of clock genes in the suprachiasmatic nucleus blocks prolactin surges and alters FRA expression in the locus coeruleus of female rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 5, p. E1325-34, Nov 2007.

PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251-60, Jul 26 2002.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935-41, Aug 29 2002.

RESUEHR, D. et al. E-box regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in immortalized gonadotrope cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 278, n. 1-2, p. 36-43, Nov 15 2007.

RESUEHR, H. E.; RESUEHR, D.; OLCESE, J. Induction of mPer1 expression by GnRH in pituitary gonadotrope cells involves EGR-1. **Mol Cell Endocrinol**, v. 311, n. 1-2, p. 120-5, Nov 13 2009.

ROBERTSON, J. L. et al. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3664-71, Aug 2009.

RUTHENBURG, A. J. et al. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 983-94, Dec 2007.

SATINOFF, E. et al. Do the suprachiasmatic nuclei oscillate in old rats as they do in young ones? **Am J Physiol**, v. 265, n. 5 Pt 2, p. R1216-22, Nov 1993.

SCHAEFER, A. et al. Control of cognition and adaptive behavior by the GLP/G9a epigenetic suppressor complex. **Neuron**, v. 64, n. 5, p. 678-91, Dec 10 2009.

SCHMIDT, C.; PEIGNEUX, P.; CAJOCHEN, C. Age-related changes in sleep and circadian rhythms: impact on cognitive performance and underlying neuroanatomical networks. **Front Neurol**, v. 3, p. 118, 2012.

SEGALL, L. A. et al. Glucocorticoid rhythms control the rhythm of expression of the clock protein, Period2, in oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in rats. **Neuroscience**, v. 140, n. 3, p. 753-7, Jul 07 2006.

SELLIX, M. T. Clocks underneath: the role of peripheral clocks in the timing of female reproductive physiology. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 91, 2013.

_____. Circadian clock function in the mammalian ovary. **J Biol Rhythms**, v. 30, n. 1, p. 7-19, Feb 2015.

SELLIX, M. T. The Circadian Timing System and Endocrine Physiology. In: GUMZ, M. L. (Ed.). **Circadian Clocks: Role in Health and Disease**: Springer, 2016. cap. 2, p.57-102.

SELLIX, M. T. et al. Anatomical and functional characterization of clock gene expression in neuroendocrine dopaminergic neurons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 5, p. R1309-23, May 2006.

SELLIX, M. T.; MENAKER, M. Circadian clocks in the ovary. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 10, p. 628-36, Oct 2010.

SELLIX, M. T.; YOSHIKAWA, T.; MENAKER, M. A circadian egg timer gates ovulation. **Curr Biol**, v. 20, n. 6, p. R266-7, Mar 23 2010.

SHEARMAN, L. P. et al. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. **Neuron**, v. 19, n. 6, p. 1261-9, Dec 1997.

SILVER, R. et al. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. **Nature**, v. 382, n. 6594, p. 810-3, Aug 29 1996.

SILVERMAN, A. J.; JHAMANDAS, J.; RENAUD, L. P. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. **J Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 2312-9, Aug 1987.

SIMONNEAUX, V.; BAHOUAGNE, T. A Multi-Oscillatory Circadian System Times Female Reproduction. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 157, 2015.

SMARR, B. L.; MORRIS, E.; DE LA IGLESIA, H. O. The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of *Kiss1* and the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2839-50, Jun 2012.

SMITH, J. T. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. **Brain Res Rev**, v. 57, n. 2, p. 288-98, Mar 2008.

SMITH, J. T.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 623-30, Apr 2006.

SOLLARS, P. J.; PICKARD, G. E. The Neurobiology of Circadian Rhythms. **Psychiatr Clin North Am**, v. 38, n. 4, p. 645-65, Dec 2015.

SUMOVA, A. et al. Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. **Brain Res**, v. 801, n. 1-2, p. 254-8, Aug 10 1998.

SWEATT, J. D. et al. Chapter 1 - An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics. In: (Ed.). **Epigenetic Regulation in the Nervous System**. San Diego: Academic Press, 2013. p.3-33. ISBN 978-0-12-391494-1.

TAKAHASHI, J. S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 10, p. 764-75, Oct 2008.

TANIURA, H.; SNG, J. C.; YONEDA, Y. Histone modifications in the brain. **Neurochem Int**, v. 51, n. 2-4, p. 85-91, Jul-Sep 2007.

TREEN, A. K. et al. Divergent Regulation of ER and Kiss Genes by 17beta-Estradiol in Hypothalamic ARC Versus AVPV Models. **Mol Endocrinol**, v. 30, n. 2, p. 217-33, Feb 2016.

TRIVEDI, A.M; SINGH,D.; DIXIT, A.S.; KUMAR,V. Pineal Gland, Melatonin, and Timekeeping in Nonmammalian Vertebrates: Avian Perspective. In: KUMAR, V. (Ed.). **Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour**. 1ª: Springer, 2017. cap. 25, p.521-541.

UTIAN, W. H. Psychosocial and socioeconomic burden of vasomotor symptoms in menopause: a comprehensive review. **Health Qual Life Outcomes**, v. 3, p. 47, Aug 5 2005.

VAN DER BEEK, E. M. Circadian control of reproduction in the female rat. **Prog Brain Res**, v. 111, p. 295-320, 1996.

VAN DER BEEK, E. M. et al. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. **J Comp Neurol**, v. 384, n. 4, p. 569-79, Aug 11 1997.

VAQUERO, A.; REINBERG, D. Calorie restriction and the exercise of chromatin. **Genes Dev**, v. 23, n. 16, p. 1849-69, Aug 15 2009.

VIDA, B. et al. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. **J Neuroendocrinol**, v. 22, n. 9, p. 1032-9, Sep 2010.

WANG, Z. et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. **Nat Genet**, v. 40, n. 7, p. 897-903, Jul 2008.

WIEGAND, S. J.; TERASAWA, E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 395-404, Jun 1982.

WIEGAND, S. J. et al. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. **Neuroendocrinology**, v. 31, n. 2, p. 147-57, Aug 1980.

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 19 2006.

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.

_____. Neuroendocrine modulation of the "menopause": insights into the aging brain. **Am J Physiol**, v. 277, n. 6 Pt 1, p. E965-70, Dec 1999.

WISE, P. M. et al. Aging of the female reproductive system: a window into brain aging. **Recent Prog Horm Res**, v. 52, p. 279-303; discussion 303-5, 1997.

WISE, P. M.; SMITH, M. J. 56 - Neuroendocrine Aspects of Female Reproductive Aging. In: (Ed.). **Functional Neurobiology of Aging**. San Diego: Academic Press, 2001. p.795-806. ISBN 978-0-12-351830-9.

WISE, P. M. et al. Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 243-8, Jun 1999.

YANG, G. et al. Timing of expression of the core clock gene *Bmal1* influences its effects on aging and survival. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 324, p. 324ra16, Feb 03 2016.

YAP, C. C. et al. Diurnal regulation of hypothalamic kisspeptin is disrupted during mouse pregnancy. **J Endocrinol**, v. 229, n. 3, p. 307-18, Jun 2016.

YASUO, S. et al. Circadian clock genes and photoperiodism: Comprehensive analysis of clock gene expression in the mediobasal hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the pineal gland of Japanese Quail under various light schedules. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3742-8, Sep 2003.

YIN, W.; GORE, A. C. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1204, p. 113-22, Aug 2010.

ZHANG, Z. et al. Rhythmic expression of circadian clock genes in the preovulatory ovarian follicles of the laying hen. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179019, 2017.