

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

ANGELA CRISTINA DE NICOLA

**ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DO LOCUS COERULEUS
E O CONTEÚDO DE GnRH EM RATAS WISTAR ACÍCLICAS**

ARAÇATUBA

2013

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

**ATIVIDADE DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DO LOCUS COERULEUS
E O CONTEÚDO DE GnRH EM RATAS WISTAR ACÍCLICAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de mestre 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 Janete Aparecida Anselmo-Franci

ARAÇATUBA

2013

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)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N634a Nicola, Angela Cristina de.
Atividade dos neurônios noradrenérgicos do *Locus coeruleus* e o conteúdo de GnRH em ratas Wistar acíclicas / Angela Cristina de Nicola. - Araçatuba, 2013
77 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles
Coorientadora: Profa. Janete Aparecida Anselmo- Franci

1. Área pré-óptica 2. Hormônio Liberador de Gonadotrofinas 3. Hipotálamo médio Basal 4. *Locus coeruleus*. 5. Envelhecimento I. T.

CDD 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angela Cristina de Nicola

Atividade dos neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus e o conteúdo de GnRH em ratas Wistar acíclicas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

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

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Janete Aparecida Anselmo-Franci

Aprovado em: 02/08/2013

Banca Examinadora

Prof.(a). Dr.(a): Maristela de Oliveira Poletini

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG

Prof.(a). Dr.(a): Jacqueline Nelisis Zanoni

Instituição: Universidade Estadual de Maringá/UEM

Prof.(a). Dr.(a): Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

DADOS CURRICULARES

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.

DEDICATÓRIA

A minha família, por sempre ser meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

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

À Diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof^{ra}. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor 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 (processo nº 2012/14464-6)

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 e conclusão dos experimentos.

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.

À Prof^a Dr^a Janete Aparecida Anselmo-Franci e seu grupo de pesquisa, pela acolhida e valiosa colaboração de seu laboratório.

Aos professores Dr^o João César Bedran de Castro pelos pareceres semestrais do projeto e Dr^o João Carlos Callera pela cessão do criostato para os cortes dos encéfalos.

As minhas amigas Natália Manrique, Aline Gozzi, Nayara Pestana de Oliveira e Letícia Oliveira Neri da Silva, que prontamente receberam-me em suas residências durante o período em que permaneci em Ribeirão Preto.

As minhas queridas amigas de Departamento Ligia, Ariana (Zuca) e Rita, que sempre estiveram junto comigo nas boas e nas horas mais difíceis.

Aos meus colegas de laboratório e de departamento, pela companhia de todas as horas.

Ao Departamento de Morfologia desta instituição, por ceder seu espaço para a realização de parte deste trabalho e a todos os seus funcionários e professores pela valiosa atenção e colaboração.

A todos os professores do departamento de Ciências Básicas: Sandra Helena Penha de Oliveira, Ana Cláudia Nakamune, Dóris Hissako Sumida, Cristina Antoniali Silva, Wilson Galhego Garcia, João Carlos Callera, João César Bedran de Castro, por somarem seus conhecimentos durante meu aprendizado.

Às professoras da banca Dr^a Maristela de Oliveira Poletini, Dr^a Jacqueline Nelisis Zanoni e Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles, pela valiosa contribuição intelectual neste trabalho.

A todos os funcionários da biblioteca e da seção de pós-graduação da FOA, por me auxiliarem em todos os momentos.

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu eterno companheiro 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.

Às novas pessoas que conheci durante a realização de parte deste trabalho na Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, em especial, à Dr^a Cristiane Mota Leite, que me ofereceu algo muito além de sua colaboração: sua sincera amizade.

As minhas jovens e senis ratinhas, por cederem suas vidas em *prol* de novas descobertas científicas.

A minha orientadora Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles, que me deu a oportunidade de tê-la como minha dirigente na busca pelo conhecimento científico e soube compreender minhas limitações, acreditando na superação e no bom desenvolvimento da pesquisa a mim confiada.

A **DEUS**, 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.

“A ciência não é acumulação de fatos, mas resolução de mistérios.”

(Matt Ridley)

RESUMO

NICOLA, A.C. **Atividade dos neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus e o conteúdo de GnRH em ratas Wistar acíclicas.** 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

RESUMO

As alterações nos componentes reprodutivos do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em muitas fêmeas de mamíferos determinam a transição gradual de ciclos reprodutivos regulares para ciclos irregulares, com perda de fertilidade. A interação dos neurônios do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e esteróides gonadais representa função chave na neurobiologia do envelhecimento, pois a sobreposição temporal da senescência endócrina e neural está mecanicamente interligada pelas alças de retroalimentação. Estímulos do locus coeruleus (LC) para a área pré-óptica (APO) e eminência mediana são essenciais para a liberação das gonadotrofinas e seus neurônios apresentam receptores para estrógeno e progesterona, sugerindo controle dos esteróides ovarianos. Neste estudo foi avaliado a atividade de células neuronais localizadas em áreas e núcleos envolvidos com o controle de ação dos neurônios GnRH de ratas Wistar no período de transição para a aciclicidade. Para este trabalho foram utilizadas fêmeas Wistar cíclicas (4 meses) e acíclicas (18-20 meses) submetidas à decapitação ou perfusão às 10, 14 e 18 h na fase do diestro. Após serem retirados, os cérebros dos animais decapitados foram congelados e armazenados para posterior determinação do conteúdo de GnRH hipotalâmico e do conteúdo de noradrenalina e dopamina na APO. Os cérebros perfundidos foram cortados seriadamente em secções coronais de 30 µm para a APO e o LC e posteriormente submetidos à marcação imunohistoquímica para *Fos* (FRA) e FRA/TH, respectivamente. Para análise quantitativa da APO foram considerados os *plates* que contêm o AVPe sendo a contagem dos neurônios FRA-ir realizada a partir da inserção de caixa com diâmetro variando em função da altura do 3º ventrículo e para o LC foram considerados somente os neurônios duplamente marcados para FRA/TH. Em todas as análises foram considerados os *plates* comuns a todos os animais. O plasma dos animais experimentais foi utilizado para as dosagens de LH, FSH, PRL e esteróides gonadais. O conteúdo de GnRH hipotalâmico e as concentrações plasmáticas de LH das ratas acíclicas foi menor e constante nos três horários analisados, com maior taxa de *turnover* (MHPG/NA) na APO destes animais durante os horários estudados. A concentração plasmática de FSH foi semelhante entre os animais experimentais. Os valores para PRL foram maiores e decrescentes ao longo dos horários nos animais senis e o conteúdo de dopamina menor nos neurônios da APO nesse grupo de animais. Nas ratas acíclicas, a concentração plasmática do

estrógeno foi maior e crescente enquanto que a de progesterona foi decrescente nos horários analisados. A análise da imunohistoquímica para *Fos* (FRA) no AVPe e FRA/TH no LC evidenciou maior atividade neuronal na APO e atividade noradrenérgica no LC em animais acíclicos durante o diestro persistente. A partir destes resultados pode-se sugerir que durante o envelhecimento, os neurônios noradrenérgicos da APO e LC apresentam maior atividade compensatória, possivelmente, em razão da menor capacidade de síntese e armazenamento do neurotransmissor e que alterações na secreção dos hormônios ovarianos não parece ser a causa primária no estabelecimento da senescência reprodutiva.

PALAVRAS-CHAVE: Envelhecimento reprodutivo, GnRH, Esteroides ovarianos, APO, LC, Noradrenalina, Gonadotrofinas, Aciclicidade

ABSTRACT

NICOLA, A.C. **Activity of the Locus Coeruleus noradrenergic neurons and the GnRH content in female acyclic rats.** 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

ABSTRACT

Changes in reproductive components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in many female mammals determine the gradual transition from regular reproductive cycles to irregular cycles, with loss of fertility. The interaction of neurons of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadal steroids represents key role in the neurobiology of aging, because the temporal overlap of endocrine and neural senescence is mechanically interconnected by feedback loops. Stimulation of the locus coeruleus (LC) for the preoptic area (POA) and median eminence are essential for the release of gonadotropins and their neurons have receptors for estrogen and progesterone, suggesting control of ovarian steroids. Therefore, in this study we evaluated the activity of neuronal cells located in areas and nuclei involved in the control of action of GnRH neurons of female rats during the transition to acyclicity. For this study, we used cyclic female (4 months) and acyclic (18-20 months) rats underwent perfusion or decapitation at 10, 14 and 18 h of diestrus day. The brains from decapitated animals, after removed, were frozen and stored for subsequent determination of the hypothalamic GnRH content and the noradrenaline and dopamine content in the POA. The perfused brains were serially cut into coronal sections of 30 μm to POA and LC and subsequently submitted to immunohistochemical labeling for *Fos* (FRA) and FRA / TH, respectively. For quantitative analysis of the POA were considered plates containing AVPe being the counting of neurons FRA-ir performed from the insertion of the box with a diameter varying depending on the height of the 3rd ventricle and the LC were considered only neurons doubly labeled for FRA / TH. In all analyzes were considered plates common to all animals. The plasma of the experimental animals was used for the assay of LH, FSH, PRL and gonadal steroids. The GnRH content and LH concentrations of the acyclic rats were smaller and constant at the time intervals analyzed, with increased of turnover rate (MHPG / NE) in the POA of these animals during the times studied. The concentration of FSH was similar among the experimental animals. Values for PRL were higher and decreasing over the time in old animals and the dopamine content was lower in the POA neurons in this group of animals. In acyclic rats, the plasma concentration of estrogen was higher and growing while progesterone was decreasing at time intervals analyzed. Immunohistochemical analysis for the *Fos* (FRA) in AVPe and FRA / TH in LC showed greater neural activity in POA and noradrenergic

activity in the LC in acyclic animals during persistent diestrus. From these results it can be suggested that during aging, the noradrenergic neurons of the LC and POA have higher compensatory activity, possibly due to reduced capacity for synthesis and storage of neurotransmitters and changes in the secretion of ovarian hormones don't seem to be the primary cause in the establishment of reproductive senescence.

KEY WORDS: Reproductive aging, Locus coeruleus, Preoptic Area, GnRH, Noradrenaline, Acyclicity, Ovarian steroids, Gonadotropins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos núcleos cerebrais envolvidos com o controle da ativação dos neurônios GnRH, mediante as alças de retroalimentação mediada pelos esteroides ovarianos.

Figura 2 – Nomenclatura dos estágios do envelhecimento reprodutivo normal em mulheres.

Figura 3 - Esquema da microdissecção do hipotálamo médio basal.

Figura 4 - Representação esquemática dos cortes coronais seriados realizados na Área Pré-óptica.

Figura 5 - Representação esquemática dos cortes coronais seriados realizados no Locus Coeruleus.

Figura 6 - Esquema mostrando o procedimento para contagem dos neurônios imunorreativos para FRA/TH no LC.

Figura 7 – Secções coronais da APO indicando os neurônios imunorreativos para FRA no AVPe de acordo com a distância do bregma para cada secção rostral.

Figura 8 – Esquema mostrando o procedimento para contagem dos neurônios imunorreativos para FRA no AVPe.

Figura 9 – Incidência da fase de diestro nos grupos experimentais. (A) Animais jovens (4 meses) e (B) Animais senis (18-20 meses).

Figura 10 – Concentração de GnRH no hipotálamo médio basal de animais jovens e senis por RIE, em função do horário de coleta.

Figura 11 – Concentração de LH e FSH plasmáticos de animais jovens e senis por RIE, em função do horário de coleta.

Figura 12 – Concentração de PRL plasmática de animais jovens e senis por RIE, em função do horário de coleta.

Figura 13 – Concentração de estradiol e progesterona plasmáticos de animais jovens e senis por RIE, em função do horário de coleta.

Figura 14 – Conteúdo de neurotransmissores (NA e DA) e respectivos metabólitos (MHPG e DOPAC) na APO de animais jovens e senis por HPLC, em função do horário de coleta.

Figura 15 - Número de neurônios imunorreativos para FRA no AVPe da APO durante três horários do diestro de animais jovens e senis.

Figura 16 - Número de neurônios imunorreativos para FRA no AVPe da APO durante três horários do o diestro de animais jovens e senis.

Figura 17 – Fotomicrografias do AVPe evidenciando a marcação nuclear para FRA em animais jovens e senis às 10 e 14 h do diestro.

Figura 18 – Fotomicrografias do LC evidenciando a dupla marcação (nuclear e citoplasmática) para FRA/TH em animais jovens e senis às 10 e 14 h do diestro.

Figura 19 – Incidência cronológica de ciclos estrais regulares e irregulares em ratas.

Figura 20 – Modelo clássico dos ritmos circadianos do eixo HPG de fêmeas (esq.), modelo de controle multi-oscilador dos ritmos circadianos do eixo HPG de fêmeas (dir.)

LISTA DE ABREVIATURAS

APO – área pré-óptica

APOM – área pré-óptica medial

ARC - arqueado

AVPe – núcleo pré-óptico periventricular

BSA – albumina sérica bovina

DA – dopamina

DAB – diaminobenzidina

DOPAC - ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EM – eminência mediana

EPM – erro padrão da média

ER – receptor de estrógeno

FRA – antígeno relacionado ao *fos*

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HHG – hipotálamo-hipófise-gônadas

HMB – hipotálamo médio basal

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

ip - intraperitoneal

ISOP - isoproterenol

Kg – kilograma

LC – locus coeruleus

LH – hormônio luteinizante

μL – microlitro

μm – micrômetro

M – molar

mg – miligramma

MHPG - 3-methoxy-4-hidroxi-phenilglicol

min – minuto

mL – mililitro

NA – noradrenalina

NiSO₄ – sulfato de níquel

PBS – tampão fosfato salina

PCA – ácido perclórico

PFA – paraformaldeído

PR – receptor de progesterona

RIE – radioimunoensaio

rpm – rotação por minuto

SCN – núcleo supraquiasmático

SNC – sistema nervoso central

TH – tirosina hidroxilase

TRH - hormônio liberador de tireotrofina

VIP - peptídeo vasoativo intestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Animais.....	34
2.2 Ciclo estral.....	34
3 EXPERIMENTO I: Avaliação do conteúdo de GnRH do HMB e dosagem de catecolaminas da APO de ratas acíclicas e cíclicas	34
3.1 Coleta das Amostras	34
3.2 Microdissecção das áreas cerebrais: HMB e APO	35
3.4 Dosagem de Catecolaminas da APO por cromatografia líquida de alta performance com detecção electroquímica (HPLC-EC)	36
4 EXPERIMENTO II: Atividade dos neurônios do núcleo Anteroventral Periventricular (AVPe) da Área Pré-Óptica e neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus de ratas cíclicas e acíclicas.....	37
4.1 Coleta das Amostras	37
4.1.1 Perfusão	37
4.2 Imunohistoquímica	38
4.2.1 Obtenção dos cortes.....	38
4.2.2 Preparação do tecido.....	39
4.2.3 Incubação com os anticorpos.....	40
4.2.4 Montagem dos cortes.....	40
5 Dosagens hormonais plasmáticas	42
6 Análise Estatística	43
7 RESULTADOS	45

7.1 Ciclo estral – Modelo experimental.....	45
7.2 Ensaio Hormonais	45
7.3 Dosagem de Catecolaminas.....	48
7.4 Imunohistoquímica da Área Pré-óptica	49
7.5 Imunohistoquímica do Locus coeruleus	51
8 DISCUSSÃO	54
9 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	77

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Todos os organismos vivos passam pelo processo de envelhecimento programado, conforme determina seu código genético, somado a fatores ambientais (DENG, 2012). Alterações na maioria dos sistemas fisiológicos que incluem degeneração estrutural, perda da capacidade funcional e prejuízo de coordenação dentro e entre os sistemas acompanham este processo (MILLER, 1998).

Aspecto surpreendente do envelhecimento é a senescência reprodutiva em fêmeas, que diferentemente dos machos, se manifesta por declínio e cessação da reprodução tempos antes (após aproximadamente 1/3 do seu tempo de vida) do envelhecimento somático (DENG, 2012). Esta fase é acompanhada por alterações da função ovariana, que trazem como resultado a diminuição abrupta de estrogênio (devido a redução do número de folículos ovarianos) e alterações na secreção de progesterona, que acarretam mudanças a nível corporal e cerebral (CHAKRABORTY; GORE, 2004) resultando na transição gradual de ciclos reprodutivos regulares para ciclos irregulares, até culminar com a perda da fertilidade (YIN; GORE, 2006).

O número de evidências associando o envelhecimento às alterações dinâmicas nos componentes hipotálamo-hipofisários do eixo reprodutivo têm aumentado (HALL *et al.*, 2000). O declínio das gonadotrofinas e a redução da resposta hipofisária ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) relacionados ao envelhecimento, indicam influência da idade nos componentes neuroendócrinos do eixo reprodutivo feminino independentemente de alterações na função ovariana (SHAW, 2011). Estudos utilizando lesões eletrolíticas na área pré-óptica (APO) de animais jovens demonstraram que estes animais exibem ciclos irregulares assim como os animais senis (CLEMENS; BENNET, 1977) e que a estimulação eletroquímica deste mesmo núcleo resulta em aumento da secreção do hormônio luteinizante (LH) em animais senis com aciclicidade (WUTTKE; MEITES, 1973).

O GnRH constitui fator regulador primário do eixo reprodutivo que controla a puberdade, a ovulação e estimula a secreção hipofisária de gonadotrofinas (GORE, 2002). Em roedores, neurônios GnRH localizam-se em diferentes regiões cerebrais, incluindo estruturas septais, olfatórias, pré-ópticas e hipotalâmicas (SILVERMAN *et al.*, 1987). Neurônios de estruturas como o núcleo anteroventral periventricular (AVPe) e o núcleo arqueado (ARC), projetam-se diretamente para os neurônios GnRH e são

essenciais no controle da liberação do decapeptídeo e na indução do pico de LH através da modulação pelos esteroides ovarianos (BU; LEPHART, 2007; SMITH, 2008) (Figura 1).

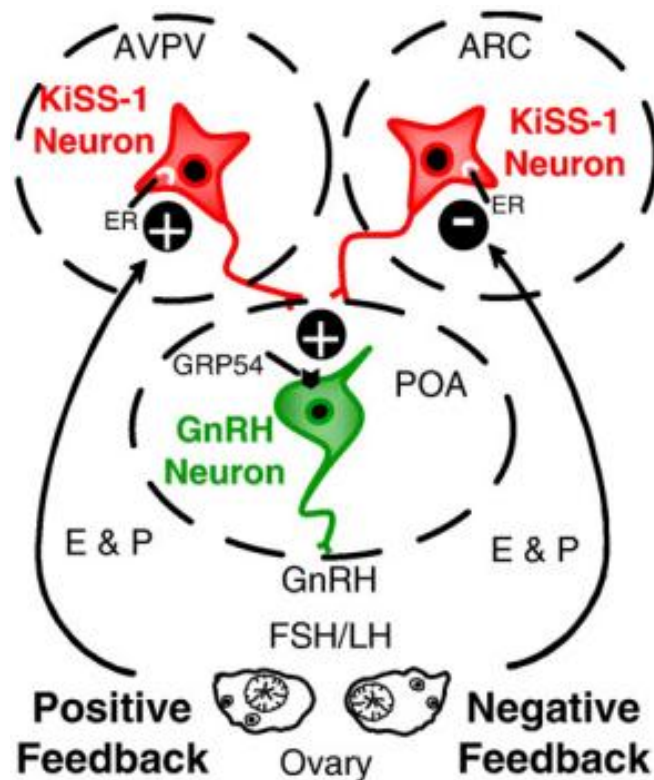


Fig. 1 – Representação dos núcleos cerebrais envolvidos com o controle da ativação dos neurônios GnRH, mediante as alças de retroalimentação mediada pelos esteroides ovarianos. Adaptado de Smith, 2008

A secreção contínua de GnRH ou o prolongamento de seus pulsos podem ser acompanhados de redução em sua degradação enzimática na eminência mediana ou na circulação porta-hipofisária (ADVIS; KRAUSE; MCKELVY 1982) pelo estradiol, sugerindo regulação direta deste nesta degradação bem como redução na duração do pico de LH pode levar ao prolongamento dos pulsos de GnRH, demonstrando que a frequência da secreção hormonal é mais importante, muitas vezes, que a quantidade do hormônio liberado (CLARKE, 1995). O pico de GnRH é influenciado diretamente pelo estradiol (RADOVICK; LEVINE; WOLFE, 2012) e pode ser iniciado por aumento na amplitude de pulso, aumento na frequência de pulsos ou por um único pulso longo, conforme sugerem os resultados obtidos a partir de ovelhas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (CLARKE, 1993).

Em roedores, o pico de GnRH/LH não é somente dependente da retroalimentação exercida pelo estradiol, mas também envolve sinais neurais

circadianos do núcleo supraquiasmático (SCN) em horários apropriados do dia (CHRISTIAN; MOENTER, 2008) e dos efeitos excitadores e inibidores de neurônios VIP (peptídeo vasoativo intestinal) que indiretamente controlam os neurônios GnRH via núcleo AVPe da APO (WATSON *et al.*, 1995; OTTEM *et al.*, 2004).

Segundo Smith e colaboradores (2005a), durante o envelhecimento reprodutivo de ratas o eixo neuroendócrino passa por importante processo de envelhecimento, com destaque para a participação dos receptores de estradiol no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HHG), visto que este esteróide atua diretamente por retroalimentação, estimulando o GnRH e os hormônios gonadotróficos [hormônio folículo-estimulante (FSH) e LH].

O estrógeno exerce função crítica na regulação de muitos processos fisiológicos em tecidos reprodutivos e não-reprodutivos, além de ser mediador da sinalização intracelular através de ligação ao seu receptor (LI *et al.*, 2013). Os receptores estrogênicos ($ER\alpha$ e $ER\beta$) ao se ligarem ao seu ligante, agem como fatores de transcrição, cujos produtos em última análise, alteram a fisiologia da célula (GIESKE *et al.*, 2008) ou auxiliam o funcionamento de órgãos e tecidos através da ação não-genômica estrogênica sobre receptores associados à superfície da membrana celular (LI *et al.*, 2013)

As alterações relacionadas com a idade na regulação neuroendócrina da secreção máxima de LH no proestro não somente servem como indicadores da idade reprodutiva, mas também contribuem imediatamente para diminuir a taxa de ovulação e/ou anovulação. Análise da magnitude do pico de LH e taxa de ovulação em ratas jovens e de meia idade revelaram correlação da magnitude da secreção máxima de LH e o número de óvulos, de forma que ratas de meia idade com picos de LH atenuados apresentaram diminuição no número de folículos (LAPOLT *et al.*, 2001).

Classicamente conhecida por agir sobre as glândulas mamárias (mamogênese), síntese de leite (lactogênese) e manutenção da secreção de leite (galactopoiese) (FREEMAN *et al.*, 2000), a prolactina (PRL), um hormônio proteico produzido pelos lactotrofos adhipofisários, também possui efeito regulador sobre o comportamento reprodutivo e modula o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 2000), sendo que em roedores, seu pico é regulado pela neurotransmissão noradrenérgica na APOM (SZAWKA *et al.*, 2007a).

A tonicidade de liberação deste hormônio é inibida pela secreção de dopamina (DA) de neurônios hipotalâmicos (FREEMAN *et al.*, 2000). Três populações neuronais fornecem DA para a hipófise: os neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos (TIDA), neurônios localizados na porção dorsomedial do núcleo arqueado (ARC) que se projetam para a eminência mediana (KAWANO; DAIKOKU, 1997), os neurônios tuberohipofisários dopaminérgicos que partem do ARC rostral e projetam-se para os lobos intermediário e neural da hipófise (HOLZBAUER; RACKE, 1985), e os neurônios dopaminérgicos periventriculares hipofisários que surgem do núcleo periventricular (PE), e inervam exclusivamente o lobo intermediário da hipófise (GOUDREAU *et al.*, 1995).

A secreção de PRL pelos lactotrofos adenohipofisários é regulada diretamente pelo estradiol, que os aumenta em tamanho e número (DE PAUL *et al.*, 1997), induzindo a síntese (YAMAMOTO *et al.*, 1986), o armazenamento (KIINO; DANNIES, 1981) e a liberação deste hormônio (WEST; DANNIES, 1980). O estradiol ainda é capaz de reduzir a responsividade dos lactotrofos à inibição dopaminérgica *in vitro* (RAYMOND *et al.*, 1978; WEST; DANNIES, 1980) e *in vivo* (LIVINGSTONE *et al.*, 1998) e aumentar a responsividade dos lactotrofos a fatores estimuladores como o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (GUIGUERE *et al.*, 1982) e (VIP) (PIZZI *et al.*, 1992).

Durante a senescência reprodutiva, as mulheres vivenciam alterações na regularidade e comprimento do ciclo menstrual, bem como alterações endócrinas que acompanham os vários estágios do envelhecimento reprodutivo, denominados de peri e posmenopausa, conforme ilustra a Figura 2 (SOULES *et al.*, 2001). O termo menopausa significa “pausa dos ciclos menstruais e ovulatórios” e é caracterizado pelo fim irreversível da vida reprodutiva em mulheres como consequência da depleção progressiva dos folículos ovarianos (VERMEULEN, 1993).

								Final Menstrual Period (FMP)		
								0		
Stages:	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2			
Terminology:	Reproductive			Menopausal Transition		Postmenopause				
	Early	Peak	Late	Early	Late*	Early*	Late			
				Perimenopause						
Duration of Stage:	variable			variable		a 1 yr	b 4 yrs	until demise		
Menstrual Cycles:	variable to regular	regular		variable cycle length (>7 days different from normal)	≥2 skipped cycles and an interval of amenorrhea (≥60 days)	Amen. x 12 mos	none			
Endocrine:	normal FSH		↑ FSH	↑ FSH		↑ FSH				

Fig. 2 – Nomenclatura dos estágios do envelhecimento reprodutivo normal em mulheres.

Fêmeas de roedores, assim como as mulheres, possuem ritmicidade cíclica durante a fase reprodutiva e também experimentam perda de fertilidade e “pausa” em seus ciclos reprodutivos, por isso são consideradas modelos para o estudo experimental da avaliação das funções reprodutivas (LeFEVRE; McCLINTOCK, 1988; WISE, 1999). Exibem ciclo denominado estral, que possui duração aproximada de cinco dias e quatro fases distintas: metaestro, diestro, proestro e estro, onde as concentrações plasmáticas dos hormônios ovarianos variam.

Em Westwood e colaboradores (2008) estas fases encontram-se descritas: metaestro e diestro compõem as fases finais do ciclo estral e caracterizam o período secretor, pois há predomínio de progesterona nas concentrações plasmáticas, refletida pelos tipos celulares encontrados no esfregaço vaginal: leucócitos, células nucleadas e corneificadas no metaestro e predomínio de leucócitos no diestro. O metaestro possui duração aproximada de 6 a 8 horas e o diestro de 55 a 57 horas. As fases de proestro e estro duram 12 a 14 horas e 24 a 27, respectivamente e são influenciadas pelas concentrações plasmáticas de estradiol, a qual reflete os tipos celulares nucleados encontrados no proestro e corneificados no estro. Estas fases marcam o período denominado de proliferativo, onde há ocorrência do pico pré-ovulatório de LH e exibição da fase fértil do animal.

Durante a senescência reprodutiva em fêmeas de roedores com regularidade cíclica, há diminuição da magnitude (WISE, 1982), atraso no tempo de latência (GORE, 2001; HWANG *et al.*, 1990) do pico pré-ovulatório do LH no proestro e a depleção de

ovócitos parece não ser a causa primária deste processo, pois mesmo em ratas acíclicas há folículos funcionais (HUANG; MEITES, 1975). Portanto, a cessação do ciclo estral parece ter origem hipotalâmica, uma vez que pode ocorrer nestes animais o reaparecimento da ciclicidade quando seus ovários são transplantados em animais que exibem regularidade de ciclo estral (CLEMENS; BENNET, 1977). A redução na liberação de GnRH é refletida na diminuição do número de neurônios GnRH que expressam *Fos* e *Jun* (RUBIN *et al.*, 1994; STEGER *et al.*, 1980). No entanto, é relatado em alguns estudos que o número de neurônios GnRH e o conteúdo deste hormônio no hipotálamo médio basal (HMB) não é alterado logo após o estabelecimento da senescência reprodutiva (GORE; ROBERTS, 1995; GORE *et al.*, 2000; LE *et al.*, 2001; YIN; GORE, 2006), sugerindo que o déficit durante o período de meia-idade está na(s) via(s) aferente(s) que regula(m) a síntese e/ou secreção de GnRH. Foi verificado por Nakamura e colaboradores (2011) declínio na amplitude da atividade elétrica das células do SCN de camundongos na meia-idade. É de conhecimento que projeções diretas do SCN para os neurônios GnRH são responsáveis pela geração do sinal neural ovulatório bem como controlam a ritmicidade e sincronização do relógio biológico com as pistas ambientais, traduzindo as informações do comprimento do ciclo de claro/escuro (POLETINI, 2012). Portanto, o início da menopausa em humanos (WISE *et al.*, 1999) e da “estropausa” em fêmeas de roedores (CHAKRABORTY; GORE, 2002; EDERY 2000; LU *et al.*, 1979; SATINOFF *et al.*, 1993) parece ser acompanhado por alterações nos ritmos biológicos ou circadianos, cujo controle ocorre principalmente a nível transcricional no SCN através da regulação dos genes do relógio (BALSALOBRE, 2002) expressos de maneira circadiana em neurônios GnRH, gonadotrófos hipofisários e nos ovários, cujas proteínas possivelmente sejam parte do sinal circadiano responsável pelo pico pré-ovulatório de LH, o qual ocorre em sincronia com as variações no fotoperíodo (POLETINI, 2012).

Conjunto de evidências experimentais sinaliza a importância da sincronia e coordenação dos sinais neurais para a liberação precisa de GnRH e manutenção do ciclo estral regular (WISE *et al.*, 1999; YIN; GORE, 2006). Entre os neurotransmissores, a noradrenalina (NA) exerce importante atuação para a regulação do eixo HHG em várias espécies (HERBISON, 1997; PAU *et al.*, 2000), caracterizada pela correlação na liberação de NA, que atua amplificando e antecipando o pico e a secreção de LH pré-ovulatório (SZAWKA *et al.*, 2009; WISE, 1982). Porém, a ação da NA, principalmente através do receptor α -adrenérgico, estimulando a liberação de GnRH, é diminuída no

envelhecimento (TEMEL *et al.*, 2002). Além disso, receptores de estrógeno (ER α e ER β) (PEREIRA *et al.*, 2010; HELENA *et al.*, 2009) e progesterona (PR α e PR β) (HELENA *et al.*, 2009) foram evidenciados em neurônios noradrenérgicos, sugerindo que essas células são sensíveis às variações na concentração plasmática dos esteróides ovarianos e representam via aferente primária para os neurônios GnRH, que expressam receptores adrenérgicos imunorreativos (HOSNY; JENNES, 1998).

Dentre as regiões cerebrais que expressam receptores para os esteróides femininos, a APO de fêmeas de roedores expressa notável concentração destes receptores, sendo sítio crítico no qual o estrógeno atua para regular o comportamento sexual e a secreção dos hormônios reprodutivos. Além disso, esta área recebe densas projeções noradrenérgicas dos núcleos A₁, A₂ (HAN; HERBISON, 2008) e A₆ (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1999) da medula e tronco cerebral cujas subpopulações neuronais também expressam receptores de estrogênio e atuam sob a ação neurotransmissora da NA (SMITH *et al.*, 2005b; SZAWKA *et al.*, 2013).

Regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) que não estão primordialmente ligadas à função reprodutiva também expressam receptores para estrógeno e progesterona. Dentre elas, destaca-se o Locus Coeruleus (LC), que é fonte primária de NA no cérebro e de onde o feixe noradrenérgico ascende com projeção para regiões do SNC (GRZANNA; MOLLIVER, 1980) onde ocorre a síntese de GnRH, como a área pré-óptica medial (APOM) e os terminais de GnRH na eminência mediana (EM), localizado no HMB (WRIGHT; JENNES, 1993). Este núcleo da formação reticular pontina, está envolvido, entre outras funções, com a regulação da função reprodutiva de fêmeas, as quais possuem maior número de neurônios noradrenérgicos que os machos (PENDERGAST; TUESTA; BETHEA, 2008). Estudos de Martins-Aférrri e colaboradores (2003) evidenciaram a atuação estimuladora do LC na secreção de LH, observada pelo seu aumento, após estimulação eletroquímica. Este mesmo grupo verificou que lesão do LC (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1999) resulta em diminuição na concentração de NA no hipotálamo e APO e impede a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH (SZAWKA *et al.*, 2013). Portanto, há evidências precisas da participação dos neurônios noradrenérgicos do LC na ativação de neurônios GnRH (MARTINS-AFÉRRRI *et al.*, 2003) bem como a modulação fisiológica dos esteróides gonadais na atividade dos neurônios do LC em fêmeas, com possíveis implicações para a secreção de LH (SZAWKA *et al.*, 2009).

Neste estudo foi avaliada a atividade de células neuronais localizadas em áreas e núcleos envolvidos com o controle de ação dos neurônios GnRH de ratas Wistar cíclicas e acíclicas. Para tanto, realizou-se: (1) avaliação da atividade dos neurônios da área pré-óptica e LC dos animais experimentais, determinado pela imunoreatividade para antígenos relacionados ao Fos (FRA); (2) determinação e análise do conteúdo de GnRH do hipotálamo médio basal, (3) análise das concentrações plasmáticas de estradiol, progesterona, gonadotrofinas e prolactina, por radioimunoensaio (RIE), dos animais cíclicos (jovens) e acíclicos (senis) e (4) determinação das concentrações hipotalâmicas de noradrenalina e dopamina na APO destes animais através de HPLC.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) cíclicas (4 meses) e acíclicas (18 a 20 meses), segundo descrito por Lu e colaboradores (1979) e Lefevre e McClintock (1988). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa) em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz regular controlado (12/12 h), com acesso livre à água e ração (Presence[®] ratos e camundongos). Após o acompanhamento do ciclo estral, os mesmos foram distribuídos em dois grandes grupos experimentais: G1- Senis acíclicas em diestro persistente e G2 – Jovens cíclicas. Todos os animais experimentais foram submetidos à perfusão transcardíaca (sob prévia anestesia) ou à decapitação, em três horários distintos da fase do diestro: 10, 14 e 18 horas, a fim de determinar o perfil cíclico e a ritmicidade preparatória do organismo rumo à ocorrência do pico pré-ovulatório.

Todos os procedimentos utilizados para realização deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil, sob o número de protocolo CEUA: 01829-2011 (Anexo A).

2.2 Ciclo estral

O acompanhamento do ciclo estral de todos os animais foi realizado diariamente através do esfregaço vaginal colhido no período matutino (9h), e analisado à fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de LONG e EVANS (1922), durante todo o período experimental. Para este estudo foram utilizadas somente ratas jovens com comprovada ocorrência do ciclo estral e ratas senis em diestro persistente durante período que caracterizaria três ciclos consecutivos.

3 EXPERIMENTO I: *Avaliação do conteúdo de GnRH do HMB e dosagem de catecolaminas da APO de ratas acíclicas e cíclicas*

3.2 Coleta das Amostras

Após o acompanhamento do ciclo estral das fêmeas jovens e senis, realizou-se a decapitação dos animais com 4 e 18 meses, na fase de diestro (ratas cíclicas) e diestro persistente (ratas acíclicas), às 10, 14 e 18 horas do mesmo dia. Os cérebros foram rapidamente retirados, as regiões anterior e posterior foram separadas e imediatamente

congeladas à -70°C , em freezer, para posterior microdissecção de áreas da região anterior e dosagem de GnRH destas, por RIE.

3.3 Microdissecção das áreas cerebrais: HMB e APO

Para a remoção do HMB e da APO foi utilizada a técnica de “*punch*” descrita por Palkovits (1973). O cérebro foi fixado em plataforma recoberta com meio próprio para congelação (Tissue-tek o.c.t. coumpound, Miles INC.) adaptada ao criostato com temperatura mantida à -15°C . A localização desta área baseou-se no Atlas para coordenadas estereotáxicas de Paxinos (PAXINOS; WATSON, 2007). Duas fatias consecutivas de $1000\ \mu\text{m}$ foram obtidas a partir $1,8\ \text{mm}$ posterior ao bregma para o HMB e uma fatia de $1500\ \mu\text{m}$ para a APO foi obtida a partir de $+0,48\ \text{mm}$ posterior ao bregma. O HMB foi microdissecado com auxílio de agulha quadrada com $1,0\ \text{mm}$ de diâmetro, sendo considerado como o ponto médio do terceiro ventrículo, e a APO foi microdissecada com auxílio de agulha circular com $1,5\ \text{mm}$ de diâmetro, inserida acima do quiasma óptico (Figura 3).

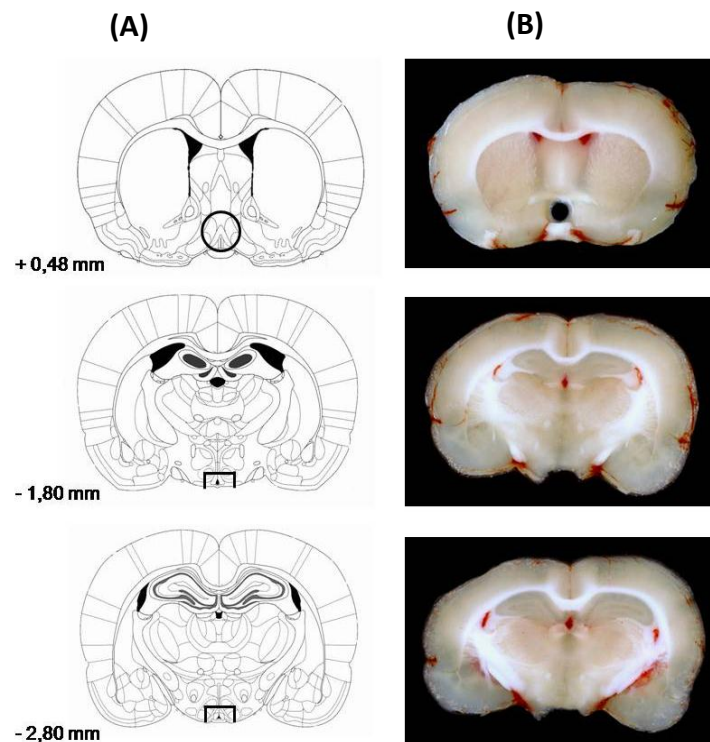


Fig. 3 – (A) Esquema das secções coronais indicando o ponto de inserção da agulha quadrada de $1\ \text{mm}$ para microdissecção do HMB e da agulha redonda de $2.0\ \text{mm}$ para microdissecção da APO. As coordenadas indicam a distância do bregma para cada secção rostral conforme Atlas de Watson e Paxinos, 2007. (B) Fotografias das secções coronais do HMB e APO em extensão aproximada de $1.8\ \text{mm}$ e $3.8\ \text{mm}$ do bregma para o HMB e $+0.48\ \text{mm}$ a $-1.02\ \text{mm}$ para a APO. (como representado em Helena *et al.*, 2009).

3.4 Dosagem de GnRH por radioimunoensaio (RIE)

As amostras do HMB de animais jovens e senis foram sonicadas com 50 μ L de HCl e centrifugadas (Eppendorf® modelo 5417 R) a 12000 rpm (aproximadamente 4000 Gs), durante 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado para ser realizada dosagem do conteúdo de GnRH por RIE e os pellets de tecido, utilizados para dosagem proteica pelo método de Bradford (1976) através de espectrofotometria, como fator de correção. Para a dosagem de GnRH, foi realizado ensaio utilizando-se o anticorpo para GnRH R1245 produzido por Terry Nett (Department of Biomedical Sciences, Colorado State University, CO, USA) e padrão fornecido pela Península Laboratories INC (Bachem INC, CA, USA). Também foi utilizado o hormônio marcado com 125 I pela PerkinElmer (NEX 1630-10 μ Ci, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, MA, USA). Todas as diluições foram realizadas em tampão fosfato gel com EDTA (pH=7.4). O ensaio foi mantido a 4°C e sua duração foi de cinco dias. A precipitação do complexo foi feita com álcool absoluto gelado. A radioatividade do precipitado foi determinada em contador gama (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer). O menor limite detectável foi de 0,24 pg/mL. Todas as amostras foram dosadas em duplicata no mesmo ensaio para evitar erro inter-ensaio. Os resultados foram corrigidos em função do teor de proteína do sedimento restante [Bradford (1976)] em ensaio de espectrofotometria de luz, e expressos em pg/ μ g de proteína do HMB.

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

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

dihidrogenofosfato de sódio, 15 mM citrato de sódio, 10 mM cloreto de sódio, 0,1 mM EDTA, 0,4 mM de ácido 1-octanesulfônico de sódio (Sigma-Aldrich) e 16% de metanol (Omnisolv; Merck Chemical Inc., Gibbstown, NJ, EUA). O pH foi ajustado para 3,5 com ácido fosfórico. A vazão da bomba (LC-10Advp; Shimadzu) foi de 0,4 mL/min e o potencial detector foi de 0,75 V (Década; Antec, Leyden, Holanda). Os dados de cromatografia foram plotados com o software Class-VP (Shimadzu). NA, MHPG, DA e DOPAC foram identificados pelo seu tempo de retenção de pico, e quantificados pelo método-padrão interno em função da área sob o pico. Todas as amostras foram processadas na mesma análise para evitar erro inter-ensaio e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,6% para NE, 6,6% para MHPG, 9,4% para DA e 1,82% para DOPAC. O menor limite detectável foi de 0,5 pg. Os níveis de NA e DA foram considerados para estimar estoque do neurotransmissor em vesículas sinápticas, ao passo que os níveis de MHPG e DOPAC refletem, respectivamente, a quantidade do neurotransmissor liberado na amostra. As taxas de MHPG / NA e DOPAC/DA foram utilizadas como medida de volume do neurotransmissor. No sedimento restante, foi determinado o teor de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4 EXPERIMENTO II: *Atividade dos neurônios do núcleo Anteroventral Periventricular (AVPe) da Área Pré-Óptica e neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus de ratas cíclicas e acíclicas.*

4.1 Coleta das Amostras

4.1.1 Perfusão

Animais adultos jovens e senis foram perfundidos transcardiacamente nos horários das 10, 14 e 18 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 a retirada de aproximadamente 5 mL de sangue, em seringa heparinizada, diretamente do ventrículo esquerdo do coração, para dosagens plasmáticas posteriores dos hormônios esteroidais ovarianos, gonadotrofinas e prolactina. A artéria aorta abdominal foi clampeada e realizada injeção de 0,1 mL de heparina diretamente no músculo cardíaco, para evitar coagulação. Pequena incisão foi realizada no ápice do músculo, que foi divulgionado para a introdução da cânula conectada à bomba de

perfusão (Masterflex modelo 7518-12) até atingir a artéria aorta ascendente para o clampeamento de todo o conjunto (músculo cardíaco e bomba).

Durante a perfusão, utilizou-se aproximadamente 100 mL de tampão fosfato salina (PBS) a 0,01 M para a lavagem sistêmica do animal (fluxo 14 mL/min, por aproximadamente 5 min) e limpeza do cérebro. Posteriormente, volume aproximado de 700 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 (aproximadamente 48 h). Em seguida, o mesmo foi cuidadosamente seco em papel absorvente para ser congelado através de mergulho rápido em isopentano (temperatura entre -45 e -50°C) durante 1min. Logo após, foi armazenado a -70°C para processamento e análise posteriores.

4.2 Imunohistoquímica

4.2.1 Obtenção dos cortes

Cortes coronais seriados de $30\ \mu\text{m}$ das regiões da APO (Figura 4) e LC (Figura 5), conforme Atlas de Watson e Paxinos para coordenadas estereotáxicas em cérebro de rato (2007), foram obtidos em criostato a -22°C , armazenados em tubos com 1,5 mL de solução crioprotetora e estocados a -20°C para serem processados imunohistoquimicamente um em cada quatro cortes/poço para FRA na APO e FRA/TH no LC, totalizando 60 cortes para a APO e 70 corte para o LC, aproximadamente.

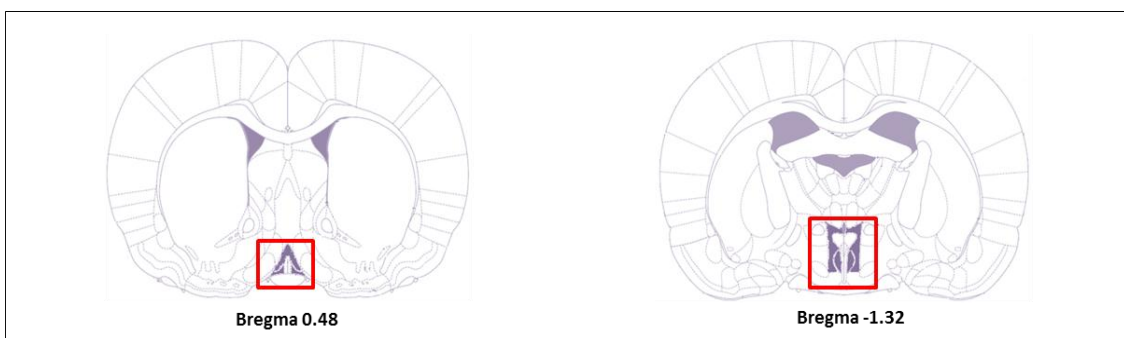


Fig. 4 – Representação esquemática dos cortes coronais seriados realizados em toda a extensão da Área pré-óptica (Bregma +0.48 mm ao Bregma -1.32mm) (Watson; Paxinos, 2007).

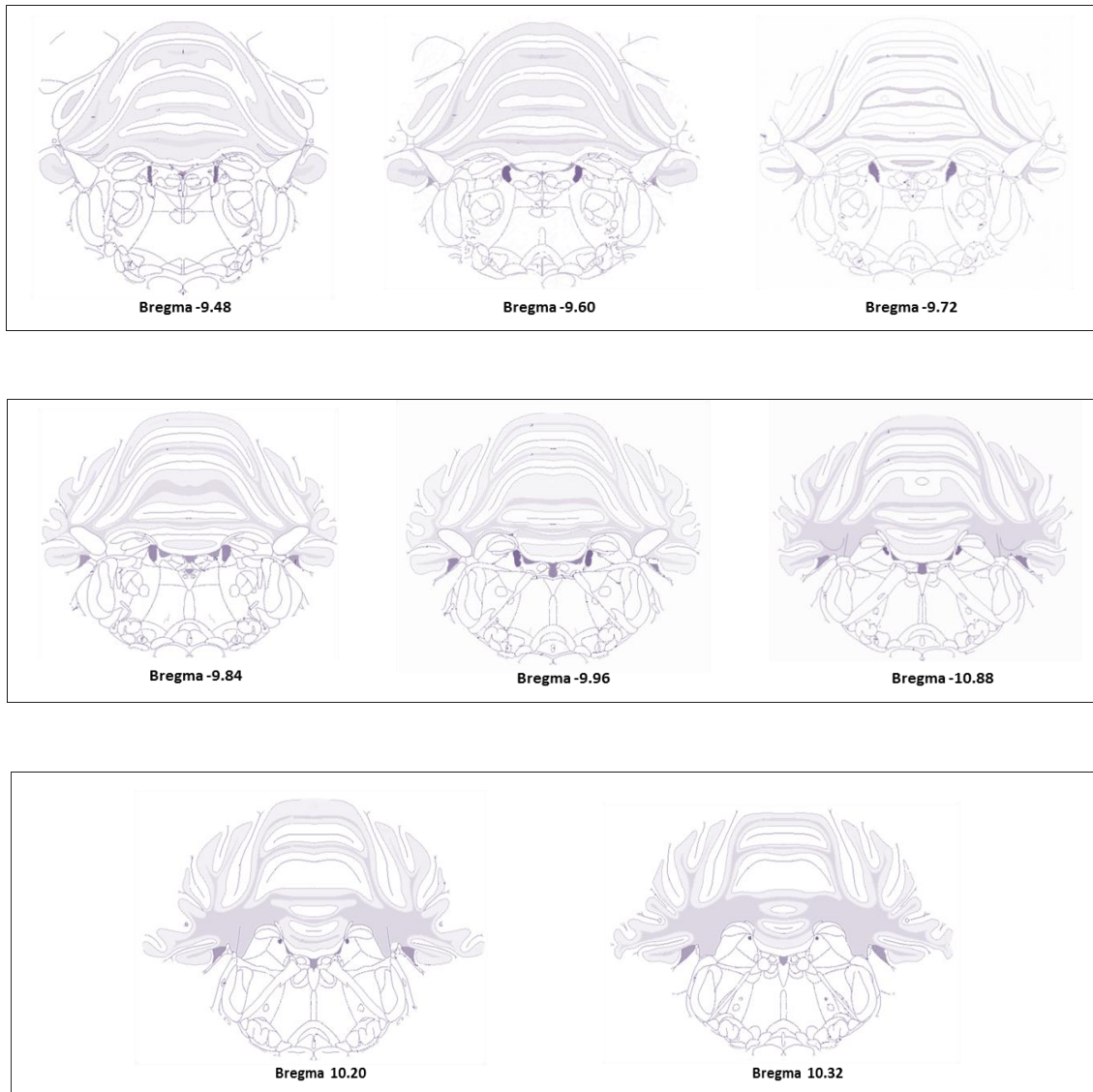


Fig. 5 – Representação esquemática dos cortes coronais seriados realizados em toda a extensão do Locus coeruleus (Bregma -9.48mm ao +10.32 mm) (Watson; Paxinos, 2007)

4.2.2 Preparação do tecido

A imunohistoquímica foi realizada pelo método “free-floating”. Antes do início da imunohistoquímica os cortes foram lavados três vezes, por 5 minutos, em PBS 0,01M para remoção da solução crioprotetora. Todas as etapas da preparação do tecido foram realizados à temperatura ambiente, com soluções diluídas em PBS 0,01M, pH 7.4, intercalados por três lavagens com PBS durante 5 minutos.

Os cortes seriados foram lavados rapidamente com glicina (0,1M) para eliminação do excesso de PFA, incubados em Triton X-100 (TX-100 0,4%) por 30 minutos, para aumentar a permeabilidade celular, e com água oxigenada (H_2O_2 1%) durante 60 minutos, para eliminação da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram

lavados com PBS até a eliminação da água oxigenada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 60 minutos em albumina bovina (BSA 3%).

4.2.3 Incubação com os anticorpos

Uma série em cada quatro, foi incubada a 4°C por 40h com anticorpo policlonal produzido em coelho (1:2000; K-25, Santa Cruz Biotechnology, CA), em solução contendo TX-100 0,3% e BSA 1% em PBS 0,01M (PBS+). Depois de lavados, os cortes foram incubados com 2º anticorpo biotilado, um anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000; Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluído 1:600 em PBS+ durante 1:30 h. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (1:100; KIT ABC Elite, Vectastain) por 60 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado o substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) intensificado com cloreto de níquel (0,2 mg/mL DAB, Sigma; 25 mg/mL NiCl₂, Riedel-de haën; 1 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em tampão acetato 0,05M (pH=7.5), por 12 minutos. A reação foi interrompida transferindo-se os cortes para o PBS e nas séries do LC, os cortes foram lavados com H₂O₂ 1% diluída em PBS 0,01M, durante 15 min, e lavados com PBS 0,01M, cinco vezes, por 5 minutos, para posterior incubação com o anticorpo anti-TH, produzido em camundongo (anti-TH 2, Sigma), diluído 1:500.000 em PBS+ por 40 h à 4°C. Depois de lavados, os cortes foram incubados com 2º anticorpo biotilado, uma anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (BA-2001, Vector), diluído 1:600 em PBS+ durante 1 h. Após as lavagens com PBS, os cortes foram incubados com o complexo Avidina-Biotina (1:100; KIT ABC Elite, Vectastain), por 60 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado DAB (0,1 mg/mL e 1 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em tampão Tris-HCl 0,05M (pH=7,6), por 15 minutos e a reação foi interrompida transferindo-se os cortes para o PBS.

4.2.4 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.

4.2.5 Contagem dos neurônios FRA-ir na APO

Utilizando-se microscópio óptico (Zeiss Axioshop 2 plus) associado a sistema para análise de imagens (Axiovision), foi realizada contagem dos neurônios imunorreativos ao *Fos* (FRA) nas secções correspondentes ao ao núcleo pré-óptico anteroventral periventricular (APO/AVPe) do atlas de Paxinos. A figura abaixo (Figura 6) demonstra a identificação e análise das lâminas conforme a distribuição dos neurônios ativados ao longo do AVPe da APO.

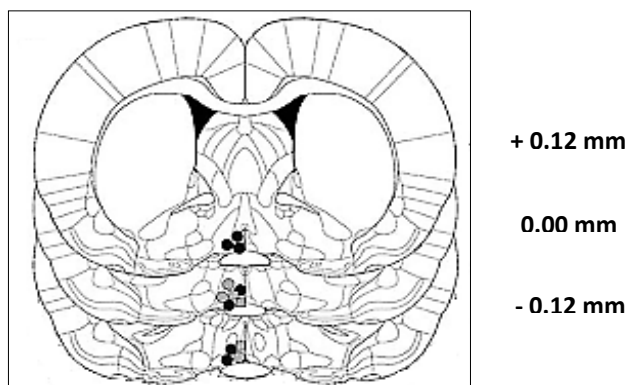


Fig. 6 – Secções coronais da APO indicando o AVPe conforme bregma. *Plate 32* (bregma +0.12), *Plate 33* (bregma 0.00) e *Plate 34* (bregma -0.12). Adaptado de Watson; Paxinos, 2007

As lâminas foram fotografadas (câmera AxioCam HCR) (Figura 16) para contagem bilateral dos neurônios imunorreativos (objetiva de 20x) ao *Fos* (FRA) com o auxílio do programa Axiovision. Em cada *plate*, foi inserida uma caixa no programa para a correta delimitação do AVPe, cujas dimensões variaram em função do tamanho de cada *plate*, tendo como referência de inserção a curvatura caudal do 3º ventrículo, conforme ilustra a figura 7. Para a análise estatística foram considerados somente os neurônios imunorreativos dos *plates* correspondentes ao Bregma 0.00 mm e Bregma -0.12 mm (respectivamente *plates 33* e *34*)

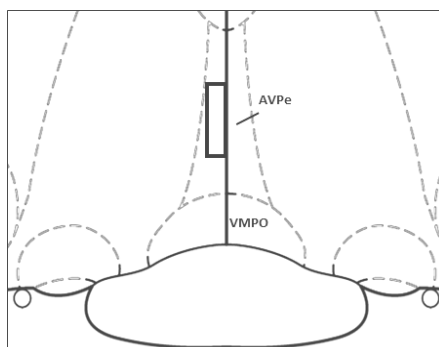


Fig. 7 - Esquema mostrando o procedimento para contagem dos neurônios imunorreativos para *Fos* (FRA) no AVPe. Dimensões do Frame: Bregma +0.12 mm (240x480 μ m), Bregma 0.00 mm (240x716 μ m), Bregma -0.12 mm (240x956 μ m). Objetiva 20x. Adaptado de Watson; Paxinos, 2007.

4.2.6 Contagem dos neurônios FRA/TH-ir no LC

Para a contagem dos neurônios do LC foi realizada a identificação dos cortes conforme a extensão do núcleo iniciada no bregma -9.36 mm ao -10.08 mm (plates 111 ao117). Somente foram contados os neurônios catecolaminérgicos que estiveram duplamente marcados para FRA/TH, sendo a contagem realizada em objetiva de 40 X (Figura 18) a partir da captura das imagens conforme previamente descrito. Foram considerados somente os plates comuns a todos os animais e que estiveram duplamente marcados para ambos os antígenos (Bregma -9.48 mm ao Bregma -10.08 mm) (Figura 8)

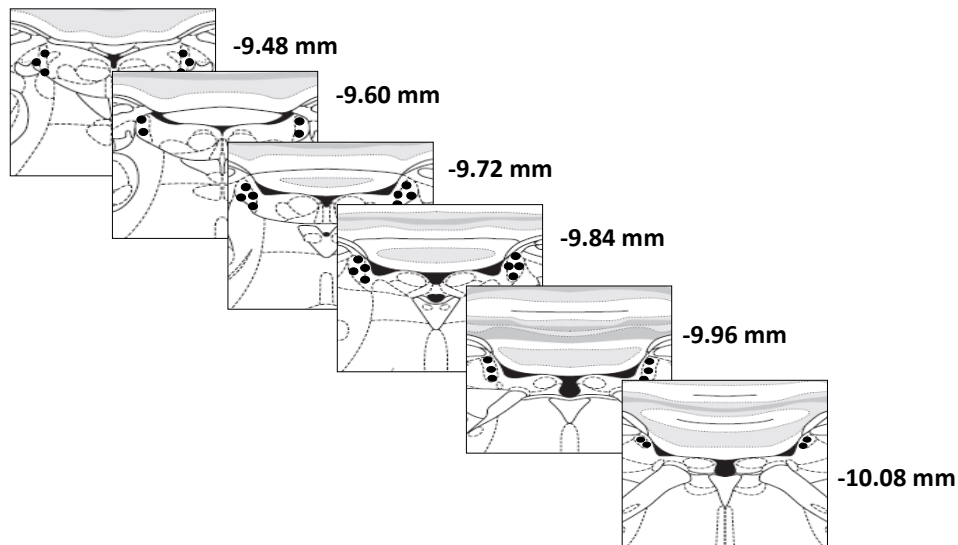


Fig. 8 - Esquema mostrando o procedimento para contagem dos neurônios imunorreativos para FRA/TH no LC. Bregma -9.48 mm ao Bregma -10.08 mm. Objetiva 40 x. Adaptado de Watson; Paxinos, 2007.

As amostras sanguíneas coletadas durante os experimentos de decaptação e perfusão dos animais de ambos os grupos (jovem e senil) foram centrifugadas (3000 rpm; temperatura de 2° C; 15 min). O plasma foi aliquoteado em eppendorfs (500 µL) e estocado em freezer (-20° C) para dosagem posterior dos hormônios hipofisários: FSH, LH e Prolactina (PRL); ovarianos: estradiol (E₂) e progesterona (P₄), por radioimunoensaio (RIE).

As concentrações plasmáticas de LH, FSH e PRL foram determinadas utilizando-se o método de duplo anticorpo RIE utilizando-se kit específico fornecido pelo Instituto Nacional de Diabetes, Doenças Digestivas e Renais (NIDDK, Bethesda, MD, EUA). Os anticorpos utilizados foram anti-rat de LH-S10, S11-FSH e PRL-S9 diluídos com soro de coelho e padrão normal de preparação RP3-LH, FSH, PRL-RP3

ng/ml diluídos em tampão fosfato gel de 0,1% (0,01 M, pH = 7,5). A dose mínima detectável foi de 0,16 ng/mL para a LH, 0,09 ng/mL para a FSH e 0,7 ng/mL para a PRL e o coeficiente de variação para o erro intra-ensaio foi de 4%.

Para as concentrações de estradiol e progesterona foram utilizados kits comerciais. A dosagem de progesterona foi realizada utilizando-se o kit de MP Biomedicals LLC (divisões Diagnostics, Nova Iorque, EUA) e Siemens (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, EUA) para o estradiol. A dose mínima detectável de progesterona e de estradiol foi de 5,0 pg/mL e 0,3 ng/mL, respectivamente. O erro intra-ensaio foi de 4,3% para 7,6% para o estradiol e progesterona. Todas as amostras foram dosadas em duplicata no mesmo ensaio, para evitar erro inter-ensaio.

6 Análise Estatística

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

RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Ciclo estral – Modelo experimental

Os resultados das análises do ciclo estral revelaram que 78% do total de animais jovens analisados exibiram ciclo estral regular, os quais foram utilizados na fase do diestro. A análise do ciclo das ratas com 18 meses evidenciou que 90% dos animais permaneceram em diestro persistente durante período equivalente a três ciclos consecutivos (Figura 9).

A análise do esfregaço vaginal das fêmeas Wistar evidenciou a ocorrência do diestro persistente, com citologia vaginal leucocitária, nos animais de 18 a 20 meses e possibilitou a caracterização de modelo animal para o estudo da senescência reprodutiva. Com o envelhecimento, as ratas tornam-se acíclicas e com “pausa” em seus ciclos reprodutivos, caracterizando a estropausa.

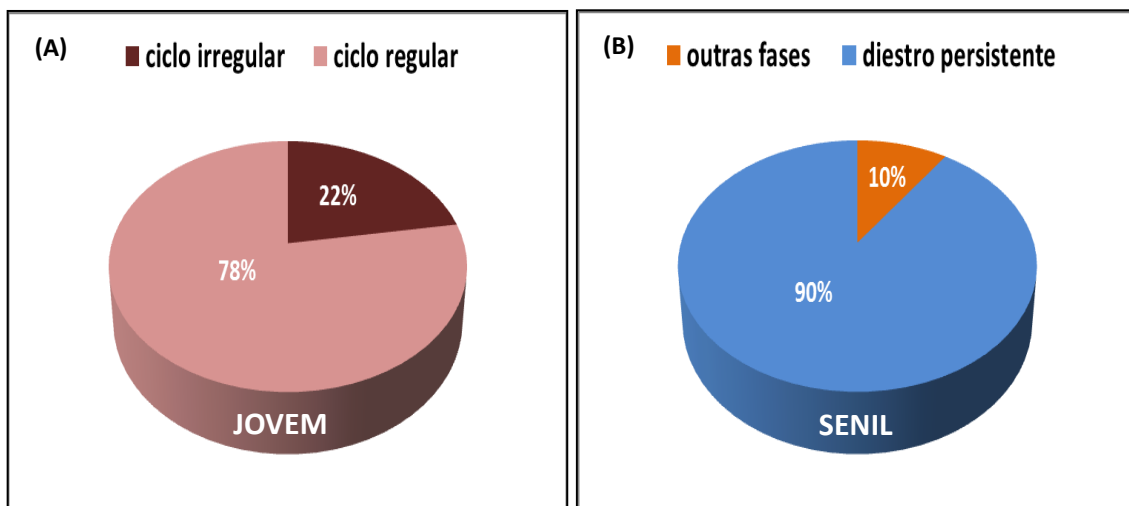


Fig. 9 – Incidência da fase de diestro nos grupos experimentais. (A) Animais jovens (4 meses) e (B) Animais senis (18-20 meses).

7.2. Ensaios Hormonais

A Figura 10 apresenta o padrão das concentrações hipotalâmicas do GnRH de ratas cíclicas (jovens) e acíclicas (senis) nos diferentes horários do diestro. Nos animais jovens foi detectado aumento crescente no conteúdo de GnRH hipotalâmico nos diferentes horários, enquanto que nos animais senis este conteúdo foi menor e constante, independentemente do horário. A comparação entre as idades evidencia que

às 14 e 18 horas há maior conteúdo hipotalâmico de GnRH armazenado nas ratas jovens.

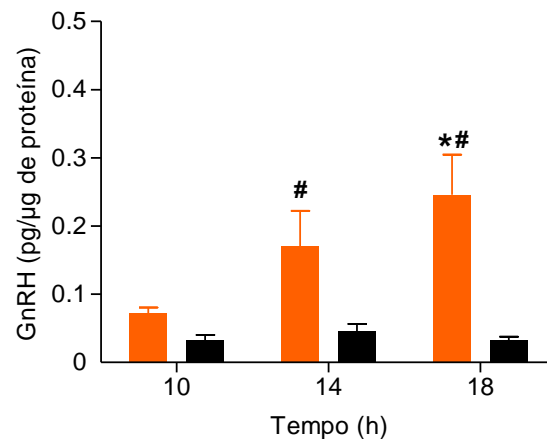


Fig. 10 - Conteúdo de GnRH do HMB de animais jovens (■) e senis (■) (n= 7-8 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls. # indica diferença estatística entre os grupos jovem e senil no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média ± EPM. *P<0,05 vs. 10 e 14 h/jovens

A análise dos resultados de LH evidencia que a concentração plasmática deste hormônio manteve-se constante ao longo dos horários. Nos animais cíclicos do grupo jovem (Figura 11 A) estas concentrações apresentaram-se acima (aproximadamente 0,25 ng/mL) das obtidas para os animais acíclicos do grupo senil (aproximadamente 0,15 ng/mL). A análise dos resultados referentes à concentração plasmática de FSH (Figura 11 B) dos animais experimentais dos diferentes grupos revelou que não há diferença estatística entre os grupos e horários, permanecendo em torno de 3,0 ng/mL em ambos os grupos nos diferentes horários.

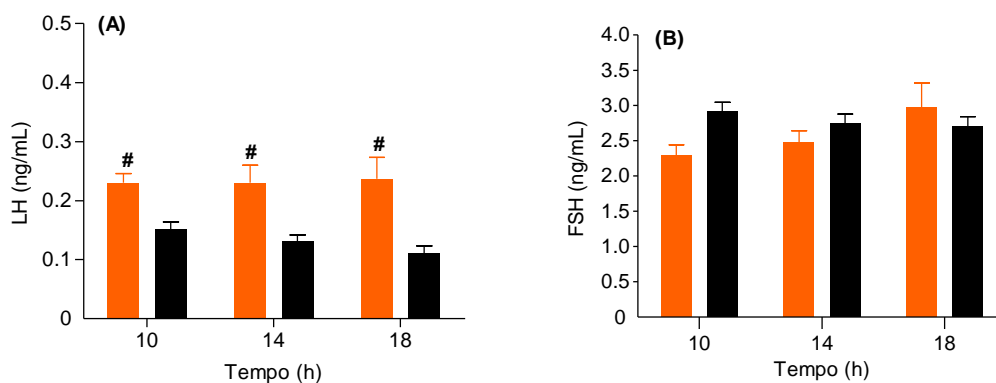


Fig. 11 - Concentração de LH (A) e FSH (B) plasmático de animais jovens (■) e senis (■) (n= 7-8 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls. # indica diferença estatística entre os grupos jovem e senil no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média ± EPM.

O padrão da secreção de PRL dos animais jovens/cíclicos e senis/acíclicos está apresentado na figura 12. A concentração plasmática de PRL nas ratas jovens é significativamente menor que a das ratas senis e não demonstrou alterações nos três

horários analisados. Entretanto, nas ratas senis a concentração plasmática de PRL é maior do que dos animais jovens e apresenta diminuição significativa às 18 horas, quando comparada com animais de mesma idade nos horários das 10 e 14 h.

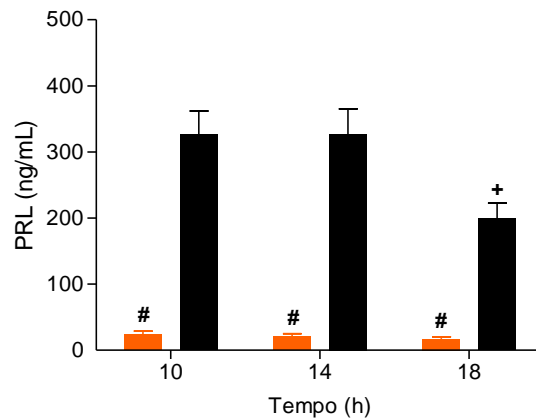


Fig. 12 - Concentração de PRL plasmática de animais jovens (■) e senis (■) (n=7-8 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls. # indica diferença estatística entre os grupos jovem e senil no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média \pm EPM. $^+P<0,05$ vs. 10 e 14 h/senis.

A análise das concentrações plasmáticas dos esteróides ovarianos apresentou relação inversamente proporcional entre si (Figuras 13 A e B). Os valores da concentração de estradiol (Fig. 13 A) no grupo de ratas acíclicas/senis foram crescentes nos diferentes horários enquanto que a concentração de progesterona foi decrescente (Fig. 13 B). Nos animais cíclicos/jovens, as concentrações plasmáticas de estradiol (Fig. 13 A) e de progesterona (Fig.13 B) foram menores e não apresentaram diferença entre os horários. A concentração plasmática de progesterona entre os animais jovens e senis foi significativa nos horários das 10 e 14 h ($P<0,05$).

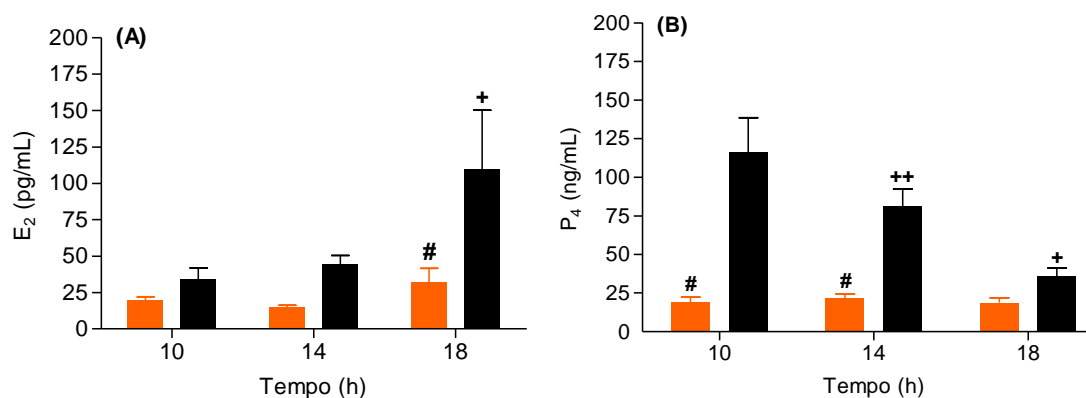
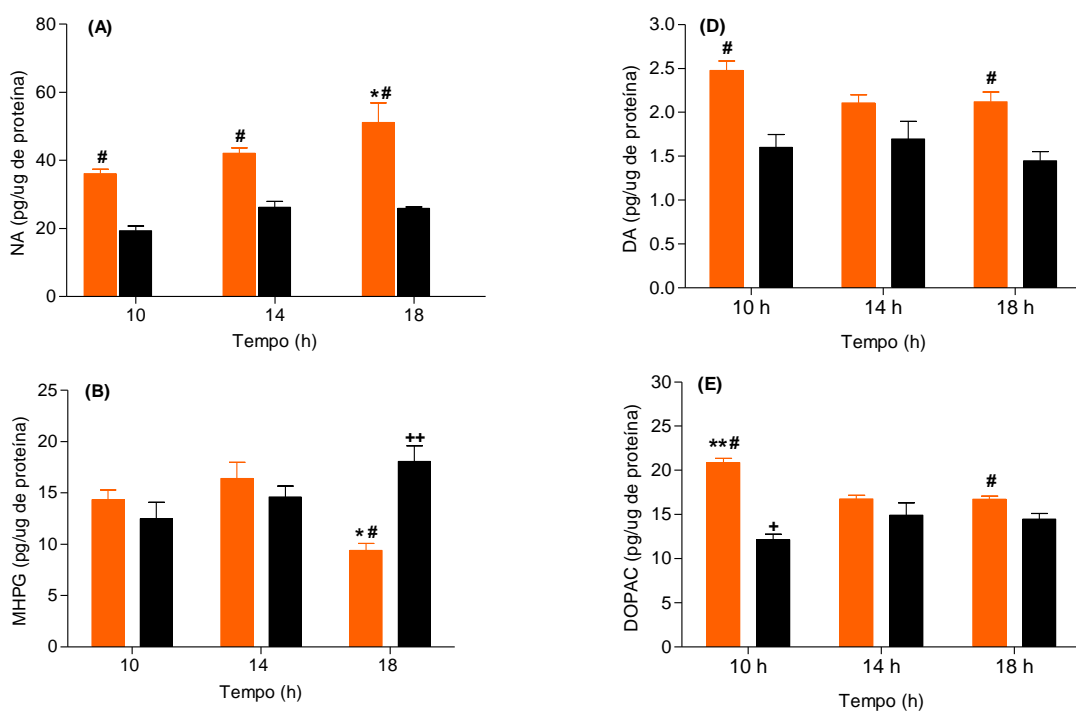


Fig. 13 - Concentração plasmática de estradiol (A) e progesterona (B) de animais jovens (■) e senis (■) (n=7-8 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls). # indica diferença estatística entre os grupos jovem e senil no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média \pm EPM. $^+P<0,05$ vs. 10 e 14 h/senis; $^{++}P<0,05$ vs. 10 h/senis.

7.3 Dosagem de Catecolaminas

O conteúdo armazenado de NA (Figura 14 A) foi crescente ao longo dos horários nos animais do grupo de ratas cíclicas. No horário das 18h a concentração de NA foi maior ($P < 0,05$) quando comparado com os horários de 10 e 14h. No grupo de animais acíclicos, o conteúdo de NA foi menor e constante nos três horários analisados, quando comparados aos respectivos horários do grupo jovem. Os valores para o metabólito MHPG (Figura 14 B) apresentaram diferenças ($P < 0,05$) às 18 horas em ambos os grupos e no mesmo horário entre os grupos cíclicos e acíclicos ($P < 0,001$). A taxa de liberação noradrenérgica dada pela relação MHPG/NA (Figura 14 C) foi maior nos horários das 14 e 18 h nos animais do grupo acíclico/senil comparado com os respectivos horários do grupo cíclico/jovem ($P < 0,05$).

A análise do conteúdo de DA (Figura 14 D) armazenado na APO evidencia maior concentração do neurotransmissor nos animais cíclicos do grupo jovem. Essa diferença é significativa nos horários das 10 e 18 h ($P < 0,05$) quando comparado com ratas acíclicas do grupo senil. Seu respectivo metabólito, DOPAC (Figura 14 E), também foi maior nas ratas cíclicas, sendo as maiores concentrações no horário das 10 e 18 h ($P < 0,05$) quando comparadas com as ratas acíclicas. A taxa de liberação dada pela relação DOPAC/DA (Figura 14 F) foi maior às 18 h no grupo de ratas acíclicas comparado com as ratas cíclicas/jovens.



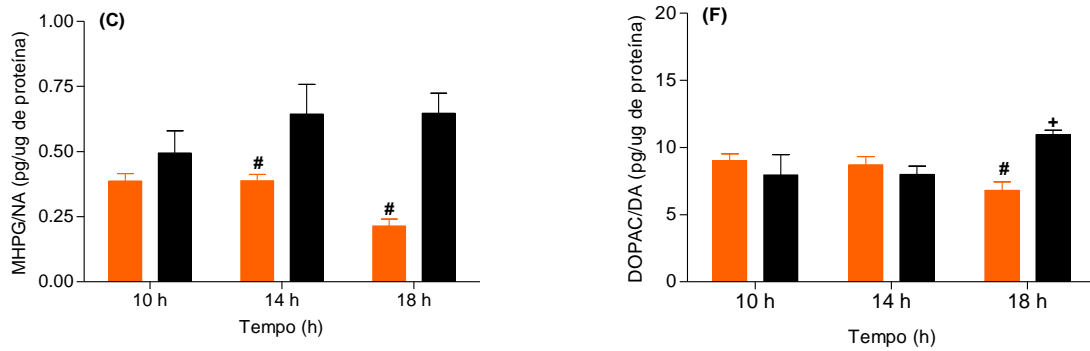


Fig. 14 – Conteúdo de neurotransmissores e respectivos metabólitos na APO de animais jovens (■) e senis (■) (n=7-8 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls). (A) NA, (B) MHPG, (C) taxa de turnover MHPG/NA, (D) DA, (E) DOPAC, (F) taxa de turnover DOPAC/DA. # indica diferença estatística entre os grupos jovens e senis no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média \pm EPM. *P<0,05 vs. 10 e 14 h/jovens; **P<0,05 vs. 14 e 18 h/jovens; +P<0,05 vs. 14 e 18 h/senis; ++P<0,05 vs. 10h/senil.

7.4 Imunohistoquímica da Área Pré-Óptica

A análise dos resultados para os neurônios imunorreativos ao *Fos* (FRA) no núcleo AVPe da APO permite constatar que a atividade neuronal neste núcleo é crescente ao longo dos horários em animais senis em diestro persistente, comparado aos animais jovens em diestro, sendo os horários das 14 h e 18 h (P<0,05) os de maior expressão desta atividade (Figura 15). A Figura 16 apresenta a marcação para *Fos* (FRA) na APO de animais jovens (A) e senis (B) às 14 h do dia do diestro.

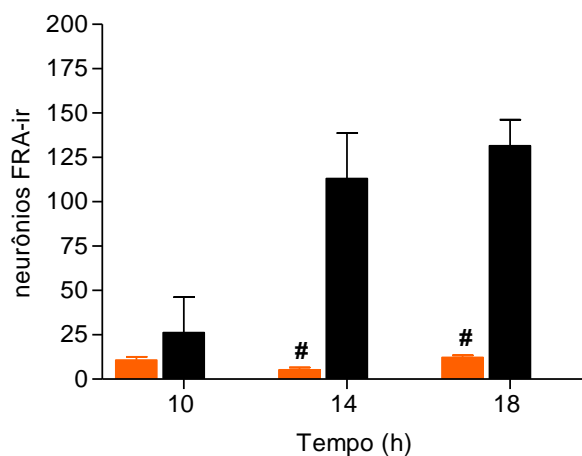


Fig. 15 - Número de neurônios imunorreativos para *Fos* (FRA) no AVPe da APO durante o diestro em animais jovens (■) e senis (■) (n= 4-7 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls. # indica diferença estatística entre os grupos jovens e senis no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média \pm EPM. #P<0,05.

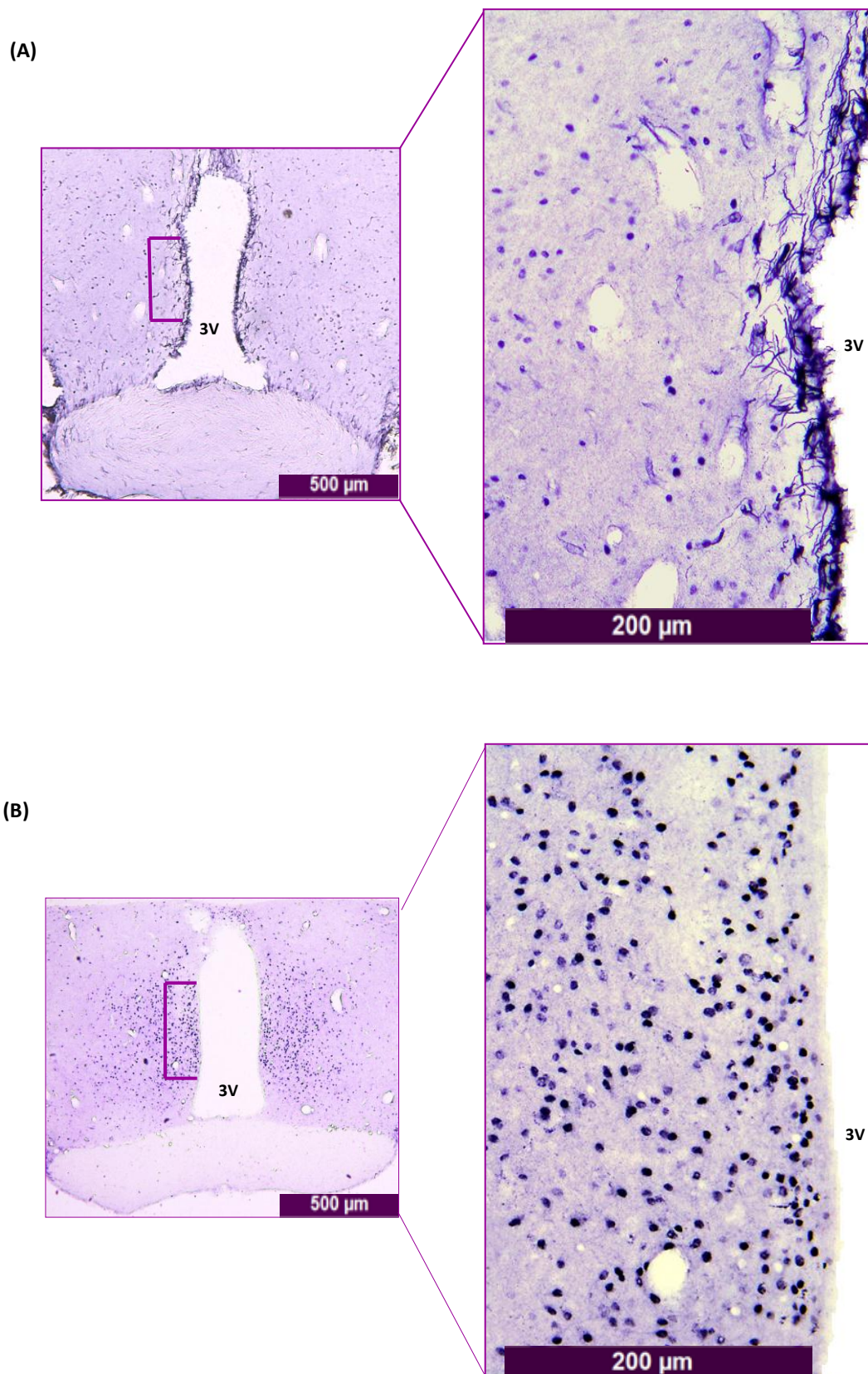


Figura 16 – Representação fotográfica da marcação para *Fos* (FRA) no AVPe no grupo jovem (A) e senil (B) perfundidos às 18h do diestro. 3V, terceiro ventrículo. Barra de escala para AVPe = 500 µm (Objetiva 5x) e 200 µm (Objetiva 20x).

7.5 Imunohistoquímica do Locus Coeruleus

Os resultados (Figura 17) obtidos de um total de sete secções analisadas, que em média somaram 4 neurônios FRA/TH-ir para J/10h , 3 FRA/TH-ir para J/14h e 4 FRA/TH-ir para J/18h, 9 neurônios FRA/TH-ir para S/10h, 6 neurônios FRA/TH-ir para S/10h e 5 neurônios FRA/TH-ir para J/18h, evidenciaram significativo aumento da quantidade de neurônios FRA/TH imunorreativos em ratas senis às 10h e 14h ($P < 0.05$) quando comparados com animais jovens do mesmo horário ($P < 0.05$). O grupo senil das 18h apresentou menor atividade noradrenérgica sem diferença significativa comparada com grupo jovem do mesmo horário. A Figura 18 apresenta a marcação para FRA/TH no LC de animais jovens (A) e senis (B) às 10 e 14 h do dia do diestro.

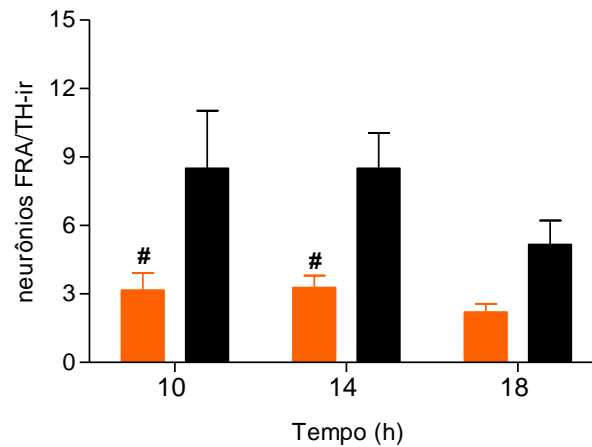


Fig. 17 - Número de neurônios imunorreativos para FRA/TH no LC durante o diestro em animais jovens (■) e senis (■) (n= 4-7 animais/horário), com aplicação do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Newman-Keuls. # indica diferença estatística entre os grupos jovens e senis no mesmo horário. Valores expressos de acordo com a média \pm EPM. # $P < 0,05$.

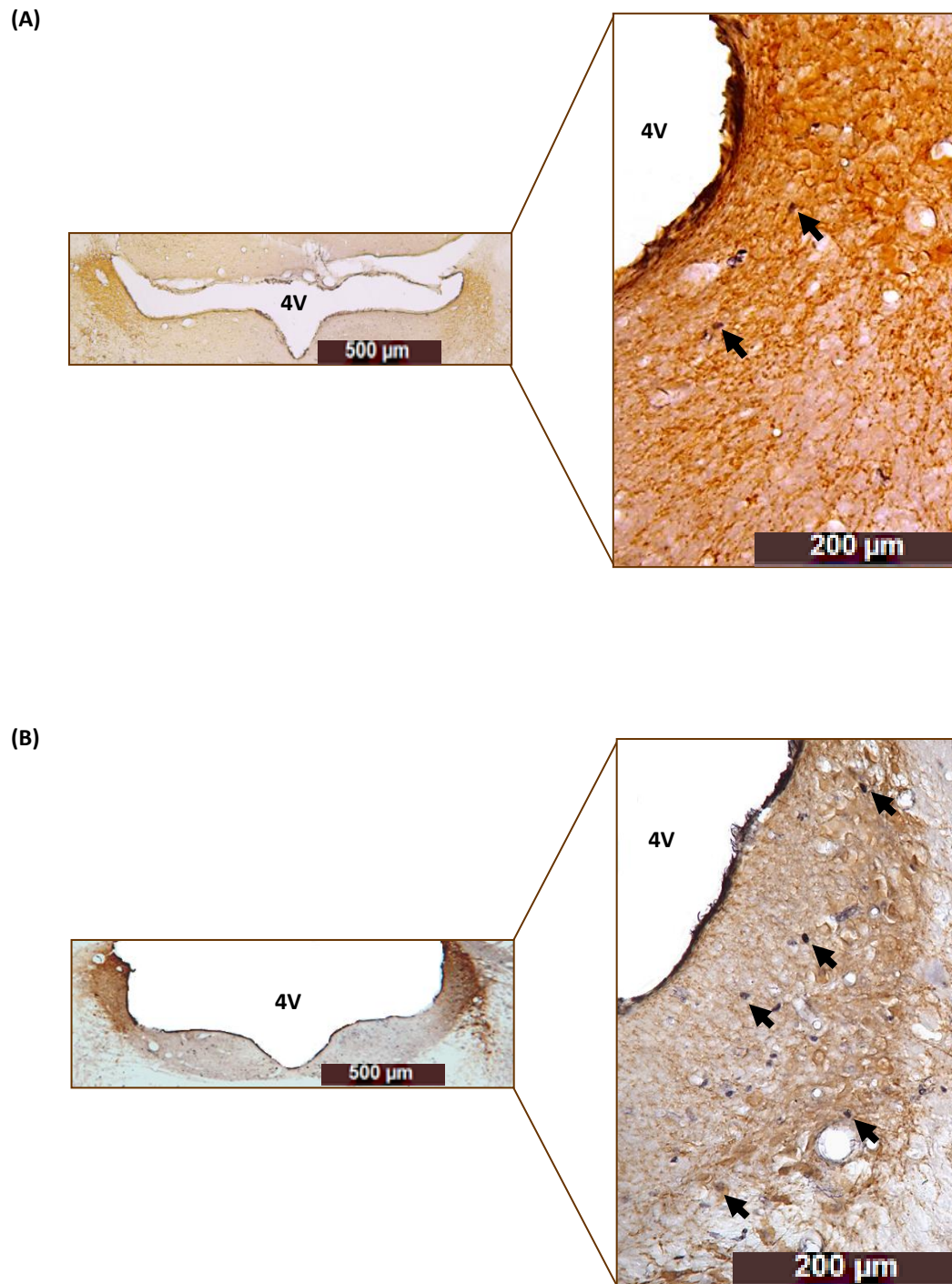


Figura 18 – Representação fotográfica da dupla marcação FRA/TH no LC no grupo jovem (A) e senil (B) perfundidos às 10 h do diestro. A seta indica o neurônio duplamente marcado (a coloração para TH é citoplasmática e para FRA é nuclear). 4V, quarto ventrículo. Barra de escala para LC = 500 μm (Objetiva 5x) e 200 μm (Objetiva 20x).

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam desequilíbrio na taxa de liberação de hormônios do eixo HPG em ratas acíclicas/senis. O conteúdo de GnRH nestes animais permaneceu invariável durante os horários analisados, contribuindo para a determinação da aciclicidade estral e caracterizando o processo de senescência reprodutiva nas fêmeas de roedores.

Na literatura (LU *et al.*, 1979) há relatos de alteração nas fases do ciclo estral em fêmeas de roedores a partir de 10 meses, com aumento na incidência de ciclos irregulares e prevalência da fase de estro já aos 12 meses (Figura 19). Estudos realizados (GARCIA, 2012; COLLI, 2012) em nosso laboratório, com ratas da linhagem Wistar, evidenciaram manutenção da ciclicidade até os 12/13 meses, sendo a ocorrência do início da aciclicidade detectada aos 14 meses e a incidência do diestro persistente a partir dos 17/18 meses.

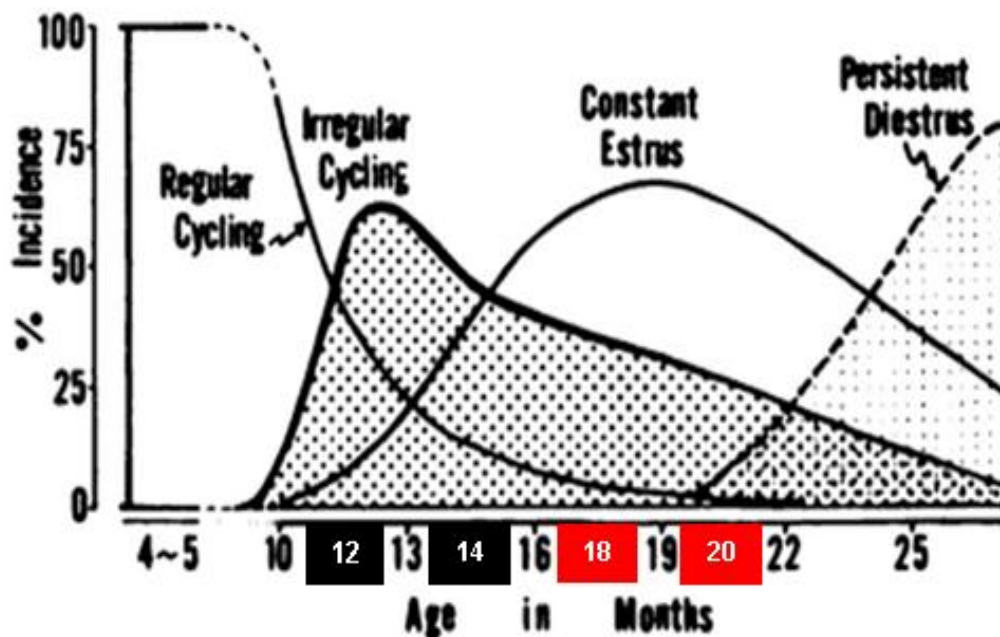


Fig. 19– Incidência cronológica de ciclos estrais regulares e irregulares em ratas. Adaptado de Lu *et al.*, 1979

O conjunto de dados obtidos nesse estudo, baseados em análises plasmáticas e hipotalâmicas dos hormônios envolvidos com a reprodução, bem como de núcleos e neurotransmissores controladores da atividade dos neurônios GnRH, refletem desequilíbrio na taxa de liberação dos hormônios do eixo HPG em ratas acíclicas/senis, correlacionado com a síntese e liberação de NA.

É bem descrito pela literatura que a interação do GnRH com receptores de superfície celular de alta afinidade (GnRH-r) nos gonadotrofos hipofisários, resulta na transdução de sinal para a biossíntese e secreção de LH e FSH (CICCONE *et al.*, 2008). Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a não ocorrência de alteração no conteúdo de GnRH dos animais acíclicos durante os horários analisados, sugerindo possível comprometimento no controle temporal do núcleo supraquiasmático sobre a liberação hormonal, contribuindo para a determinação da aciclicidade estral que caracteriza o processo de senescência reprodutiva em fêmeas de roedores.

O aumento gradual do conteúdo de GnRH do HMB durante o diestro (Figura 9) em ratas jovens, essencial para sinalizar a ocorrência de secreção máxima de LH e subsequente ovulação, não ocorre durante os três horários analisados em ratas acíclicas/senis e evidencia que o horário e a idade influenciam no conteúdo de GnRH neste núcleo. Estes resultados indicam que a menor produção de GnRH em ratas acíclicas compromete o padrão de secreção deste neurohormônio, e, conseqüentemente a secreção de LH, influenciando na ausência do pico pré-ovulatório e contribuindo para a iniciação do processo de senescência reprodutiva. Em ratas jovens, observou-se aumento do conteúdo de GnRH do HMB na tarde de diestro para proestro, o que permite maior estímulo à hipófise pelo neuro-hormônio para a sinalização da ocorrência de secreção máxima de LH.

Análises realizadas, por Rubin e Bridges (1989), em neurônios GnRH de animais senis evidenciaram volume menor do aparelho de Golgi e retículo endoplasmático rugoso comparado com neurônios de ratas jovens em diestro, indicando possível comprometimento da síntese de proteínas. Além disso, o RNAm/GnRH aumentou significativamente com a idade e os níveis de transcrição primária de GnRH em ratas senis diminuiu em comparação com ratas jovens. Gore e colaboradores (2000) sugerem que as alterações em nível de RNAm/GnRH ocorrem independentemente das alterações na transcrição do gene, indicando o envolvimento de mecanismos de pós-transcrição.

A teoria clássica de controle do eixo HPG atribui aos ritmos circadianos do SCN o controle sobre a liberação pulsátil de GnRH e gonadotrofinas. Estudos recentes de Sellix e Menaker (2010) (Figura 20) sugerem a existência de osciladores circadianos em cada componente do eixo, sendo necessária a sincronização entre os marcadores temporais do SCN, neurônios GnRH, células hipofisárias e células ovarianas para o controle dos eventos fisiológicos desencadeados pelo eixo HPG. Além disso, está

evidenciado a expressão de genes do relógio nas células da granulosa, da teca e lúteas (FAHRENKRUG *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2007a; 2007b; KARMAN; TISCHKAU, 2006) bem como a resposta circadiana do ovário ao LH independente do tempo endógeno de liberação da gonadotrofina. Essa resposta indica que o ritmo de sensibilidade ao LH é produzido pelo relógio circadiano local, exercendo controle sobre o tempo de ovulação e secreção de progesterona (SELLIX; MENAKER, 2011).

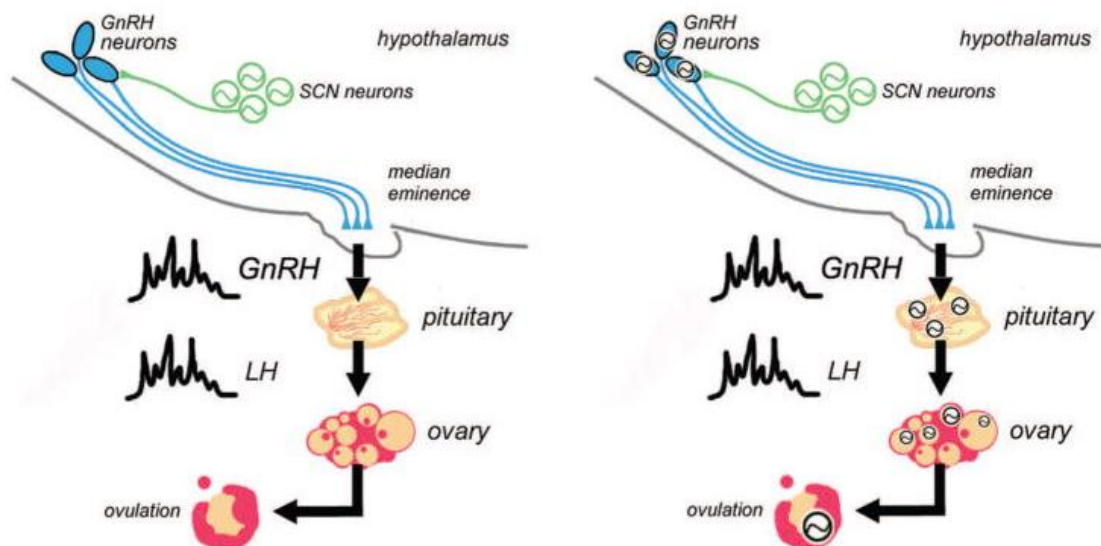


Fig. 20 – Modelo clássico dos ritmos circadianos do eixo HPG de fêmeas (esq.), modelo de controle multi-oscilador dos ritmos circadianos do eixo HPG de fêmeas (dir.). Extraído de Sellix; Menaker, 2010

A redução do teor de GnRH no HMB de ratas acíclicas (Figura 10) verificada nesse estudo, possivelmente se deve à alterações na maquinaria de secreção e à responsividade destas células ao estrogênio. É de conhecimento que os esteroides sexuais femininos, 17β -estradiol e progesterona, podem modular a transcrição do GnRH, atuando no hipotálamo para alterar os padrões de pulsos de GnRH ou através de ações diretas na hipófise para influenciar a expressão basal ou estimulada de GnRH (KARSCH, 1987; KAWAKAMI; WINTERS, 1999; SHUPNIK, *et al.*, 1989). Os esteróides atuam alterando diretamente a transcrição do gene promotor ou não-genomicamente, alterando o padrão de sinalização citoplasmática (HALL, *et al.*, 2001). Em fêmeas de roedores, os níveis de RNAm e a transcrição de subunidades das gonadotrofinas ($LH\beta$, $FSH\beta$) variam durante o ciclo reprodutivo (KOWASE *et al.*, 2007).

Há relatos de que roedores apresentam atenuação da retroalimentação positiva de estrogênio em razão secundária ao envelhecimento hipotalâmico, como resultado do

desequilíbrio de neurônios e neurotransmissores excitadores (NA e glutamato) e inibidores (GABA e opióides) (BRANN; MAHESH, 2005; DOWNS; WISE, 2009; ZUO *et al.*, 1996) além da redução na atividade diurna do núcleo supraquiasmático e rede de aferências reguladoras dos neurônios GnRH (BLOCK, 1952; KRAJNAK *et al.*, 1998) e dos neurônios kisspeptinérgicos (LEDERMAN, 2010). Provavelmente, a reduzida resposta à retroalimentação positiva e negativa na secreção de gonadotrofinas (LU *et al.*, 1977, MARCHETTI; CIONI, 1988) está associada à diminuição no *turnover* hipotalâmico de catecolaminas e aumento no *turnover* de serotonina (SMITH, 2005) bem como na capacidade do eixo HPG em responder aos estímulos durante a transição para envelhecimento (WELT *et al.*, 1999). Assim, as diferenças na liberação de LH e FSH podem ocorrer devido as alterações na capacidade de resposta da hipófise ao GnRH e/ou alterações no metabolismo de esteróides, que culminam em alterações de retroalimentação positiva e negativa pelos esteróides. Neste estudo, foi observado que o LH obedece ao padrão de conteúdo de GnRH, que em animais senis é menor e constante (Figura 10), indicando possível perda do sinal gerador de pulsos.

Vários estudos mostram que o aumento na concentração de FSH na fase folicular está associado com a depleção dos folículos do ovário e subsequente diminuição na concentração de inibina B e hormônio antimülleriano (BLOCK, 1952; GOUGEO *et al.*, 1994; STEGER, 1980; WISE, 2002) secretado pelos folículos antrais ovarianos (GROOME, 1996), em resposta compensatória à "falha" na retroalimentação e hiperestimulação (QUADRI, 1973) dos esteróides ovarianos. Estudos em mulheres evidenciam que as concentrações elevadas de FSH não indicam diagnóstico de perimenopausa (BURGER, 1994). Neste estudo foi verificado que em fêmeas de roedores também não ocorrem alterações significativas nas concentrações de FSH entre os animais cíclicos do grupo jovem e acíclicos do grupo senil (Figura 11 B).

As alterações na secreção plasmática de PRL detectada nos organismos senis (Figura 12) estão, provavelmente, relacionadas às alterações hipotalâmicas em núcleos dopaminérgicos e no fator inibidor da secreção de prolactina (PIF), a dopamina. Estudos realizados nos anos 70 evidenciaram que ratas senis apresentam concentrações deficientes de catecolaminas, com menor concentração de noradrenalina e dopamina quando comparado com ratas jovens (CLEMENS, 1969; CLEMENS; MEITES, 1971; QUESADA; ETGEN, 2001) e que a administração de E₂ em ratas anestras desencadeia aumento na secreção de PRL, possivelmente devido à ação estimuladora direta do

esteróide na hipófise (MEITES, 1976), ou pelo aumento da atividade serotoninérgica no HMB e APOM mediada pelo E₂ (SZAWKA *et al.*, 2007b)

Os resultados deste estudo evidenciam menor síntese catecolaminérgica em animais senis (Figura 14) e indicam clara redução na razão entre síntese e liberação de dopamina nestes animais (Figura 14 F), bem como seu reflexo nas flutuações plasmáticas de PRL observadas durante o diestro persistente. Foi verificado aumento na expressão gênica do receptor de PRL nas regiões de APO e ARC de ratas senis e maior secreção do hormônio nestes animais (CHIU; WISE, 1996). Estas evidências sugerem que alteração no receptor de PRL pode resultar em ações neuroendócrinas no envelhecimento e na habilidade da PRL de atuar em várias regiões cerebrais. A concentração plasmática maior de PRL nos animais senis possivelmente ocorre devido à ação direta dos esteróides gonadais sobre a hipófise associado a menor atividade de fatores inibidores de PRL, como previamente sugerido (CLEMENS, 1969; CLEMENS; MEITES, 1971; QUESADA; ETGEN, 2001).

A influência da PRL no eixo neuroendócrino da reprodução deve ser considerada, pois alguns neurônios GnRH apresentam receptores para PRL (PRL-r) e em humanos a hiperprolactinemia está associada com redução na frequência e amplitude dos pulsos de LH (MATSUZAKI *et al.*, 1994) sendo esta redução revertida com o retorno para a concentração normal de PRL (MOULT *et al.*, 1982). Estudo realizado por Kokay e colaboradores (2011) evidenciou RNAm de PRL-r nos neurônios GABAérgicos e KISSpeptinérgicos do ARC e AVPe, núcleos envolvidos com o controle da fertilidade. Esses resultados são consistentes com a hipótese de ação predominantemente indireta da PRL sobre os neurônios GnRH. Portanto, deve ser considerada a hipótese de que o menor conteúdo do decapeptídeo encontrado nos animais senis, neste estudo, pode resultar também do efeito inibidor das altas concentrações de PRL.

Neste estudo foi verificado que a fase de diestro persistente é marcada por concentrações mais elevadas de estradiol e progesterona, em comparação com os animais cíclicos em diestro (Figuras 13 A e B) e evidencia a predominância do mecanismo de retroalimentação negativa do estradiol sobre os neurônios GnRH. Há relatos na literatura de que em mulheres, a média da concentração de estradiol na perimenopausa foi maior do que nas mulheres mais jovens/controles (BALLINGE *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1988). Em animais senis, a persistência desta fase leva à concentrações significativamente mais elevadas de esteróides, indicando que durante o

envelhecimento a capacidade de biossíntese destes hormônios é mantida. As alterações nos esteróides relacionadas com a idade têm sugerido que a hipersecreção de estrogênio ovariano e elevações prolongadas durante o ciclo provavelmente contribuem para reduzir a capacidade de resposta neuroendócrina ao efeito de retroalimentação positiva do estradiol sobre a secreção de LH.

A análise da atividade de neurônios FRA na APO (Figura 15 e 16) mostrou aumento na tarde de diestro de ratas acíclicas, no entanto a concentração de NA (Figura 14 A) encontrada foi menor nestes animais. Níveis de MHPG (Figura 14 B) na APO de animais cíclicos e com aciclicidade mostraram alteração às 18 h e a relação MHPG/NA (Figura 14 C) sugere maior liberação de NA dos neurônios da APO de animais acíclicos na tarde do diestro persistente. Estes resultados refletem atividade neuronal elevada como mecanismo compensatório à possível redução na biossíntese de NA em animais acíclicos e possível diminuição da capacidade de armazenagem do neurotransmissor. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os neurônios noradrenérgicos (Figura 17 e 18) de animais com ciclicidade são mais eficazes na síntese e armazenagem do neurotransmissor, que estará disponível para liberação nas fases seguintes do ciclo estral com padrão específico de síntese e liberação de NA, caracterizada por progressivo e necessário aumento para a ocorrência da secreção máxima de LH.

Os resultados aqui obtidos sugerem que durante o envelhecimento, neurônios noradrenérgicos da APO e do LC apresentam alta atividade, possivelmente, para compensar a menor capacidade de síntese e armazenamento do neurotransmissor. Além disso, os neurônios GnRH são alvo de outros fatores, excitadores e inibidores, sendo os fatores inibidores possivelmente superexpressos durante o envelhecimento, resultando em aciclicidade estral.

Sendo assim, as complexas alterações que ocorrem no eixo HPG durante o envelhecimento exigem intensas investigações.

CONCLUSÃO

9 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a alteração da atividade neuronal de núcleos envolvidos com o processo reprodutivo, tais como o AVPe e o LC, durante o envelhecimento, ocorrem primariamente às alterações periféricas ovarianas, possivelmente devido à mudanças no microambiente celular e sua maquinaria genética.

A maior atividade dos neurônios noradrenérgicos, durante o diestro persistente, parece ser resposta compensatória em razão do baixo conteúdo de NA na APO, que interfere também no controle de secreção pulsátil do GnRH.

Possivelmente a temporização circadiana em todo o eixo HPG encontra-se alterada no envelhecimento reprodutivo. Tais alterações refletem em descompasso para síntese e liberação de gonadotrofinas com conseqüente ausência do pico pré-ovulatório caracterizando a aciclicidade reprodutiva.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADVIS, J.P.; KRAUSE, J.E.; MCKELVY, J.F. Luteinizing hormone-releasing hormone peptidase activities in discrete hypothalamic regions and anterior pituitary of the rat: apparent regulation during the prepubertal period and first estrous cycle at puberty. **Endocrinology**, v.110, n.4, p.1238-1245, Apr. 1982.

ANSELMO-FRANCI, J.A.; ROCHA-BARROS, V.M.; FRANCI, C.R.; MCCANN, S.M. Locus ceruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats. **Brain Res**, v.833, n.1, p.86-92, Jun. 1999.

BALLINGER, C.B.; BROWNING, N.C.; SMITH, A.H.W. Hormone profiles and psychological symptoms in peri-menopausal women. **Maturitas**, v.9, n.3, p.235-251, Nov. 1987.

BALSALOBRE, A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. **Cell Tissue Res.**, v.309, n.1, p.193-199, Jul.2002.

BLOCK, E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. **Acta Anat.**, v.14, n.1-2, p.108-123, 1952.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, May. 1976.

BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr. Rev.**, v.19, n.3, p.225-268, Jun. 1998.

BRANN, D.W.; MAHESH, V.B. The aging reproductive neuroendocrine axis. **Steroids.**, v.70, n.4, p. 273-283, Apr. 2005.

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. 2007.

BURGER, H.G. Diagnostic role of follicle-stimulating hormone (FSH) measurements during the menopausal transition--an analysis of FSH, oestradiol and inhibin. **Eur. J. Endocrinol.**, v.130, n.1, p.38-42, Jan. 1994.

CICCONE, N.A.; LACZA, C.T.; HOU, M.Y.; GREGORY, S.J.; KAM, K.Y.; XU, S.; KAISER., U.B. A composite element that binds basic helix loop helix and basic leucine zipper transcription factors is important for gonadotropin-releasing hormone regulation of the follicle-stimulating hormone β gene. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, n.8, p.1908–1923, Aug. 2008.

CHAKRABORTY, T.R.; GORE, A.C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors and neuroendocrine function. **Exp. Biol. Med.**, v.229, n.10, p.977-987, Nov. 2004.

CHIU, S.; WISE, P.M. Prolactin receptor gene expression in specific hypothalamic nuclei increases with age. **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.**, v.51, n.3, p.B220-B224., May. 1996.

CLARKE, I.J. The preovulatory LH surge A case of neuroendocrine switch. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.6, n.7, p.241-247, Sep. 1995.

CLARKE, I.J. Variable patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion during the estrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes. **Endocrinology.**, v.133, n.4, p.1624-1632, Oct. 1993.

CLEMENS, J.A.; BENNET, D.R. Do aging changes in the preoptic area contribute to loss of cyclic endocrine function? **J. Gerontol.**, v.32, n.1, p.19-24, Jan. 1977.

CLEMENS, J.A.; AMENOMORI, Y.; JENKINS, T.; MEITES, J. Effects of hypothalamic stimulation, hormones, and drugs on ovarian function in old female rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.132, n.2, p. 561-563, Nov. 1969.

CLEMENS, J.A.; MEITES, J. Neuroendocrine status of old constant estrous rats. **Neuroendocrinology.**, v. 7, n.4, p. 249-256, 1971.

COLLI, V.C. **Análise da ação da ocitocina sobre a remodelação óssea alveolar em ratas wistar de 12, 18 e 24 meses.** 2012. 70 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, 2012.

CHRISTIAN, C.A.; MOENTER, S.M. Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. **Endocrinology.**, v.149, n.6, p.3130-3136, Jun. 2008

DENG, M. Mechanisms of reproductive aging in the females. **Science China Life Sci.**, v.55, n.8, p. 653–658, Aug. 2012.

DE PAUL, A.L.; PONS, P.; AOKI, A., TORRES, A. I. Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of function subtypes. **Acta Histochem.**, v. 99, n. 3, p. 277-289, Aug. 1997.

DOWNS, J.L.; WISE, P.M. The role of the brain in female reproductive aging. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.299, n.1,p.32-38, Feb. 2009.

EDERY, I. Circadian rhythms in a nutshell. **Physiol. Genomics.**, v.3, n.2, p.59-74, Aug. 2000.

EICHHAMMER, P.; ZELLER, R.; ROHKAMM, R. Fixation of neural tissue for electron microscopy with an electronically controlled perfusion pump. **Tissue Cell.**, v. 19, n.1, p.153-157, 1987.

FAHRENKRUG, J.; GEORG, B.; HANNIBAL, J.; HINDERSSON, P.; GRAS, S. Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary. **Endocrinology.**, v.147, n.8, p.3769-3776, Aug. 2006.

FREEMAN, M.E.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiol. Rev.**, v.80, n.4, p.1523-1631, Oct. 2000.

GARCIA, C.T.S. **Influência do treinamento resistido e do raloxifeno no metabolismo ósseo de ratas wistar**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, 2012.

GIESKE, M.C.; KIM, H.J.; LEGAN, S.J.; KOO, Y.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; KO, C. Pituitary gonadotroph estrogen receptor-alpha is necessary for fertility in females. **Endocrinology.**, v.149, n.1, p.20-27, Jan. 2008.

GORE, A.C.; OUNG, T.; YUNG, S.; FLAGG, R.A.; WOLLER, M.J. Neuroendocrine mechanisms for reproductive senescence in the female rat: gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrine.**, v.13, n.3, p. 315-323, Dec. 2000.

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.889–896, Mar. 1995.

GORE, A.C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: gene expression and neuroanatomical studies. **Prog. Brain Res.**, v.141, p.193-208, 2002.

GORE, A.C. Gonadotropin-releasing hormone neurons, NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v.37, n.1-3, p.235-248. Nov. 2001.

GOUDREAU, J.L.; FALLS, W.M.; LOOKINGLAND, K.J.; MOORE, K.E. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. **Neuroendocrinology.**, v.62, n.2, p.147-154, Aug. 1995.

GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J.C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. **Biol. Reprod.**, v.50, n.3, p. 653–663, Mar.1994.

GROOME, N.P.; ILLINGWORTH, P.J.; O'BRIEN, M.; PAI, R.; RODGER, F.E.; MATHER, J.P.; MCNEILLY, A.S. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.81, n.4, p.1401–1405, Apr. 1996.

GRZANNA, R.; MOLIVER, M.E. The Locus coeruleus in the rat: immunohistochemical delineation. **Neuroscience.**, v.5, n.1, p.21-40, 1980.

GIGUERE, V.; MEUNIER, H.; VEILLEUX, R.; LABRIE, F. Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interactions with dopamine,

thyrotropin-releasing hormone, and isobutylmethylxanthine. **Endocrinology**, v.111, n.3, p. 857-862, Sep. 1982.

HALL, J.E.; LAVOIE, H.E.; MARSH, E.E.; MARTIN, K.A. Decrease in gonadotropin-releasing hormone (gnrh) pulse frequency with aging in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, n.5, p.1794-800, May. 2000.

HALL, J.M.; COUSE, J.F.; KORACH, K.S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.40, p.36869-36872, Oct. 2001.

HAN, S.K.; HERBISON, A.E. Norepinephrine suppresses gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in the adult mouse. **Endocrinology**, v.149, n.3, p.1129 – 1135, Mar. 2008.

HE, P.J.; HIRATA, M.; YAMAUCHI, N.; HASHIMOTO, S.; HATTORI, M.A. 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.413-420, 2007a.

HE, P.J.; HIRATA, M.; YAMAUCHI, N.; HASHIMOTO, S.; HATTORI, M.A. Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v.302, n.1-2, p.111-118, 2007b.

HELENA, C.V.; SZAWKA, R.E.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinising hormone secretion. **J. Neuroendocrinol.**, v.21, n.10, p.805-812, Oct. 2009.

HELENA, C.; GUSTAFSSON, J.A.; KORACH, K.; PFAFF, D.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; OGAWA, S. Effects of estrogen receptor alpha and beta gene deletion on estrogenic induction of progesterone receptors in the locus coeruleus in female mice. **Endocrine**, v.36, n.1, p.169-177, Aug. 2009.

HERBISON, A.E. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. **Rev. Reprod.**, v.2, n.1, p.1-6, Jan. 1997.

HOLZBAUER, M.; RACKE, K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. **Med. Biol.**, v.63, n.3, p.97-116, 1985.

HOSNY, S.; JENNES, L. Identification of alpha1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurons of the female rat. **J. Neuroendocrinol.**, v.10, n.9, p.687-692, Sep. 1998.

HUANG, H.H.; MEITES, J. Reproductive capacity of aging female rats. **Neuroendocrinology.**, v.17, n.4, p.289-295, 1975.

HWANG,C.; PU, H.F.; HWANG, C.Y.; LIU, J.Y.; YAO, H.C.; TUNG, Y.F.; WANG, P.S. Age-related differences in the release of luteinizing hormone and gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized rats. **Neuroendocrinology.**, v.52, n.2, p.127-132, Aug. 1990.

KAISER, U.B. Hyperprolactinemia and infertility: new insights. **J. Clin. Invest.**, v.122, n.10, p.3467-3468, Oct. 2012.

KARMAN, B.N.; TISCHKAU, S.A. Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.75, n.4, p.624-632, Oct. 2006.

KARSCH, F.J. Central actions of ovarian steroid in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. **Annu. Rev. Physiol.**, n.49, p.365-82, 1987.

KAWAKAMI, S.; WINTERS, S.J. Regulation of luteinizing hormone secretion and subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadal steroids in perfused pituitary cells from male monkeys and rats. **Endocrinology**, v.140, n.8, p.3587-3593, Aug. 1999.

KAWANO, H.; DAIKOKU, S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. **J. Comp. Neurol.**, v.265, n.2, p.242-253, Nov. 1987.

KIINO, D.R., DANNIES, P.S. Insulin and 17-beta-estradiol increase the intracellular prolactin content of GH4C1 cells. **Endocrinology**, v.109, n.4, p.1264-1269, Oct. 1981.

KOKAY, I.C.; PETERSEN, S.L.; GRATTAN, D.R. Identification of prolactin-sensitive GABA and Kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. **Endocrinology**, v.152, n.2, p. 526 –535, Feb. 2011.

KOWASE, T.; WALSH, H.E.; DARLING, D.S.; SHUPNIK, M.A. Estrogen Enhances Gonadotropin-Releasing Hormone-Stimulated Transcription of the Luteinizing

Hormone Subunit Promoters via Altered Expression of Stimulatory and Suppressive Transcription Factors. **Endocrinology**, v.148, n.12, p.6083–6091, Dec. 2007.

KRAJNAK, K.; KASHON, M.L.; ROSEWELL, K.L.; WISE, P.M. 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.4767–4774, Jun. 1998.

LAPOLT, P.S.; LU, J.K. Effects of aging on luteinizing hormone secretion, ovulation and ovarian tissue-type plasminogen activator expression. **Exp. Biol. Med.**, v.226, n.2, p.127-132, Feb. 2001.

LE, W.W.; WISE, P.M.; MURPHY, A.Z.; COOLEN, L.M.; HOFFMAN, G.E. Parallel declines in Fos activation of the medial anteroventral periventricular nucleus and LHRH neurons in middle-aged rats. **Endocrinology**, v.142, n.11, p.4976-4982, Nov. 2001.

LEDERMAN, M.A.; LEBESGUE, D.; GONZALEZ, V.V.; SHU, J.; MERHI, Z.O.; ETGEN, A.M.; NEAL-PERRY, G. Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. **Neuropharmacology**, v.58, n.1, p.314–320, Jan. 2010.

LEE, S.J.; LENTON, E.A.; SEXTON, L.; COOKE, I.D. The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. **Hum. Reprod.**, v.3, n.7, p.851-855, Oct. 1998.

LeFEVRE, J.; McCLINTOCK, M.K. Reproductive senescence in female rats: A longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. **Biol. Reprod.**, v.38, n.4, p.780-789, May. 1988.

LI, Y.R.; REN, C.R.; ZHANG Q.; LI, J.C.; CHIAN, R.C. Expression of G protein estrogen receptor (GPER) on membrane of mouse oocytes during maturation. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.30, n.2, p.227–232, Feb. 2013.

- LIVINGSTONE, J.D.; LERANT, A., FREEMAN, M.E. Ovarian steroids modulate responsiveness to dopamine and expression of G-proteins in lactotropes. **Neuroendocrinology**, v. 68, n.3, p. 172-179, Sep. 1998
- LONG, J.A.; EVANS, H.M. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley: Univ. of California Press; 1922.
- LU, K.H.; HUANG, H.H.; CHEN, H.T.; KURCZ, M.; MIODUSZEWSKI, R.; MEITES, J. Positive feedback by estrogen and progesterone on LH release in old and young rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.154, n.1, p.82-85, Jan. 1977.
- LU, K. H.; HOPPER, B. R.; VARGO, T. M.; YEN, S. S. 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.
- MARCHETTI B.; CIONI, M. Opposite changes of pituitary and ovarian receptors for LHRH in ageing rats: further evidence for a direct neural control of ovarian LHRH receptor activity. **Neuroendocrinology.**, v.48, n.3, p.242-251, Sep. 1988.
- MARTINS-AFFÉRI, M.P.; FERREIRA-SILVA, I.A.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. LHRH release depends on Locus Coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. **Brain Res. Bull.**, v.61, n.5, p.521-527, Sep. 2003.
- MATSUZAKI T, AZUMA K, IRAHARA M, YASUI T, AONO T Mechanism of anovulation in hyperprolactinemic amenorrhea determined by pulsatile gonadotropin-releasing hormone injection combined with human chorionic gonadotropin. **Fertil. Steril.**, v.62, n.6, p.1143–1149, 1994, Dec. 1994.
- MEITES, J.; LU, K. H.; WUTTKE, W.; WELSCH, C.W.; NAGASAWA, H.; QUADRI, S.K. Recent studies on functions and control of prolactin secretion in rats. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.28, p.471-526, 1972.
- MILLER, M.M.; BENNETT, H.P.J.; BILLIAR, R.B.; FRANKLIN, K.B.J.; JOSHI, B. Estrogen, the ovary and neurotransmitters: factors associated with aging. **Exp. Gerontol.**, v.33, n.7-8, p.729-757, Nov./Dez. 1998.

MOULT, P.J.; REES, L.H.; BESSER, G.M. Pulsatile gonadotrophin secretion in hyperprolactinaemic amenorrhoea and the response to bromocriptine therapy. **Clin Endocrinol.**, v.16, n.2, p.153-162, Feb. 1982.

NAKAMURA, T.J.; NAKAMURA, W.; YAMAZAKI, S.; KUDO, T.; CUTLER, T.; COLWELL, C.S.; BLOCK, G.D. Age-Related Decline in Circadian Output. **J. Neurosci.**, v.31, n.28, p.10201-10205, Jul. 2011.

OTTEM, E.N.; GODWIN, J.G.; KRISHNAN, S.; PETERSEN, S.L. Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. **J. Neurosci.**, v.24, n.37, p.8097-8105, Sep. 2004.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. **Brain. Res.**, v.59, p.449-450, Sep. 1973.

PAU, K.Y.F.; HESS, D.L.; KOHAMA, S.; BAO, J.; PAU, C.Y.; SPIES, H.G. Oestrogen upregulates noradrenaline release in the mediobasal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, n.9, p. 899-909, Sep. 2000.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** New York: Academic Press, 2007.

PENDERGAST, J.S.; TUESTA, L.M.; BETHEA, J.R. Oestrogen receptor beta contributes to the transient sex difference in tyrosine hydroxylase expression in the mouse locus coeruleus. **J. Neuroendocrinol.**, v.20, n.10, p.1155-1164, Oct. 2008.

PEREIRA, A.; RAWSON, J.; JAKUBOWSKA, A.; CLARKE, I. J. Estradiol-17 β -responsive A1 and A2 noradrenergic cells of the brain stem project to the bed nucleus of the stria terminalis in the ewe brain: a possible route for regulation of gonadotropin releasing hormone cells. **Neuroscience.**, v.165, n.3, p.758-773, Feb. 2010.

PIZZI, M.; RUBESSA, S.; SIMONAZZI, E.; ZANAGNOLO, V.; FALSETTI, L.; MEMO, M.; SPANO, P.F. Requirement of oestrogens for the sensitivity of prolactin cells to vasoactive intestinal peptide in rats and man. **J. Endocrinol.**, v. 132, n.2, p. 311-316, Feb. 1992.

- POLETINI, M.O. As proteínas de relógios e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal de fêmeas de roedores. **Rev. Biol.**, v.9, n.3, p.41-44, Dec. 2012.
- QUADRI, S.K.; KLEDZIK, G.S.; MEITES, J. Reinitiation of estrous cycles in old constant estrous rats by central acting drugs. **Neuroendocrinology**, v.11, n.4, p.248-255, 1973.
- QUESADA, A.; ETGEN, A.M. Insulin-like growth factor-1 regulation of α (1)-adrenergic receptor signaling is estradiol dependent in the preoptic area and hypothalamus of female rats. **Endocrinology**, v.142, n.2, p.599–607, Feb. 2001.
- RADOVICK, S.; LEVINE, J.E.; WOLFE, A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. **Front Endocrinol.**, v.3, p.52, 2012.
- RAYMOND, V.; BEAULIEU, M.; LABRIE, F.; BOISSIER, J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. **Science**, v.200, n.4346, p.1173-1175, Jun. 1978.
- RUBIN, B.S.; BRIDGES, R.S. Alterations in luteinizing hormone-releasing hormone release from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid-primed middle-aged rats as measured by push-pull perfusions. **Neuroendocrinology**, v.49, n.3, p.225-232, Mar. 1989.
- RUBIN, B.S.; LEE, C.E.; KING, J.C. A reduced proportion of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons express Fos protein during the preovulatory or steroid-induced LH surge in middle-aged rats. **Biol. Reprod.**, v.51, n.6, p.1264-1272, Dec. 1994.
- SATINOFF, E.; LI, H.; TCHENG, T.K.; LIU, C.; MCARTHUR, A.J.; MEDANIC, M.; GILLETTE, M.U. 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-R1222, Nov. 1993.
- SELLIX, M.; MENAKER, M. Circadian clocks in mammalian reproductive physiology: effects of the “other” biological clock on fertility. **Discov. Med.**, v.11, n.59, p.273-281, Apr. 2011.

SHAW, N.D.; SROUJI, S.S.; HISTED, S.N.; HALL, J.E. Differential effects of aging on estrogen negative and positive feedback. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.301, n.2, p.E351-E355, Aug. 2011.

SHUPNIK, M.A.; GHARIB, S.D.; CHIN, W.W. Divergent effects of estradiol on gonadotropin gene transcription in pituitary fragments. **Mol. Endocrinol.**, v.3, n.3, p.474-480, Mar. 1989.

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.2312-2319, Aug. 1987.

SMITH, R.G.; BETANCOURT, L.; SUN, Y. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. **Endocr. Rev.**, v.26, n.2:2, p.203-250, Apr. 2005a.

SMITH, J.T.; CUNNINGHAM, M.J.; RISSMAN, E.F.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Regulation of *Kiss1* gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v.146, n.9, p.3686–3692, Sep. 2005b.

SMITH, J.T. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. **Brain Res. Rev.**, v.57, n.2, p.288-298, Mar. 2008.

SOULES, M.R.; SHERMAN, S.; PARROTT, E.; REBAR, R.; SANTORO, N.; UTIAN, W.; WOODS, N. Executive summary: stages of reproductive aging workshop (STRAW). **Menopause**, v.8, n.6, p.402-407, Nov, / Dec. 2001.

STEGER, R.W.; HUANG, H.H.; CHAMBERLAIN, D.S.; MEITES, J. Changes in control of gonadotropin secretion in the transition period between regular cycles and constant estrus in aging female rats. **Biol. Reprod.**, v.22, n.3, p.595-603, Apr. 1980.

SZAWKA, R.E.; POLETINI, M.O.; LEITE, C.M.; BERNUCI, M.P., KALIL, B; MENDONÇA, L.B.; CAROLINO, R.O.; HELENA, C.V.; BERTRAM, R.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. **Endocrinology**, v.154, n.1, p. 363-374, Jan. 2013.

SZAWKA, R.E.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal

relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. **J. Neuroendocrinol.**, v.19, n.5, p.374-382, May. 2007a.

SZAWKA, R.E.; RODOVALHO, G.V.; MONTEIRO, P.M.; CARRER, H.F.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. **J. Neuroendocrinol.**, v.21, n.7, p.629-639, Jul. 2009.

SZAWKA, R.E.; RODOVALHO, G.V.; HELENA, C.V.V.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Prolactin secretory surge during estrus coincides with increased dopamine activity in the hypothalamus and preoptic area and is not altered by ovariectomy on proestrus. **Brain Res. Bull.**, v.73, n.1-3, p.127-134, Jun. 2007b.

TEMEL, S.; LIN, W.; LAKHLANI, S.; JENNES, L. Expression of estrogen receptor-alpha and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v.143, n.10, p.3974-3983, Oct. 2002.

VERMEULEN, A. Environment, human reproduction, menopause and andropause. **Environ. Health Perspect.**, v.101, Suppl 2, p.91-100, Jul. 1993.

WATSON, R.E.; LANGUB, M.C.; ENGLE, M.G.; MALEY, B.E. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. **Brain Res.**, v.689, n.2, p.254-264, Aug. 1995.

WELT, C.K.; MCNICHOLL, D.J.; TAYLOR, A.E.; HALL, J.E. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.84, n.1, p.105-111, Jan. 1999.

WESTWOOD, F.R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicol. Pathol.**, v.36, n.3, p.375-384, Apr. 2008.

WISE, P.M.; SMITH, M.J.; DUBAL, D.B.; WILSON, M.E.; KRAJNAK, K.M.; ROSEWELL, K.L. Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. **Endocr. Rev.**, v.20, n.3, p.243-248, Jun. 1999.

WEST, B.; DANNIES, P.S. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin in primary cultures of rat pituitary cells. **Endocrinology**, v. 106, n.4, p. 1108-1113, Apr. 1980.

WISE, P.M.; SMITH, M.J.; DUBAL, D.B.; WILSON, M.E.; RAU, S.W.; CASHION, A.B.; BÖTTNER, M.; ROSEWELL, K.L. Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive aging. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.57, p.235–256, 2002.

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.348–354, Mar. 1982.

WISE, P.M. Neuroendocrine modulation of the "menopause": insights into the aging brain. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, V.277, p. E965-E970, 1999.

WRIGHT, D.E.; JENNES, L. Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-containing areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. **Brain Res.**, v.621, n.2, p.272–278, Sep. 1993.

WUTTKE, W.; MEITES, J. Effects of electrochemical stimulation of medial preoptic area on prolactin and luteinizing hormone release in old female rats. **Pflugers Arch.**, v.341, n.1, p.1-6, 1973.

YAMAMOTO, N.; SEO, H.; SUGANUMA, N.; NATSUI, N.; NAKANE, T.; KUWAYAMA, A.; KAGEYAMA, N. Effect of estrogen on prolactin RNAm in the rat pituitary. Analysis by in situ hybridization and immunohistochemistry. **Neuroendocrinology**, v.42, n.6, p. 494-497, 1986.

YIN, W.; GORE, A.C. Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. **Reproduction.**, v.131, n.3, p.403-414, Mar. 2006.

ZUO, Z.; MAHESH, V.B.; ZAMORANO, P.L.; BRANN, D.W. Decreased gonadotropin-releasing hormone neurosecretory response to glutamate agonists in middle-aged female rats on proestrus afternoon: a possible role in reproductive aging? **Endocrinology**, v.137, n.6, p.2334-2338, Jun. 1996.

ANEXOS

ANEXO A

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



Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Atividade dos neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus e a liberação de GnRH em ratas Wistar Acíclica**" sob responsabilidade do Pesquisador **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** e colaboração de Janete Aparecida Anselmo Franci está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01829-2011**.

CERTIFICATE

We certify that the research "**Activity of neurons of the locus coeruleus noradrenergic and GnRH release in female rats acyclic**", protocol number **01829-2011**, under responsibility of **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** and with collaboration of Janete Aparecida Anselmo Franci agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Cadioli", written in a cursive style.

Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator