

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Pós-Graduação Em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Kaoma Stephani da Costa Silva

**Envolvimento dos neurônios KNDy na dissipação de calor causada pela deficiência
de esteroides sexuais em ratos machos e fêmeas**

Belo Horizonte

2022

Kaoma Stephani da Costa Silva

Envolvimento dos neurônios KNDy na dissipação de calor causada pela deficiência de esteroides sexuais em ratos machos e fêmeas

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial da obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Co-orientador: Dr Glauber dos Santos F. da Silva

Belo Horizonte

2022

043

Silva, Kaoma Stephani da Costa.

Envolvimento dos neurônios KNDY na dissipação de calor causada pela deficiência de esteroides sexuais em ratos machos e fêmeas [manuscrito] /

Kaoma Stephani da Costa Silva. – 2022.

45 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka. Co-orientador: Dr. Glauber dos Santos F. da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Castração. 3. Neurocinina B. 4. Androgênios. 5. Estrogênios. 6. Temperatura Corporal. I. Szawka, Raphael Escorsim. II. Silva, Glauber dos Santos Ferreira da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 370 DE KAOMA STEPHANI DA COSTA SILVA

*"Envolvimento dos Neurônios KNDY Na Dissipação de Calor Causada Pela
Deficiência de Esteroides Sexuais Em Ratos Machos e Fêmeas"*

KAOMA STEPHANI DA COSTA SILVA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **30 de dezembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, FCAV/UNESP

Profa. Dra. Nayara Soares Sena Aquino, EACH/USP

Prof. Dr. Samuel Penna Wanner, EEFETO/UFMG

Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis, ICB/UFMG

Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva, ICB/UFMG - Coorientador

Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 30 de dezembro de 2022

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Escorsim Szawka, Professor do Magistério Superior**, em 02/01/2023, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nayara Soares Sena Aquino, Usuária Externa**, em 02/01/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, Usuária Externa**, em 02/01/2023, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 02/01/2023, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Penna Wanner, Professor do Magistério Superior**, em 02/01/2023, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adelina Martha dos Reis, Membro**, em 02/01/2023, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1995641** e o código CRC **8BB61E5D**.

Aos meus maiores amores, Antonio; Regina;
Kauane e Bulma

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Raphael Szawka agradeço pela orientação, os ensinamentos, os puxões de orelha e o reconhecimento, que contribuíram para meu crescimento acadêmico. Agradeço também ao Dr. Glauber da Silva, meu co-orientador, pela orientação e aprendizado. Ademais, agradeço aos professores que compuseram a banca pelo olhar criterioso sobre o trabalho.

Agradeço ao grupo Kisspeptin, em especial Roberta, Mariana, Patrícia, Nayara, Luma e Ana Clara. Obrigada a todos os colegas de pós-graduação, incluindo Paloma, Nathalie, Tamires, André, Matheus, Evelyn. Agradeço pelas parcerias, diálogos, cafés, lágrimas e compartilhamento das alegrias e angústias vivenciadas ao longo dessa trajetória.

Meu muito obrigada aos meus pais Antonio Carlos e Regina, a minha irmã Kauane, as minhas avós, pelas orações. A toda minha família que foi meu porto seguro ao longo de todos esses anos.

Obrigada meus amigos que permaneceram sempre me apoiando a continuar me dedicando pesquisa no Brasil.

Agradeço as agências de fomento, pelo apoio financeiro

Agradeço aos animais pelo sacrifício.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Os *hot flashes* consistem em uma desordem na termorregulação, caracterizados pela vasodilatação periférica e aumento da dissipação de calor, causada pela redução dos níveis de estradiol (E₂) na pós-menopausa. Evidências anteriores sugerem que os neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), que co-expressam kisspeptina, neurocinina B (NKB) e dinorfina (KNDy), facilitam a vasodilatação cutânea na ausência de (E₂), sugerindo um envolvimento na gênese dos *hot flashes* em mulheres e modelos animais. Porém, os mecanismos fisiológicos envolvidos ainda são pouco conhecidos. Portanto, neste trabalho, avaliamos a dissipação de calor em modelo de ratos gonadectomizados e comparamos a participação dos neurônios KNDy na resposta de machos e fêmeas. No experimento 1, utilizamos ratos Wistar, os quais foram habituados ao contensor durante 4 semanas; posteriormente, os animais passaram por cirurgia de implantação de dataloggers intraperitoneais. As fêmeas foram divididas em: gônada Intacta (Intact), ovariectomizadas tratadas com óleo (OVX) e OVX tratadas com E₂ (OVX+E₂). Os machos foram divididos em: gônada Intacta (Intact), orquiectomizados tratados com óleo (ORX), ORX tratados com testosterona (T; ORX+T) e ORX tratados com dihidrotestosterona (DHT; ORX+DHT). O experimento 1 foi realizado após 15 dias de gonadectomia, no qual foram aferidas a temperatura da pele da cauda (TST), temperatura abdominal (Tabd) e o consumo de oxigênio (VO₂). Os animais foram eutanasiados por perfusão, os cérebros foram processados para imunohistoquímica e imunofluorescência de NKB no ARC e o sangue utilizado para dosagem da concentração de LH por ELISA. O experimento 2 teve protocolo experimental semelhante ao realizado no primeiro, no entanto, os animais foram eutanasiados por decapitação, tiveram os cérebros retirados e ARC foi dissecado por meio da técnica de *punch* para análise do RNAm de NKB por RT-PCR em tempo real. Encontramos que, a ovariectomia aumentou a TST e o índice de perda de calor (HLI), e estes efeitos foram completamente prevenidos pelo tratamento com E₂ nas fêmeas. Concomitantemente, a ovariectomia aumentou o número e diâmetro de neurônios NKB-ir no ARC, e estes parâmetros foram positivamente correlacionados com o aumento da TST. Nos machos, a orquiectomia também aumentou a TST e o HLI, e estes efeitos foram igualmente prevenidos pelos tratamentos com T e DHT. Entretanto, a orquiectomia não aumentou o número de neurônios NKB-ir no ARC dos ratos ORX em relação aos intactos (Intact), enquanto o tratamento com andrógenos reduziu a expressão de NKB nos ratos ORX+T e ORX+DHT em comparação aos grupos Intact e ORX. Não houve correlação significativa entre número de neurônios NKB-ir no ARC e a TST nos machos. Utilizamos então microscopia

confocal para avaliar alterações no tamanho dos neurônios KNDy, esta análise demonstrou similar aumento no diâmetro dos neurônios NKB-ir após a gonadectomia tanto em fêmeas quanto em machos, efeito este prevenido pelos respectivos tratamentos com esteroides sexuais. A análise da expressão do gênica também mostrou resultados similares entre fêmeas e machos. Não observamos efeito da gonadectomia na expressão de *Nkb*, enquanto os esteroides gonadais suprimiram a expressão deste peptídeo no ARC de fêmeas e machos. Portanto, em fêmeas, o aumento da perda de calor devido a falência de E₂ está associado ao aumento do número e tamanho dos neurônios KNDy. Em machos, por sua vez, o aumento da dissipação de calor após a castração associa-se unicamente ao maior tamanho dos neurônios KNDy induzido pela ausência de andrógenos. Em conjunto, nossos dados demonstram que o mecanismo neuroendócrino que desencadeia o fenômeno de *hot flashes* depende da ativação dos neurônios KNDy em ambos os sexos, sendo a hipertrofia destes neurônios o índice mais fidedigno de seu aumento de função em condições de deficiência de esteroides sexuais.

Palavras chave: gonadectomia, temperatura, neurocinina, andrógenos, estrógenos

ABSTRACT

Hot flashes consist of a disorder in thermoregulation, characterized by peripheral vasodilation and increased heat dissipation, caused by reduced levels of estradiol (E_2) in the postmenopausal period. Previous evidence suggests that neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC), which co-express kisspeptin, neurokinin B (NKB) and dynorphin (KNDy), facilitate cutaneous vasodilation in the absence of (E_2), suggesting an involvement in the genesis of hot flashes on women and animal models. However, the physiological mechanisms involved remain poorly understood, therefore, in this work, we evaluated the heat dissipation in a model of gonadectomized rats and compared the participation of KNDy neurons in the response of males and females. In experiment 1, we used Wistar rats, which were habituated to the container for 4 weeks; subsequently, the animals underwent surgery to implant intraperitoneal dataloggers. Females were divided Intact: intact gonad (Intact), ovariectomized females treated with oil (OVX) and OVX treated with E_2 (OVX+ E_2). Males were divided Intact: intact gonad (Intact), orchidectomized treated with oil (ORX), ORX treated with testosterone (T; ORX+T) and ORX treated with dihydrotestosterone (DHT; ORX+DHT). Experiment 1 was performed after 15 days of gonadectomy, in which the skin temperature of the tail (TST), abdominal temperature (Tabd) and oxygen consumption (VO_2) were measured. The animals were euthanized by perfusion, the brains were processed for immunohistochemistry and NKB immunofluorescence in the ARC and the blood used to measure the LH concentration by ELISA. Experiment 2 had an experimental protocol similar to that carried out in the first, however, the animals were euthanized by decapitation, had their brains removed and ARC was dissected using the punch technique for analysis of NKB mRNA by RT-PCR in real time. We found that ovariectomy increased TST and heat loss index (HLI), and these effects were completely prevented by E_2 treatment in females. Concomitantly, ovariectomy increased the number and diameter of NKB-ir neurons in the ARC, and these parameters were positively correlated with increased TST. In males, orchidectomy also increased TST and HLI, and these effects were similarly prevented by treatments with T and DHT. However, orchidectomy did not increase the number of NKB-ir neurons in the ARC of ORX rats relative to Intact, whereas androgen treatment reduced NKB expression in ORX+T and ORX+DHT rats compared to Intact and ORX groups. There was no significant correlation between the number of NKB-ir neurons in the ARC and TST in males. We then used confocal microscopy to assess changes in the size of KNDy neurons, this analysis demonstrated a similar increase in the diameter of NKB-ir neurons after gonadectomy in both females and males, an

effect prevented by the respective treatments with sex steroids. Gene expression analysis also showed similar results between females and males. We did not observe any effect of gonadectomy on Nkb expression, while gonadal steroids suppressed the expression of this peptide in the ARC of females and males. Therefore, in females, increased heat loss due to E2 failure is associated with increased number and size of KNDy neurons. In males, in turn, the increase in heat dissipation after castration is solely associated with the larger size of KNDy neurons induced by the absence of androgens. Taken together, our data demonstrate that the neuroendocrine mechanism that triggers the hot flash phenomenon depends on the activation of KNDy neurons in both sexes, with the hypertrophy of these neurons being the most reliable index of their increased function in conditions of sex steroid deficiency.

Keywords: gonadectomy, temperature, neurokinin, androgens, estrogens

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APO – Área pré-óptica
- AR – Receptor de andrógeno
- ARC – Núcleo arqueado
- CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- DHT – Diidrotestosterona/Di-hidrotestosterona
- DLs – *Dataloggers*
- E₂ – Estradiol
- ER α - Receptor para estrógeno do tipo alfa
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
- HLI – Índice de perda de calor
- HPG - Hipotálamo-Pituitária-Gonadal
- KNDy – Kisspeptina, neurocinina B e dinorfina A
- LH – Hormônio Luteinizante
- MnPO - Núcleo preóptico mediano
- NKB – Neurocinina B
- ORX - Orquiectomizado
- OVX – Ovariectomizada
- T – Testosterona
- Tabd – Temperatura abdominal
- Tamb – Temperatura ambiental
- TST – Temperatura da pele da cauda
- VO₂ – Consumo de oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da ovariectomia sobre parâmetros metabólicos, peso do útero e secreção de hormônio luteinizante (LH) de ratas.....	26
Figura 2: Alterações na temperatura da pele da cauda (TST) em ratas ovariectomizadas (OVX) e os efeitos da reposição de estradiol (E2)..	27
Figura 3: Ação inibitória do estradiol (E ₂) sobre a expressão de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) e dissipação de calor em ratas..	28
Figura 4: Estradiol (E ₂) reduz o diâmetro dos neurônios de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) e dissipação de calor em ratas.	29
Figura 5: Efeito da orquiectomia sobre parâmetros metabólicos e hormonais em ratos. R....	31
Figura 6: Alterações na temperatura da pele da cauda (TST) em ratos orquiectomizados (ORX) e os efeitos do tratamento com andrógenos.....	32
Figura 7: Inibição de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) de ratos orquiectomizados (ORX) tratados com andrógenos.....	33
Figura 8: Aumento no diâmetro dos neurônios de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) após a retirada dos andrógenos.	35
Figura 9: Esteroides gonadais reduzem RNAm para NKB no ARC de fêmeas e machos.....	36

Sumário

Introdução.....	16
Objetivos	19
Objetivo Geral	19
Objetivos específicos	19
Materiais e Métodos.....	19
1. Animais.....	19
2. Drogas e cirurgias	19
2.1. Cirurgias	20
3. Implante do sensor de temperatura abdominal	20
4. Reposição hormonal	20
5. Mensuração da temperatura da pele da cauda (TST)	21
6. Mensuração da temperatura corporal	21
7. Consumo de O ₂ (VO ₂)	21
8. Perfusão e processamento do cérebro para imunohistoquímica.....	21
9. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	23
11. Planejamento experimental.....	24
<i>Experimento 1: Efeito da castração sobre a TST, Tabd, VO₂ e neurônios KNDy, em ratas e ratos gonadectomizados.</i>	<i>24</i>
<i>Experimento 2: Efeito da castração sobre a expressão gênica de NKB, em ratas e ratos gonadectomizados</i>	<i>25</i>
Resultados.....	25
<i>Experimento 1: Efeito da castração sobre a TST, Tabd, VO₂ e neurônios KNDy, em ratas e ratos gonadectomizados.</i>	<i>25</i>
<i>Experimento 2: Efeito da castração sobre a expressão gênica de NKB, em ratas e ratos gonadectomizados</i>	<i>36</i>
Discussão	37
Conclusões.....	41

Introdução

A menopausa, definida pela última menstruação, é determinada pela falência dos folículos ovarianos e redução da secreção de estradiol (E_2) (1). A fase que antecede esse fenômeno é conhecida como climatério, definida como período de transição entre a vida reprodutiva e não reprodutiva (2), período em que as alterações endócrinas, e clínicas da menopausa já começam a aparecer. Após menopausa, a perda dos folículos ovarianos está completa e a concentração plasmática de E_2 reduzida à níveis de castração(3). A queda abrupta no nível de E_2 está associada a múltiplas alterações no organismo feminino, incluindo incontinência urinária, osteoporose, disfunção sexual, problemas relacionados ao sono e sintomas vasomotores (4).

Os sintomas vasomotores, também chamados de ondas de calor ou *hot flashes*, atingem cerca de 80% das mulheres durante o climatério (5, 6), considerados uma desordem na termorregulação hipotalâmica, são caracterizados pela ativação inadequada dos mecanismos de perda de calor, como vasodilatação periférica e sudorese (7). Os episódios de ondas de calor duram, em geral, de 1 a 5 minutos, mas uma porcentagem pequena de mulheres relatam duração maior do que quinze minutos (8). Dados anteriores demonstram uma associação entre as ondas de calor e menor qualidade de vida, envolvendo fatores mentais e físicos (9). Utian (10) avaliou o efeito da reposição hormonal sobre os sintatomas vasomotores e observou a melhora dos mesmos, concluindo que, a prevalência dessas condições era dependente da carência estrogênica. Apesar da maior incidência desses sintomas ocorrer em mulheres, dados anteriores evidenciaram a presença de ondas de calor em homens após a castração farmacológica ou cirúrgica, fenômeno que atinge a maioria dos pacientes nesta condição(11).

As ondas de calor em mulheres, coincidem com pulsos de hormônio luteinizante (LH), sugerindo que, estão relacionadas com o circuito neural hipotalâmico que controla a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)(12, 13). Os neurônios GnRH, fazem parte do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) e, em roedores, estão localizados majoritariamente na área preóptica (POA). A secreção pulsátil de GnRH induz a produção e secreção das gonadotrofinas, LH e hormônio folículo estimulante (FSH), pela hipófise anterior. As gonadotrofinas estimulam a gametogênese e a produção de estradiol (E_2) e testosterona (T) pelas gônadas. Estes esteroides sexuais regulam o eixo HPG através de efeitos de retroalimentação negativa e positiva, no caso específico do E_2 , sobre o hipotálamo e na hipófise anterior (14, 15). No entanto, a ação do E_2 e T sobre a atividade dos neurônios GnRH ocorre de forma indireta, uma vez que estes neurônios não expressam o receptor para estrógeno do tipo alfa ($ER\alpha$) (16) ou receptor para andrógenos (AR) (17), os quais são responsáveis pelos

efeitos de retroalimentação negativa, e positiva, especificamente no caso do E₂ (18). Esse controle do E₂ e T sobre os neurônios GnRH é mediado por interneurônios, localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) em roedores, e no núcleo infundibular em humanos. Estes neurônios, que expressam o receptor de ER α e AR e se projetam para POA (19, 20), são chamados de neurônios KNDy, pois co-expressam três neuropeptídios: kisspeptina (KISS), neurocinina B (NKB) e dinorfina (DYN) (21). A KISS, através do seu receptor *Kiss1r*, tem efeito estimulatório na excitabilidade elétrica dos neurônios GnRH (22) Por consequência, ao modular os neurônios GnRH, a população de neurônios KNDy é responsável por controlar a secreção pulsátil de LH (23).

Interessantemente, os neurônios KNDy parecem estar envolvidos na geração das ondas de calor tanto em animais quanto em humanos. Em 1991, Rance et al. (24) mostraram que mulheres na pós-menopausa apresentam hipertrofia dos KNDy e aumento da expressão gênica de NKB, e resultados similares foram observados em macacas ovariectomizadas (OVX) (25, 26). Adicionalmente, a reposição estrogênica reverte esse quadro, sugerindo que estes efeitos são secundários à insuficiência ovariana (26). A hipertrofia neuronal também ocorre em neurônios do núcleo infundibular de homens mais velhos, no entanto, em menor grau em relação às mulheres na pós-menopausa (27).

Jayasena et al. (28), investigaram os efeitos da administração de NKB sobre as ondas de calor em mulheres, e seus resultados mostraram que, a cada 10 participantes, 8 apresentaram rubor durante a infusão intravenosa de NKB, além de aumentos significativos na frequência cardíaca e temperatura da pele, fornecendo evidências de que a administração de NKB pode causar ondas de calor em mulheres. Com base nessas investigações, Prage et al. (29, 30) relataram recentemente, em um ensaio clínico randomizado duplo-cego controlado por placebo, que um antagonista do receptor de NKB (MLE4901) é capaz de reduzir significativamente o número médio e gravidade das ondas de calor, evidenciando a participação dos KNDy na regulação da temperatura corporal.

Em roedores, o fenômeno de *hot flash* é relacionado à alterações no mecanismo de dissipação de calor, o qual é determinado pela vasodilatação da pele da cauda e pode então ser avaliada através da mensuração da temperatura da pele da cauda (TST) (31). Trabalhos anteriores validaram a utilização do aumento da TST de ratas OVX como modelo animal dos efeitos vasomotores causados pela ausência de E₂ e, portanto, análogo ao *hot flash* em mulheres pós-menopausa (32, 33).

Assim como visto em macacas OVX e mulheres após a menopausa, roedores também apresentam uma expressão de NKB aumentada no ARC após a ovariectomia, e o tratamento com E₂ é capaz de reverter este quadro (33, 34). Adicionalmente, Danzer et al (35) demonstraram que ratos machos orquiectomizados (ORX) também apresentam um aumento na expressão do gene para NKB e este efeito pôde ser revertido pelo tratamento tanto com T quanto com E₂. Yuzurihara et al (36), avaliaram o efeito elevação da TST induzida por peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e observaram que, ratos ORX apresentaram maior TST do que ratos tratados com placebo. Essa potencialização foi significativamente inibida pelo tratamento com hormônios ovarianos, E₂ ou progesterona, bem como pela reposição de T. Entretanto, o efeito apenas da gonadectomia no aumento da perda de calor em modelos de roedores machos ainda não foi determinado.

Ademais, estudos anteriores em roedores, suportam a hipótese de que o mecanismo envolvido no efeito do E₂ sobre a dissipação de calor está relacionado aos neurônios KNDy, os quais se projetam para a POA (37), principal área no sistema nervoso central responsável pelo controle da temperatura corporal, mais especificamente, para o núcleo preóptico mediano (MnPO), um importante componente da via termossensorial de defesa térmica (38). Além disso, quando os neurônios que expressam o receptor para NKB 3 (NK3R) no MNPO são ativados de maneira farmacológica, ocorre uma diminuição na temperatura corporal (Tabd) e aumento na dissipação de calor, vista pela mensuração da TST (39). Ainda, Mittelman-Smith (40) investigaram o efeito da ablação neuroquímica dos neurônios KNDy do ARC, utilizando injeções de NK3 – saporina, e observaram que na ausência desses neurônios, os animais apresentaram uma redução da TST e do índice de perda de calor (HLI), indicando uma diminuição na vasodilatação da pele da cauda. Considerando que esses estudos mostram efeitos pronunciados do E₂ e T na termorregulação de roedores, o mecanismo neuroendócrino que desencadeia o fenômeno de *hot flashes* na ausência de hormônios gonadais ainda é pouco conhecido. Assim, considerando as lacunas existentes, este trabalho se propôs a investigar em modelo de ratos gonadectomizados, alterações na dissipação de calor e a participação dos neurônios KNDy na resposta de machos e fêmeas.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a dissipação de calor em modelo de ratos gonadectomizados e compararmos a participação dos neurônios KNDy nesta resposta, em machos e fêmeas

Objetivos específicos

- 1) Comparar os efeitos da castração sobre a TST, Tabd, VO₂ e expressão de NKB no ARC de ratos machos e fêmeas.
- 2) Avaliar se a reposição com E₂, em fêmeas, T ou DHT, em machos, é capaz de prevenir as alterações promovidas pela castração sobre os parâmetros metabólicos e a expressão de NKB no ARC de ratos machos e fêmeas.
- 3) Avaliar o efeito da castração sobre a expressão gênica de NKB em ratas e ratos

Materiais e Métodos

1. Animais

Para realizar os experimentos propostos no presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de quatro por caixa (39 x 32 x 17 cm), em um ambiente de temperatura (22 ± 1 °C) e luz (12:00 h claro / 12:00 h escuro; luzes acesas às 07:00 h) controlados, com água e ração *ad libitum*. As fêmeas tiveram seu ciclo acompanhado diariamente através da análise do esfregaço vaginal. Apenas as fêmeas que apresentaram 3 ciclos estrais regulares consecutivos foram incluídas no estudo. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais da Universidade Federal de Minas Gerais (Nº:262/2020).

2. Drogas e cirurgias

Para a realização da ovariectomia, orquiectomia, implante do sensor de temperatura, e perfusão, os animais receberam isoflurano como anestesia inalatória utilizando uma bomba de infusão vaporizadora de precisão (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para a indução anestésica realizamos a administração de 5%, posteriormente a concentração anestésica foi alterada para 2-1,5% para manter a sedação do animal até o final da cirurgia. Após a cirurgia, os animais receberam tratamento profilático com pentabiótico veterinário (2400 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixinina meglumina; 2,5 mg/Kg, s.c.)

2.1. Cirurgias

2.1.1. Ovariectomia:

A ovariectomia foi realizada através da laparotomia bilateral. Após anestesia, foi feita a tricotomia e assepsia da região lateral do abdômen. Um corte foi realizado na região e, após incisão do tecido muscular, o tecido adiposo foi exteriorizado para que se obtenha o acesso ao ovário. A tuba uterina foi clampeada, o ovário removido e as incisões no músculo e na pele foram suturadas.

2.1.2. Orquiectomia:

Foi realizada através de uma incisão na linha mediana dos testículos, permitindo que os tecidos subjacentes fossem divulsionados até a exposição da túnica albugínea. O testículo foi então pressionado contra a abertura cirúrgica e outra incisão foi feita na túnica albugínea com intuito de exteriorizar o testículo, o epidídimo e o funículo espermático. Logo após, foi realizada uma dupla ligadura no funículo espermático, o qual foi seccionando para retirada do testículo. O mesmo procedimento foi realizado com o testículo contralateral. Após excisão de ambos os testículos, a incisão da pele foi suturada

3. Implante do sensor de temperatura abdominal

Para inserção do sensor de temperatura abdominal (*dataloggers*) foi realizado uma tricotomia da região abdominal, e posterior incisão ventral mediana na pele, seguida de outra incisão na linha alba do músculo reto abdominal, possibilitando o acesso à cavidade abdominal. Após a inserção do sensor (DLs; SubCue) o músculo e pele foram suturados.

4. Reposição hormonal

Para reposição hormonal foram utilizadas cápsulas de Silastic contendo E₂, dissolvido em óleo de milho (6 µg/cápsula/rata) ou somente óleo, durante duas semanas. Cada animal recebeu 2 cápsulas ao mesmo tempo. As cápsulas foram preenchidas com solução de 180 µg/mL de E₂ (41) e inseridas no tecido subcutâneo na região do dorso do animal por meio de uma pequena incisão, sendo a mesma fechada posteriormente com sutura da pele. Os ratos receberam a testosterona (0,25 mg/0,2mL/rato) ou di-hidrotestosterona (DHT) (0,25 mg/0,2mL/rato) por 7 dias (42).

5. Mensuração da temperatura da pele da cauda (TST)

A TST foi mensurada com os animais acordados e em contensão. O termossensor (serie 409-B,I Yellow Springs Instruments) foi afixado na superfície dorsal da cauda, a 5 cm da base mesma, e envolto com fita silver tape com intuito de isolar o termossensor e impedir que o mesmo meça a Tamb ao invés da TST (41). O termossensor foi conectado a um termômetro de alta precisão (modelo 4600 - Measurement Specialties). Os registros de temperatura foram realizados em intervalos de cinco minutos, durante uma hora

6. Mensuração da temperatura corporal

A medida da temperatura corporal foi realizada por meio de *dataloggers* (DL) que foram implantados na cavidade intraperitoneal, no mesmo dia da cirurgia de castração. Os DLs foram previamente programados para aquisição de dados a cada 5 minutos. Ao término do experimento os animais foram sacrificados, os DLs foram retirados e os dados de temperatura foram coletados por *download* realizado por software específico (SubCue). Tanto a programação quanto o download dos dados foram realizados por cabos e softwares específicos para os DLs (SubCue, C nada).

7. Consumo de O₂ (VO₂)

As medidas do VO₂ foram realizadas utilizando o método de calorimetria indireta por meio da respirometria aberta. Nesta metodologia, amostras do fluxo de ar de saída e de entrada da câmara foram realizadas por um analisador de gases (Gas Analyzer ML206, AdInstruments). O VO₂ foi calculado, então utilizando a fórmula de Frappell et al(43):

$$VO_2 = \frac{[Ve \times (FiO_2 - FeO_2)]}{1 - FiO_2}$$

onde: Ve é a taxa de fluxo de entrada, FiO₂ é a fra o de O₂ na entrada; Fe O₂   a fra o de O₂ na saída. O VO₂ foi corrigido pela massa corporal em Kg.

8. Perfusão e processamento do cérebro para imunohistoquímica

Os animais foram perfundidos através da aorta ascendente, com 50mL de tampão fostatossalina (PBS) heparinizado (5 UI/mL), seguido de 300 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2h e crioprotetidos em soluço de sacarose 30% em PB 0,1M a 4  C. Em seguida, foram congelados em isopentano 99% (C₅H₁₂), a -50  C. Depois de congelados, os cérebros foram armazenados

à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Quatro séries de secções coronais de $30\text{ }\mu\text{m}$ do ARC foram obtidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson 2006(44), para a posterior realização da imunohistoquímica por imunoperoxidase ou imunofluorescência conforme descrito anteriormente(41). A marcação para NKB foi realizada com o anticorpo primário anti-NKB feito em coelho (Novus biotechne brand, EUA; diluição 1:10000). Como anticorpo secundário, utilizamos o anti-IgG de coelho biotilado produzido em cavalo (BA-1100; diluição 1:2.000; Vector Laboratories) por 2 h. Utilizamos como ligante para o anticorpo secundário, um complexo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories; diluição 1:400), e como cromógeno, foi utilizado uma solução de Ni-DAB-HCl peroxidase (Ni, 25 mg/mL; DAB, 0,2 mg/mL; H₂O₂, 0,03%). Fotomicrografias bilaterais de cerca de 4 secções de ARC foram adquiridas utilizando a objetiva de 20x de um microscópio óptico acoplado a um sistema de câmera digital (AxioCam MRC e Axiovision SE64, Zeiss) para análise do número de neurônios imunorreativos para NKB no ARC. Esses neurônios foram identificados pelos corpos neuronais corados em preto. Esses corpos foram detectados e contabilizados bilateralmente em cada secção de forma automática usando as ferramentas de análise e contagem de partículas de acordo com a circularidade do programa Image J (ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

Para imunofluorescência de NKB, as secções foram incubadas com um coquetel contendo o anticorpo anti-NKB (Novus biotechne brand, EUA; diluição 1:2000), seguido de anticorpo secundário anti-coelho IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA; RRID: AB_2535792) conjugado ao Alexa Fluor 488 (Life Technologies, EUA) a 1:1.000 por 2 h. As imagens foram adquiridas em um sistema confocal (LSM 880 Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha; Image Acquisition e Centro de Processamento, Universidade Federal de Minas Gerais) equipado com uma objetiva de 40x - EC Plan-Neofluar. As imagens da pilha Z-stacks foram tiradas em intervalos ópticos de $0,47\text{ }\mu\text{m}$ através do ARC (1 pinhole AU). Para maximizar o número dos neurônios avaliados, os campos analisados foram selecionados com base na maior densidade de neurônios NKB-ir. As fotomicrografias foram utilizadas para a análise do diâmetro dos neurônios NKB, identificados pelos corpos neuronais corados em verde. Ao encontrarmos o maior comprimento de cada neurônio, a partir da avaliação de todos os Z-stacks de cada campo analisado, utilizamos o programa Image J (ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), o qual foi calibrado ($1\text{ }\mu\text{m}$ corresponde à 6.7205 pixels) utilizando a régua de calibração específica para o sistema confocal (LSM 880 Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

A partir daí, medimos o maior diâmetro de cada neurônio presente nas fotomicrografias. Foram analisados cerca de 120 neurônios por grupo.

9. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

As amostras de ARC foram dissecadas para avaliação dos níveis de RNAm de NKB usando metodologia previamente descrita (45). Após a decapitação, os cérebros foram removidos e congelados em gelo seco. Em seguida, secções coronais foram obtidas em criostato na temperatura de -10°C para realização de microdissecções pela técnica de “punch”, como previamente descrito (46). O ARC foi dissecado em dois punches, utilizando-se uma agulha de 1,5 mm de diâmetro, e então armazenados em -80°C . Os punches foram homogeneizados em 500 μL Tri-Reagent-LS (Life Technologies), utilizando uma seringa de 1 mL e armazenados overnight em 4°C . RNAm total foi extraído adicionando mais 250 μL Tri-Reagent-LS aos eppendorfs contendo as amostras. 1 μg de RNAm foi convertido em cDNA utilizando-se o kit Superscript III (Invitrogen). O cDNA sintetizado foi amplificado utilizando-se 4 μL de cDNA, 600 nM de cada primer, 10 μL do reagente SYBR Green água DNase e RNase-free conforme descrito pelo fabricante (kit Platinum® SYBR® GREEN qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen Life Technologies). Os ensaios foram realizados em um termociclador Applied Biosystems 7500 seguintes condições: 2 min a 50°C , 10 min a 95°C , seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C ; em seguida foi realizada análise da curva de dissociação nas seguintes condições: 1 min a 60°C , 1 min a 95°C , 1 min a 60°C e 80 ciclos de 10 s a 55°C , com aumento gradativo de $0,5^{\circ}\text{C}$. A análise da expressão de RNAm foi feita pela comparação do número de cópias do RNAm entre os grupos experimentais. O número de cópias foi inferido de acordo com o número mínimo de ciclos necessário para atingir um sinal de fluorescência superior ao nível basal (CT). A expressão relativa do RNAm NKB foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (47), onde o ΔCT foi determinado pela subtração dos valores de CT do gene de interesse e do respectivo Gapdh (gene normalizador), e o $\Delta\Delta\text{CT}$ foi obtido pela subtração do valor de ΔCT de cada amostra pelo ΔCT das amostras do grupo calibrador (determinado de acordo com os grupos experimentais de cada estudo). A exponencial negativa na base 2 do valor de $\Delta\Delta\text{CT}$ forneceu a medida do número de vezes que o RNAm NKB variou em relação ao grupo calibrador.

Tabela 1: Genes e sequências de nucleotídeos dos primers utilizados no RT-PCR tempo real

Genes	Primers	Número de acesso
<i>Nkb</i>	Forward primer: 5' - ATAGGCCAGCAGTGCAGAAA-3'	NM_019162

	Reverse primer: 5'- AGCCAACAGGAGGACCTTG-3'	
<i>Gapdh</i>	Forward primer: 5'-ACAGCCGCATCTTCTTGTGC-3'	NM_017008
	Reverse primer: 5'-GCCTCACCCCATTTGATGTT-3'	

10. Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm EPM. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Sidak, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

11. Planejamento experimental

Experimento 1: Efeito da castração sobre a TST, Tabd, VO₂ e neurônios KNDy, em ratas e ratos gonadectomizados.

Este experimento teve como objetivo investigar o efeito da retirada dos hormônios esteroides sobre a TST, Tabd e VO₂ em ratas e ratos gonadectomizados, além de avaliar variações na imunorreatividade de NKB no ARC. Os animais com três meses de idade foram submetidos à habituação ao contensor diariamente durante quatro semanas em tempos crescentes semanalmente (0,5; 1; 1,5; 1,5 horas). Posteriormente, todos os animais passaram por cirurgia de implantação de sensores de temperatura. As fêmeas foram divididas em 3 grupos experimentais: 1) ratas na fase diestro do ciclo estral (Intact), 2) ratas OVX tratadas com óleo de milho (OVX+O) e 3) ratas OVX tratadas com E₂ (OVX+ E₂). Os machos foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) Intactos (Intact); 2) ratos ORX tratados com óleo de milho (ORX+O); 3) ratos ORX tratados com T (ORX+T); 4) ratos ORX tratados com DHT (ORX+DHT). O tratamento com E₂ foi feito via implante de 2 cápsulas de silastic, as quais foram implantadas no mesmo momento da gonadectomia e permaneceram até o momento da eutanásia(41). Já o tratamento com andrógenos foi feito por via subcutânea por 7 dias anteriores ao experimento (42). Quinze dias após a cirurgia de gonadectomia foram realizadas as medidas da TST e Tabd com os animais em contensão, em temperatura ambiente (Tamb) de $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, a qual foi registrada ao longo do experimento. Os dados foram registrados a cada cinco minutos durante 1 hora, enquanto as medidas o VO₂, foram realizadas continuamente durante todo o experimento. A partir dos dados obtidos, pudemos calcular o HLI, o qual foi determinado pela

seguinte equação: $HLI = (TST - Tamb) / (Tabd - Tamb)$. O HLI está correlacionado com o fluxo sanguíneo e varia entre 0 (vasoconstrição máxima da pele) e 1 (vasodilatação máxima da pele) (48). Ao final do experimento os animais foram perfundidos, tiveram os cérebros retirados para análise imunohistoquímica de NKB no ARC e o sangue coletado para dosagem de LH por ELISA.

Experimento 2: Efeito da castração sobre a expressão gênica de NKB, em ratas e ratos gonadectomizados

Para o experimento 2, realizamos o protocolo experimental similar ao descrito no experimento 1. As fêmeas foram divididas em 3 grupos experimentais: 1) ratas na fase diestro do ciclo estral (Intact), 2) ratas OVX tratadas com óleo de milho (OVX+O) e 3) ratas OVX tratadas com E2 (OVX+ E2). Os machos foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) Intactos (Intact); 2) ratos ORX tratados com óleo de milho (ORX+O); 3) ratos ORX tratados com T (ORX+T); 4) ratos ORX tratados com DHT (ORX+DHT). Os animais foram eutanasiados por decapitação, tiveram os cérebros retirados, e imediatamente congelados em gelo seco para utilização da técnica de *punch* do ARC e então armazenados em freezer -80°C para posterior realização do RT-PCR em tempo real.

Resultados

Experimento 1: Efeito da castração sobre a TST, Tabd, VO2 e neurônios KNDy, em ratas e ratos gonadectomizados.

Variações na TST em ratas OVX tem sido relacionada ao *hot flash*, fenômeno observado em mulheres durante a pré e pós-menopausa (7). Neste experimento, re-avaliamos o efeito da castração sobre a TST, Tabd, VO2 e expressão de NKB, afim de investigar se há dimorfismo sexual na promoção da vasodilatação cutânea modulada por neurônios KNDy em machos e fêmeas. Como resultado, podemos observar que, após a ovariectomia, os animais OVX apresentaram aumento de peso corporal, em relação aos animais Intact ($P < 0,05$), como pode ser visto na figura 1A. Conforme esperado, encontramos uma redução no peso do útero em ratas OVX ($P < 0,001$), o que foi prevenido pelo tratamento com E2 (Fig. 1B). Consoante ao já descrito na literatura (49), e condizente com os dados de peso uterino, os animais OVX têm a concentração de LH aumentada ($P < 0,001$), uma vez que não há a ação do E2 exercendo o *feedback* negativo sobre a secreção das gonadotrofinas; estes dados podem ser vistos na figura 1C. Em conjunto, os dados de peso de útero e LH validam o modelo utilizado de falência estrogênica após a ovariectomia e a eficácia do tratamento com E2. Ao avaliarmos o VO2, na

figura 1D, não encontramos diferença significativa entre os grupos, o que sugere que, após 15 dias de OVX, os animais não apresentam alterações metabólicas basais.

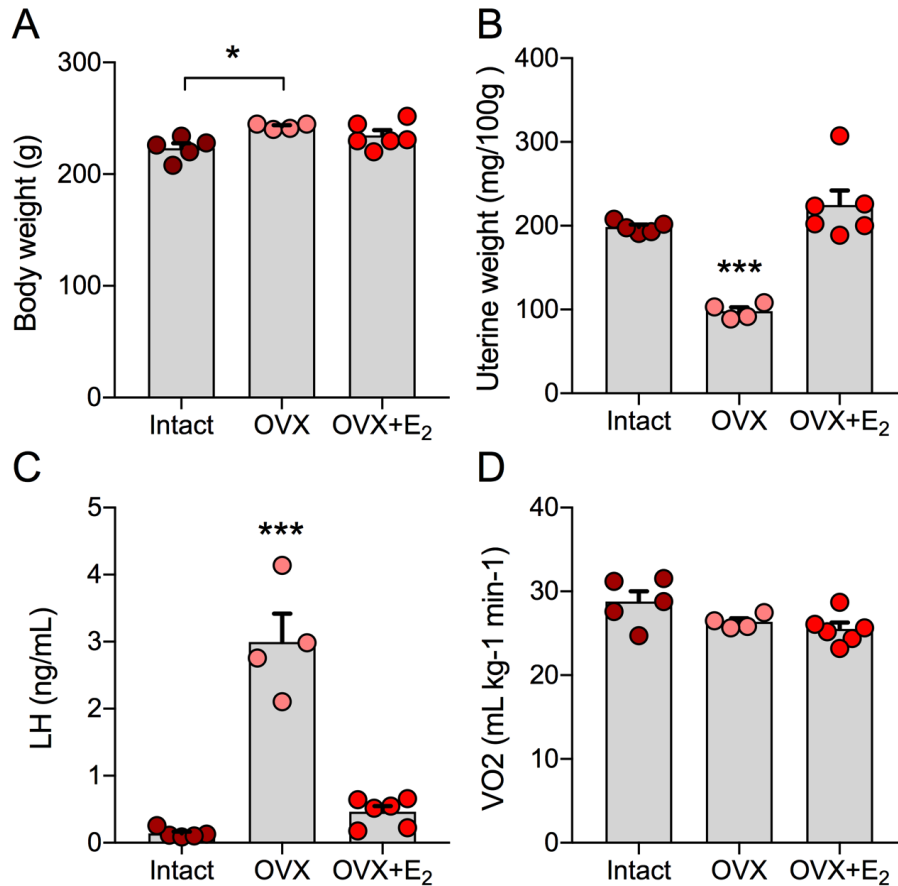


Figura 1: Efeito da ovariectomia sobre parâmetros metabólicos, peso do útero e secreção de hormônio luteinizante (LH) de ratas (A–D). Ratas com ciclo estral regular foram utilizadas na fase de diestro (Intact; $n = 5$) ou foram ovariectomizadas (OVX) e tratadas através de implantes de cápsulas subcutâneas (s.c.) contendo óleo de milho (OVX; $n = 4$) ou 17β -E₂ (OVX + E₂; $n = 6$). Os experimentos foram realizados 15 dias após a cirurgia. (A) Peso corporal. * $P < 0,05$ OVX versus Intact. (B) Peso do útero. *** $P < 0,001$ OVX comparado a OVX+E₂ e Intact. (C) Níveis plasmáticos de LH. *** $P < 0,001$ OVX comparado a OVX+E₂ e Intact (D) Consumo de Oxigênio (VO₂) obtido através de método aberto de respirometria. Não houve diferença significativa. Dados representados como média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Sidak.

Ao longo de todo período experimental, o qual contou com 60 minutos, a TST dos três grupos experimentais, Intact; OVX e OVX+ E₂, permaneceu relativamente constante, como exibido na figura 2A. A retirada do E₂ promoveu um aumento na dissipação de calor, visto pelo aumento na TST no grupo OVX ($P < 0,001$), ademais, nota-se que o tratamento com E₂ (OVX+ E₂) foi capaz de prevenir esse quadro, retornando a TST à níveis semelhantes ao animal intacto (Fig. 2B), evidenciando o efeito do E₂ sobre a vasodilatação periférica. No entanto, não foram observadas alterações na Tabd em nenhum dos grupos experimentais (Fig. 2C). A figura 2D

mostra o HLI aumentado no grupo OVX ($P < 0,001$), indicando aumento de dissipação de calor pela pele da cauda, e, novamente, o E_2 preveniu este efeito nas ratas OVX+ E_2 .

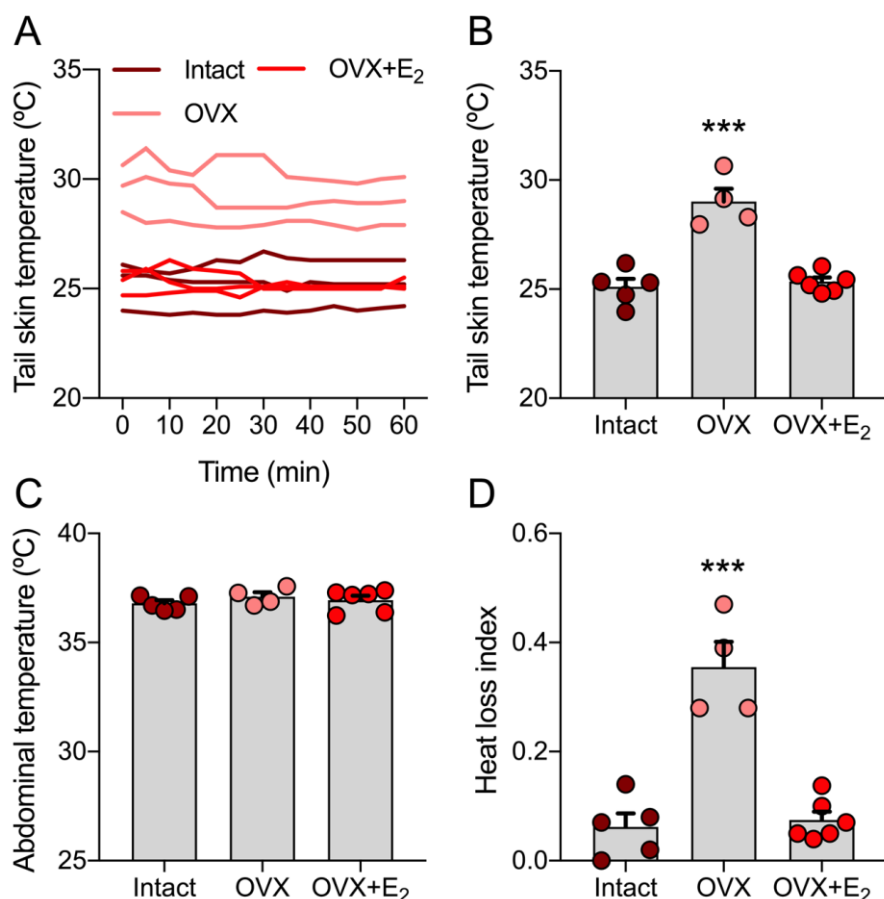


Figura 2: Alterações na temperatura da pele da cauda (TST) em ratas ovariectomizadas (OVX) e os efeitos da reposição de estradiol (E_2). (A-D). Ratas com ciclo estral regular foram utilizadas na fase de diestro (Intact; $n = 5$;) ou foram OVX e tratadas através de implantes de cápsulas subcutâneas (s.c.) contendo óleo de milho (OVX; $n = 4$) ou 17β - E_2 (OVX+ E_2 ; $n = 6$). (A) Exemplos do perfil de TST medida após 15 dias de OVX, a cada 5 minutos, por um período de 60 minutos. (B) Valores médios de TST. *** $P < 0,001$ OVX comparado a OVX+ E_2 e Intact. (C) Média da temperatura abdominal (Tabd). Não houve diferença significativa. (D) Índice de perda de calor (HLI), *** $P < 0,001$ OVX comparado a OVX+ E_2 e Intact. Dados representados como média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Sidak.

A retirada de E_2 leva ao aumento da expressão gênica de NKB em mulheres durante a pós menopausa (24). Neste estudo, encontramos resultados semelhantes em ratas OVX. Fotomicrografias representativas dos 3 grupos experimentais Intact; OVX; OVX+ E_2 estão representadas na figura 3 (A-C). Ao analisarmos a expressão do peptídeo NKB no ARC por imunoperoxidase, a ovariectomia aumentou o número de neurônios imunorreativos para NKB ($P < 0,05$), e o tratamento com E_2 preveniu esse efeito, no grupo OVX+ E_2 . Ainda, a TST

mostrou-se positivamente correlacionada ao número de neurônios NKB-ir, com maior TST associada a um maior número de neurônios ($P < 0,01$).

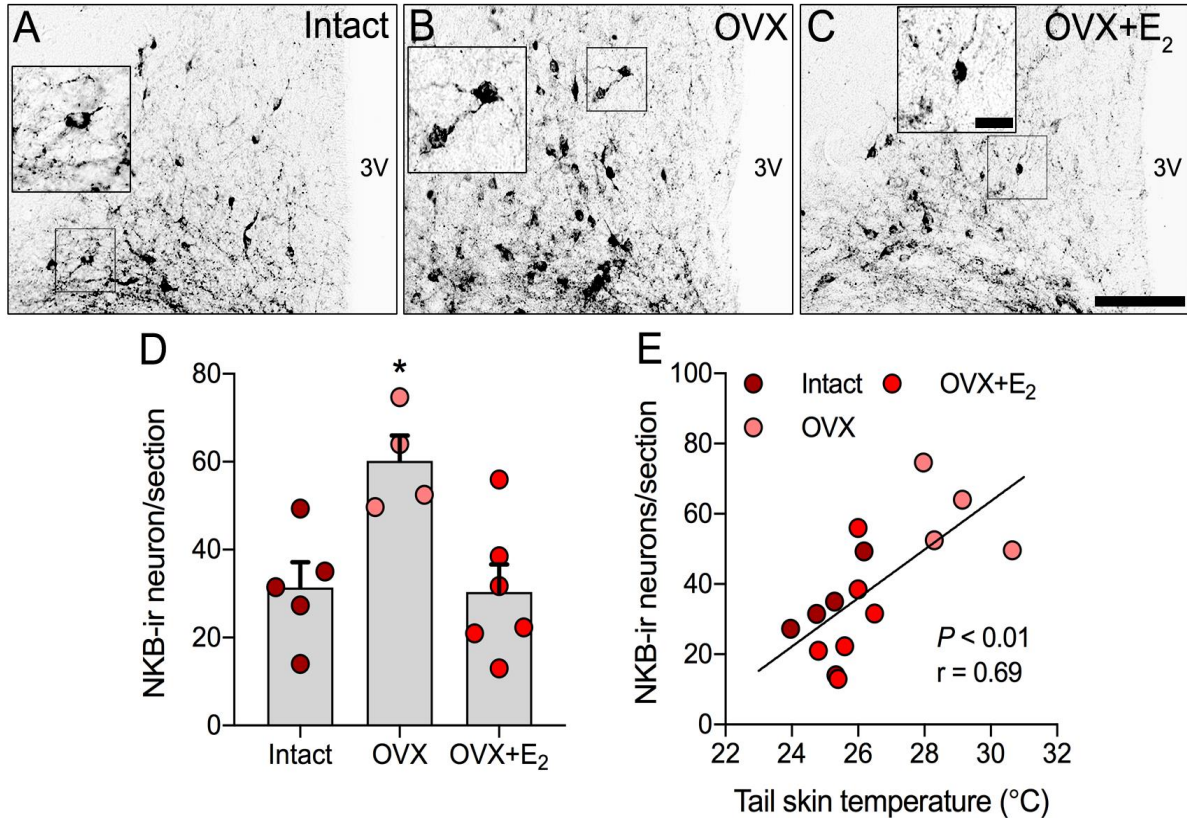


Figura 3: Ação inibitória do estradiol (E₂) sobre a expressão de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) e dissipação de calor em ratas. (A-C). Ratas com ciclo estral regular foram utilizadas na fase de diestro (Intact; n = 5) ou foram ovariectomizadas (OVX) e tratadas através de implantes de cápsulas subcutâneas (s.c.) contendo óleo de milho (OVX; n = 4) ou 17β-E₂ (OVX+E₂; n = 6). O experimento foi realizado 15 dias após a ovariectomia. Marcação imunohistoquímica de NKB no ARC de ratas Intactas (A), OVX (B) e OVX+ E₂ (C). (D) Número de neurônios imunorreativos (ir) à NKB por secção. *P < 0,05 OVX comparado a Intact e OVX+E₂. (E) Correlação positiva (r = 0,69; P < 0,01) entre o número de neurônios NKB-ir e o índice de perda de calor (HLI). 3V, terceiro ventrículo. Escala 100µm (A-C), 20µm (maior aumento). Dados representados como média ± SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste Sidak.

A figura 4 apresenta os resultados obtidos a partir da análise da microscopia confocal da imunofluorescência para NKB no ARC. As figuras 4 A-C apresentam as fotomicrografias representativas dos 3 grupos experimentais, Intact, OVX e OVX+ E₂. Notamos que o E₂ age de maneira inibitória sobre diâmetro dos neurônios imunorreativos para NKB, uma vez que, ratas OVX apresentam um aumento deste parâmetro ($P < 0,01$), enquanto que o tratamento com E₂ mantém o diâmetro desses neurônios em valores semelhantes ao visto no grupo Intact. Ainda, a TST dos animais apresenta correlação positivamente com o diâmetro dos neurônios NKB-ir do ARC, ou seja, quando maior o diâmetro do neurônio maior a dissipação de calor pela cauda, ($P < 0,001$). De modo Interessante, esta correlação apresentou maior coeficiente de linearidade ($r = 0,83$) do que a obtida na correlação com o número de neurônios NKB-ir (Fig. 3E, $r = 0,69$).

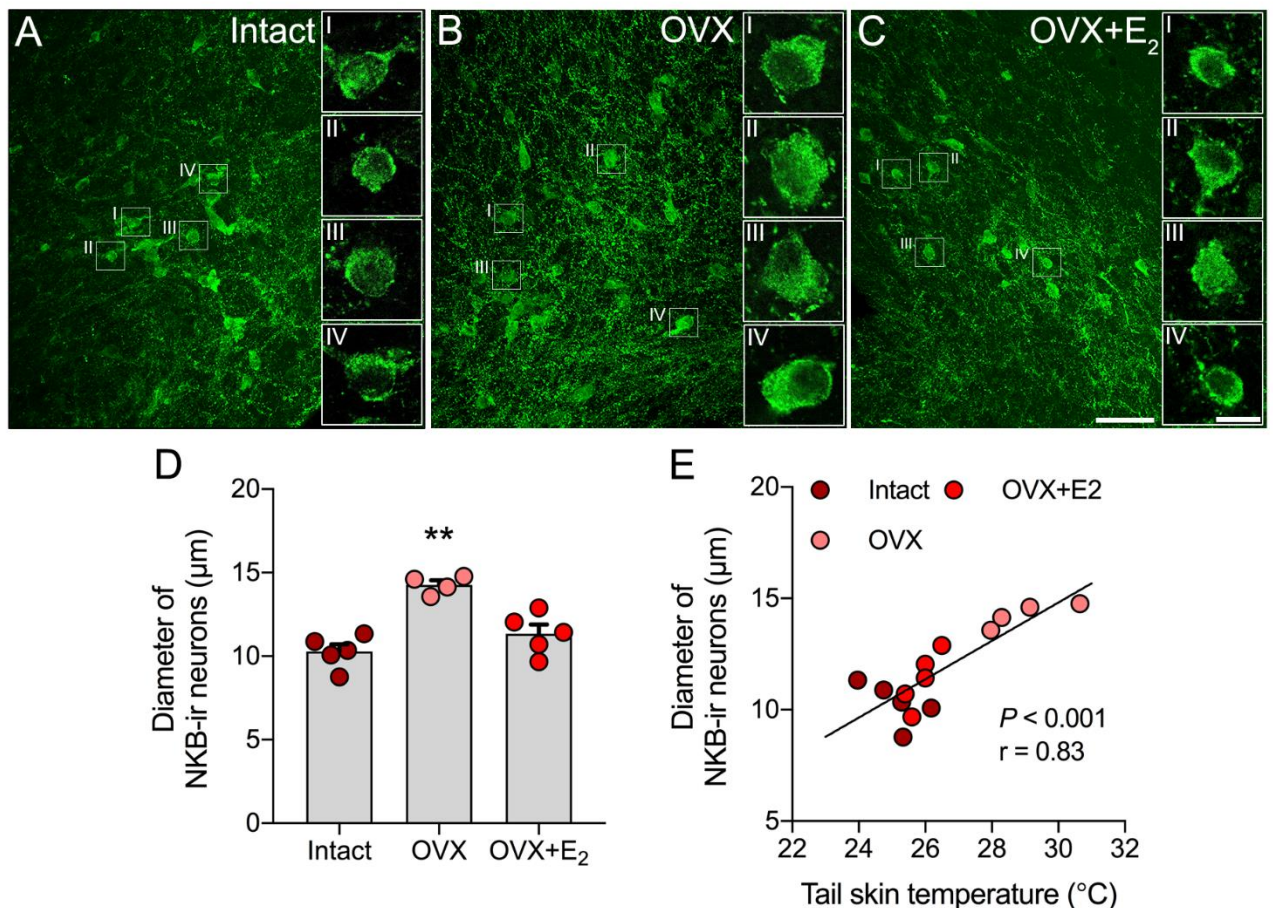


Figura 4: Estradiol (E₂) reduz o diâmetro dos neurônios de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) e dissipação de calor em ratas. (A-C). Ratas com ciclo estral regular foram utilizadas na fase de diestro (intact; n = 5) ou foram ovariectomizadas (OVX) e tratadas através de implantes de cápsulas subcutâneas (s.c.) contendo óleo de milho (OVX; n = 4) ou 17β- E₂ (OVX+ E₂; n = 6). O experimento foi realizado 15 dias após a ovariectomia. Imagens confocais Z-stack ilustram neurônios (ir) para NKB no ARC de ratas Intactas (A), OVX (B) e OVX+ E₂ (C). (I-IV) Plano confocal mostrando corpo de neurônios NKB. (D) Diâmetro de neurônios imunorreativos (ir) à NKB por secção. * $P < 0,01$ OVX comparado a Intact e OVX+ E₂. (E) Correlação positiva ($r = 0,83$; $P < 0,001$) entre o diâmetro de neurônios (ir) para NKB e temperatura da pele da cauda (TST) Escala 50µm

(A-C), 10 μ m (maior aumento). Dados representados como média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste Sidak.

Nos machos, a orquiectomia não alterou o peso corporal dos animais ORX em relação aos demais grupos (Fig. 5A). Como esperado, a ORX reduziu o peso da próstata ($P < 0,001$), e vesícula seminal ($P < 0,001$), visto nas figuras 5 B e C, respectivamente. Ainda, os ratos ORX apresentaram aumento nos níveis de LH ($P < 0,001$) em relação aos demais grupo. No entanto, sua concentração foi restabelecida aos níveis pré-gonadectomia nos ratos ORX+T e ORX+DHT (Fig. 5D). Estes dados demonstram a eficácia do modelo de gonadectomia em machos e reposição com andrógenos utilizados em nosso estudo. Assim como nas fêmeas, a orquiectomia não alterou o consumo de O₂ nos ratos ORX em relação aos outros grupos estudados, (Fig. 5E).

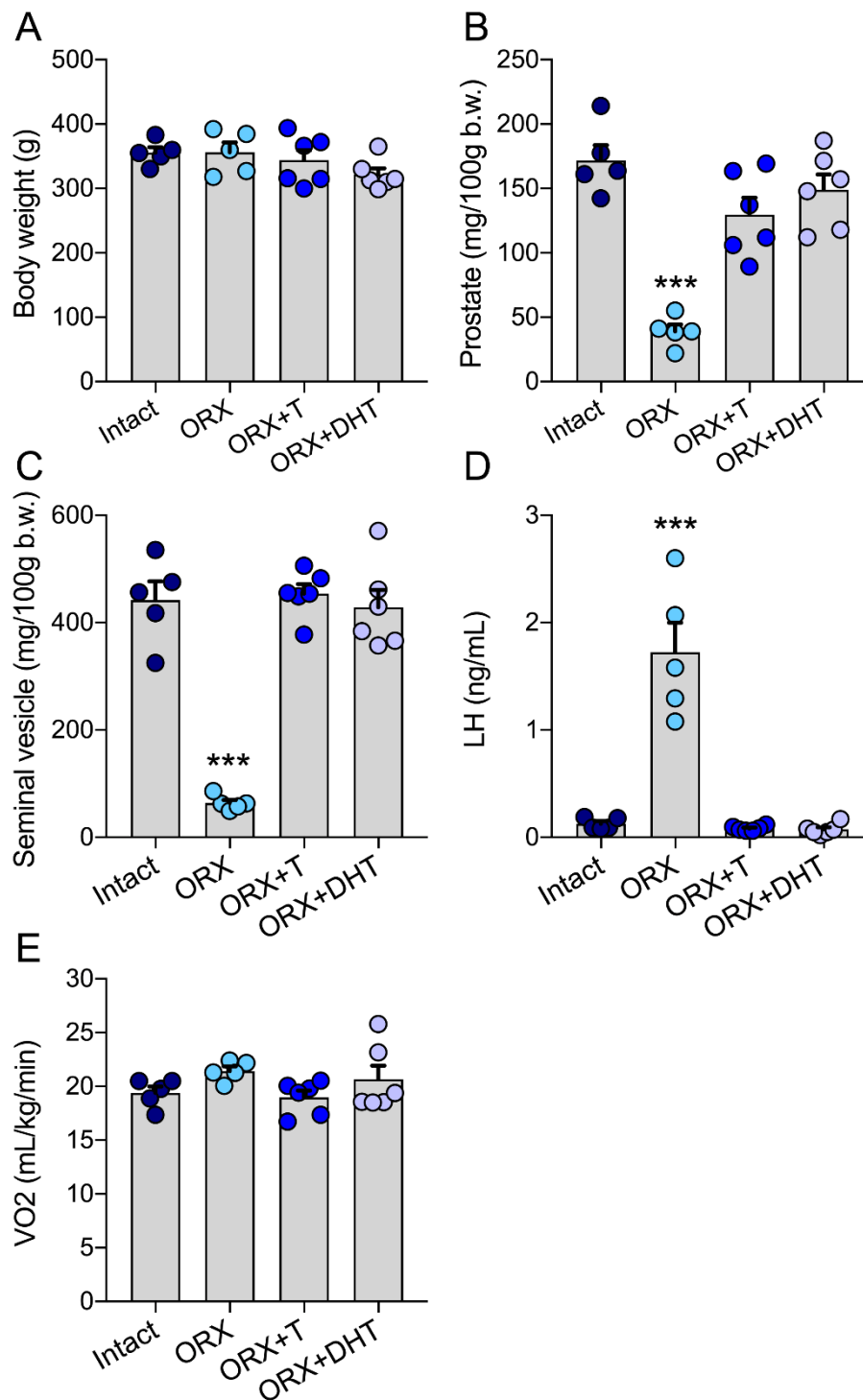


Figura 5: Efeito da orquiectomia sobre parâmetros metabólicos e hormonais em ratos. Ratos foram mantidos Intactos (Intact; n = 5); ou foram orquiectomizados (ORX) e tratados durante 7 dias antes do experimento com injeções subcutâneas (s.c.) diárias de óleo de milho (ORX; n = 5), ou testosterona (ORX+T; n = 6) ou dihidrotestosterona (ORX+DHT; n = 6). O experimento foi realizado 15 dias após a cirurgia. (A) Peso corporal. Não houve diferença significativa. (B) Peso da próstata. ***P < 0,001 comparado aos demais grupos. (C) Peso da vesícula seminal. ***P < 0,001 comparado aos demais grupos. (D) Níveis plasmáticos de LH ***P < 0,001 comparado aos demais grupos. (E) Volume de O₂ consumido obtido através de método aberto de respirometria. Não houve diferença significativa. Dados representados como média ± SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Sidak.

O efeito da ORX sobre a vasodilatação da pele da cauda pode ser visto na figura 6. Mensuramos a TST de 4 grupos experimentais Intact, ORX, ORX+T e ORX+DHT. Na figura 6A, trazemos exemplos de perfis de resposta ao longo do experimento. A ORX levou ao aumento da TST ($P < 0,05$), por sua vez, o tratamento tanto com T quanto com DHT foi capaz de impedir esse quadro nos ratos ORX+T e ORX+DHT, respectivamente (Fig. 6B). Similar ao que acontece nas fêmeas, a T_{abd} dos machos também não sofreu alteração em nenhum dos grupos estudados (Fig. 6C). Entretanto, o HLI apareceu aumentado após a orquiectomia, e o tratamento com andrógenos nos grupos ORX+T e ORX+DHT retornou o HLI à valores similares aos dos animais Intact (Fig. 6D).

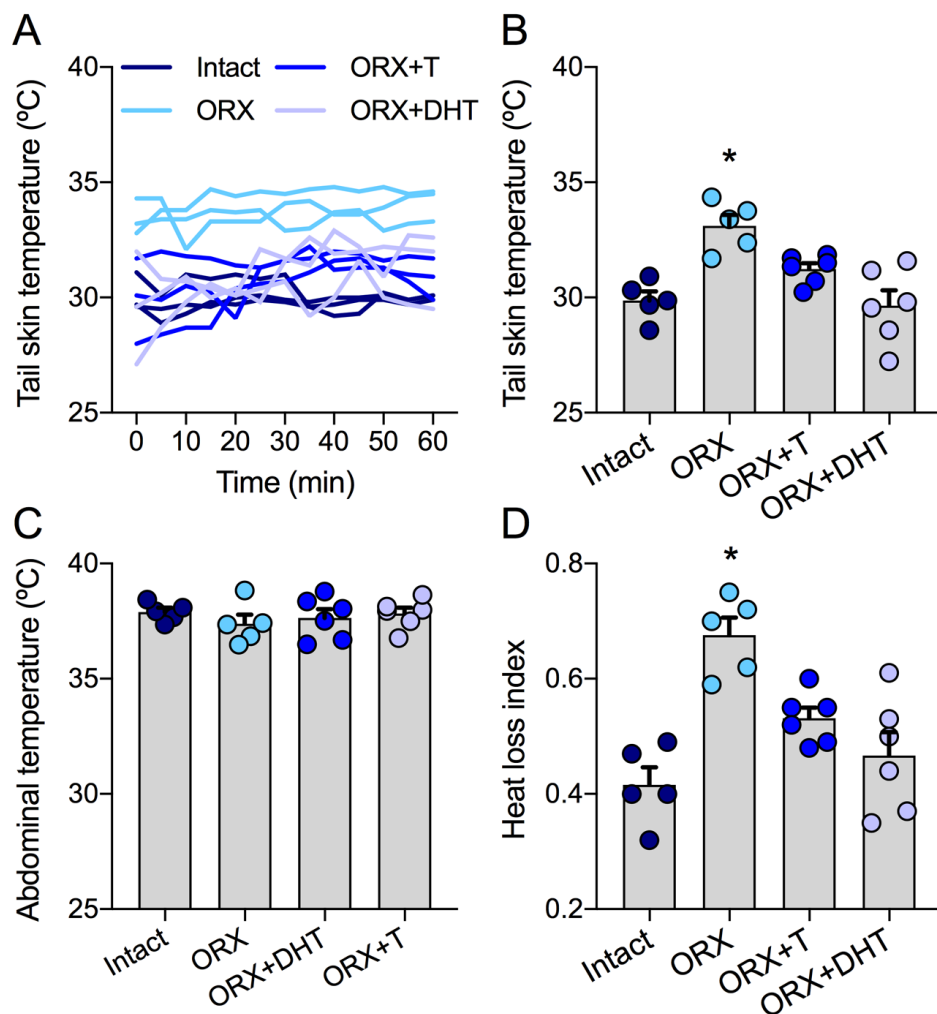


Figura 6: Alterações na temperatura da pele da cauda (TST) em ratos orquiectomizados (ORX) e os efeitos do tratamento com andrógenos. Ratos foram mantidos Intactos (Intact; $n = 5$); ou foram ORX e tratados durante 7 dias antes do experimento com injeções subcutâneas (s.c.) de óleo de milho (ORX; $n = 5$), testosterona (ORX+T; $n = 6$) ou dihidrotestosterona (ORX+DHT; $n = 6$). O experimento foi realizado 15 dias após a cirurgia. (A) Valores de TST medida a cada 5 min durante um período de 60 minutos. (B) Valores médios de TST. * $P < 0,05$ ORX comparado aos demais grupos. (C) Média da temperatura corporal. Não houve diferença significativa. (D) Índice

de perda de calor. * $P < 0,05$ ORX comparado aos demais grupos. Dados representados como média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Sidak.

A figura 7 (A-F) apresenta os efeitos da orquiectomia sobre o número de neurônios NKB-ir no ARC. As micrografias representativas dos 4 grupos experimentais, Intact; ORX; ORX+T e ORX+DHT, são apresentadas na figura 7(A-D). O número de neurônios positivos para NKB de ratos tratados com andrógenos, visto pelos grupos ORX+T e ORX+DHT, aparece reduzido em relação aos grupos ORX e Intact ($P < 0,001$) (Fig. 6-E). Diferentemente das fêmeas, não encontramos correlação entre o número de neurônios NKB-ir no ARC e a TST (Fig. 6-F).

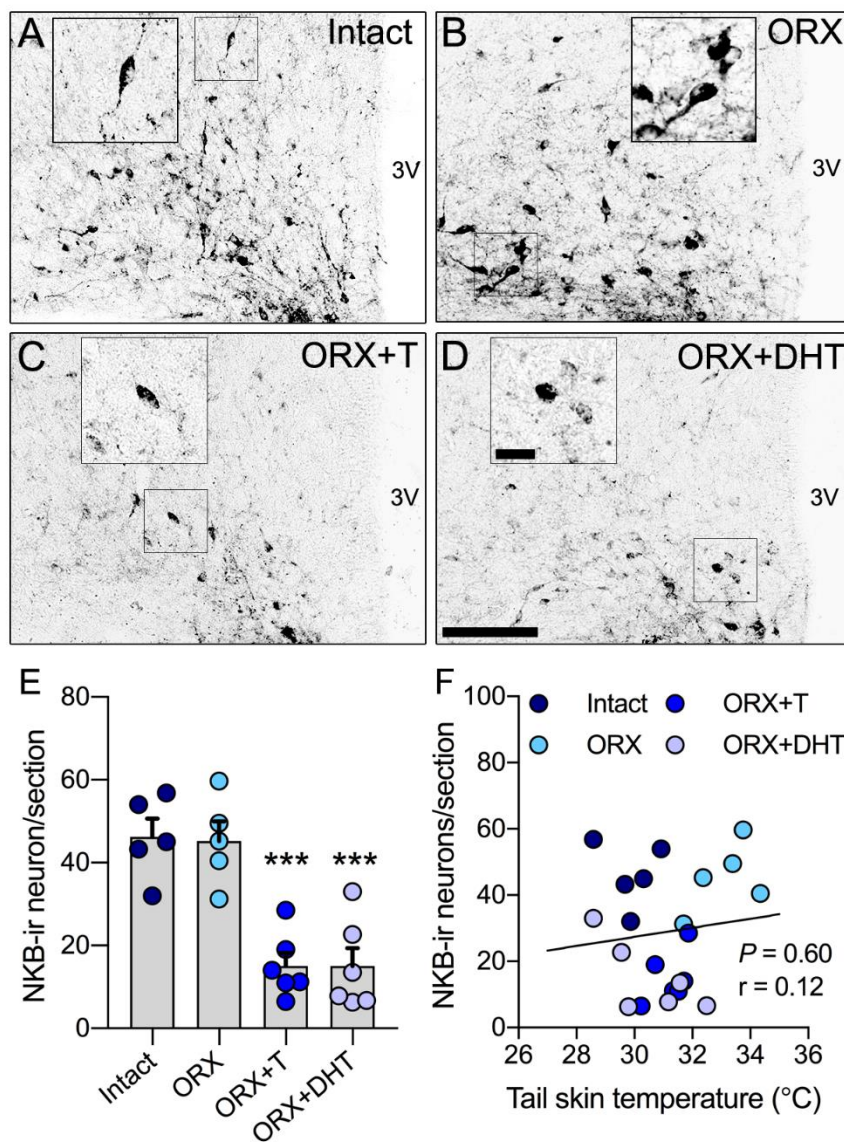


Figura 7: Inibição de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) de ratos orquiectomizados (ORX) tratados com andrógenos. (A-D) Ratos foram mantidos Intactos (Intact; n = 5); ou foram orquiectomizados e tratados durante 7 dias com injeção subcutânea (s.c.) de óleo de milho (ORX; n = 5), testosterona (ORX+T; n = 6); ou dihidrotestosterona (ORX+DHT; n = 6). Marcação imunohistoquímica de NKB no ARC de ratos Intact (A), ORX

(B) e ORX+T (C) e ORX+DHT (D). (E) Número de neurônios por secção imunorreativos (i.r.) para NKB. *** $P < 0,001$ Intact; ORX versus ORX+T e ORX+DHT. (F) Correlação entre o número de neurônios NKB-ir e a temperatura da pele da cauda (TST). 3V, terceiro ventrículo. Escala 100 μm (A-C), 20 μm (maior aumento). Dados representados como média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Sidak.

O efeito da orquiectomia sobre diâmetro dos neurônios NKB-ir é exibido na figura 8. Fotomicrografias de cada grupo experimental, obtidas através de análise confocal de imunofluorescência para NKB no ARC de machos estão representadas na figura 8 (A – Intact; B – ORX; C – ORX+T e D – ORX+DHT). Nota-se que a depleção dos níveis andrógenos aumentou o diâmetro dos neurônios NKB em relação aos demais grupos ($P < 0,001$). O tratamento com T ou DHT preveniram igualmente este efeito. Encontramos também uma correlação positiva ($r = 0,69$; $P < 0,001$) entre o diâmetro de NKB -ir e TST, ou seja, quanto maior o tamanho do neurônio, maior a dissipação de calor.

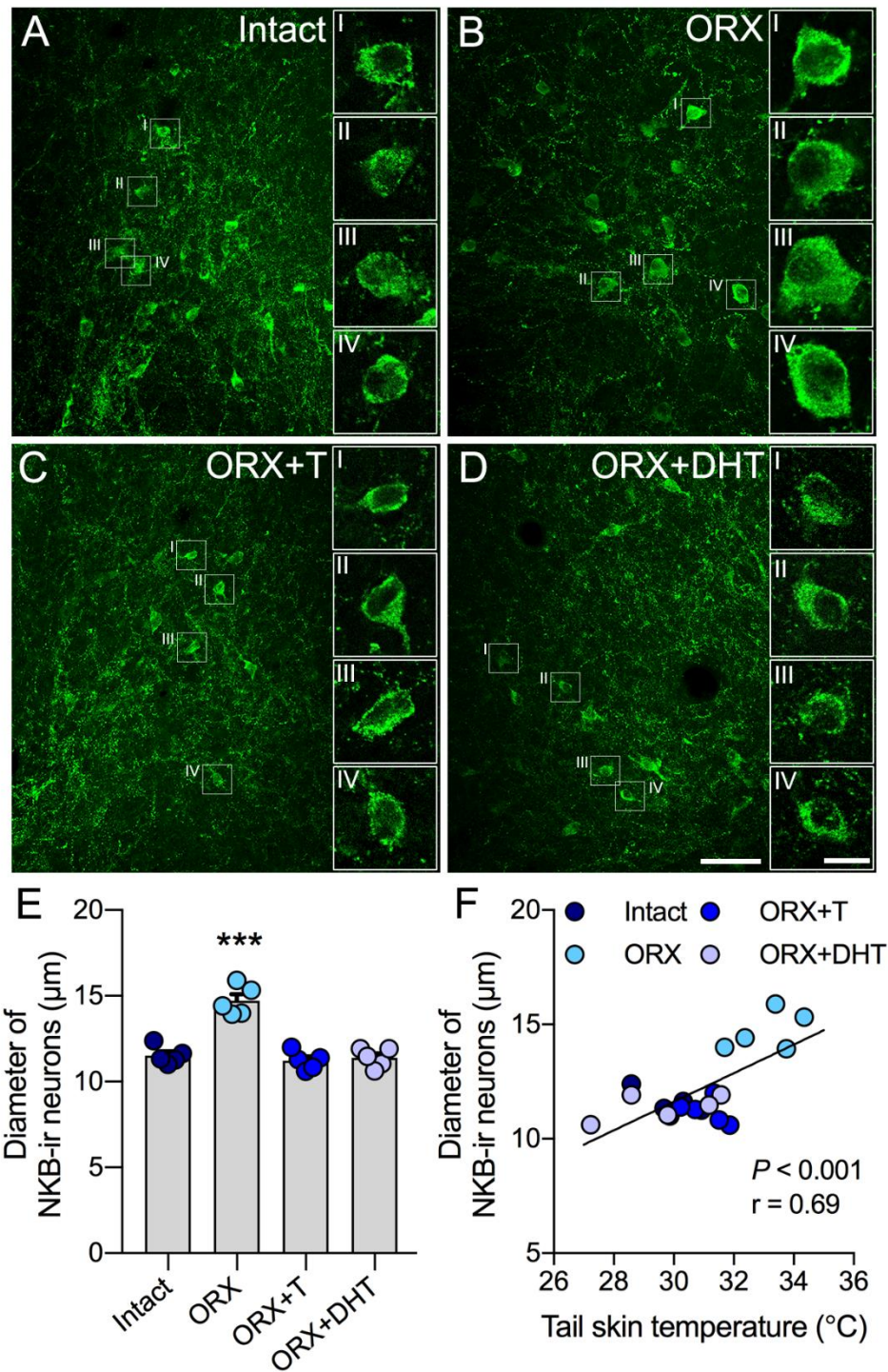


Figura 8: Aumento no diâmetro dos neurônios de neurocinina B (NKB) no núcleo arqueado (ARC) após a retirada dos andrógenos. (A-F). Ratos foram mantidos Intactos (Intact; n = 5); ou foram ORX e tratados durante 7 dias com injeção subcutânea (s.c.) de óleo de milho (ORX; n = 5), testosterona (ORX+T; n = 6) ou di-hidrotestosterona (ORX+DHT; n = 6). (A-D) Imagens confocais Z-stack ilustram neurônios (ir) para NKB no ARC de ratos de e ratos Intact (A), ORX (B) e ORX+T (C) e ORX+DHT (D). (E) Diâmetro de neurônios imunorreativos (ir) para NKB. ***P < 0,001 ORX comparado aos demais grupos. (F) Correlação positiva (r = 0,69; P < 0,001) entre o diâmetro de neurônios (ir) para NKB e temperatura da pele da cauda (TST). Escala 50μm (A-C), 10μm (maior aumento). Dados representados como média ± SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste Sidak.

Experimento 2: Efeito da castração sobre a expressão gênica de NKB, em ratas e ratos gonadectomizados

Diante dos dados obtidos anteriormente, a gonadectomia foi capaz de aumentar o diâmetro dos neurônios NKB-ir tanto em fêmeas quanto em machos. Então o próximo passo foi avaliarmos o efeito dos esteroides sexuais na expressão gênica desse neuropeptídeo no ARC de ratos machos e fêmeas, e o resultado está exibido na figura 9. Nas fêmeas, não houve diferença nos níveis de RNAm de *Nkb* entre ratas INT e OVX, entretanto o tratamento com E₂ nas ratas OVX+E₂ reduziu os níveis de *Nkb* em relação aos demais grupos ($P < 0,05$). De maneira similar, nos machos a orquiectomia também não alterou a expressão de *Nkb* no ARC de ratos ORX em comparação aos animais intactos, mas os tratamentos com T e DHT nos grupos ORX+T e ORX+DHT, respectivamente, reduziram significativamente os níveis de RNAm de *Nkb* em relação aos ratos INT e ORX ($P < 0,05$).

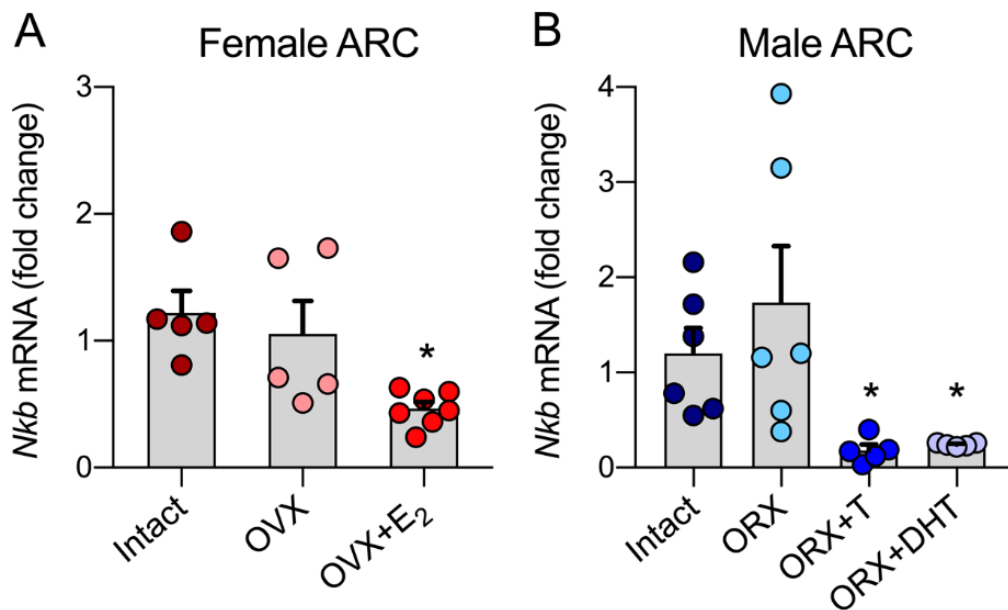


Figura 9: Esteroides gonadais reduzem RNAm para NKB no ARC de fêmeas e machos. As fêmeas com ciclo estral regular foram utilizadas na fase de diestro (Intact; n = 5) ou foram ovariectomizadas (OVX) e tratadas através de implantes de cápsulas subcutâneas (s.c.) contendo óleo de milho (OVX; n = 5) ou 17 β - E₂ (OVX+ E₂; n = 7). Os machos foram mantidos Intactos (Intact; n = 6); ou foram orquiectomizados (ORX) e tratados durante 7 dias com injeção subcutânea (s.c.) de óleo de milho (ORX; n = 6), testosterona (ORX+T; n = 5) ou di-hidrotestosterona (ORX+DHT; n = 5;). O experimento foi realizado 15 dias após a gonadectomia. (A) Expressão gênica para NKB em fêmeas. * $P < 0,05$ Intact; ORX versus OVX+ E₂. (B) Expressão gênica para NKB em machos. * $P < 0,05$ Intact; ORX versus ORX+T e ORX+DHT. Dados representados como média \pm SEM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste Sidak.

Discussão

Para avaliarmos os efeitos da gonadectomia sobre a dissipação de calor e a participação dos neurônios KNDy nesta resposta, realizamos a castração de ratos machos e fêmeas, posteriormente mensuramos a TST e avaliamos a expressão de NKB do ARC desses animais. Constatamos que, a retirada dos hormônios gonadais E₂, T e DHT, causa aumento da dissipação de calor pela cauda, sendo os primeiros a mostrar este fenômeno em machos. Ademais, ao avaliarmos a expressão do peptídeo NKB, encontramos aumento no número de neurônios (ir) para NKB em fêmeas, após a ovariectomia; e ainda, aumento do diâmetro desses neurônios, efeito este positivamente correlacionados ao aumento da TST, evidenciando a participação do E₂ sobre a via de dissipação de calor. Já em machos, diferentemente das fêmeas, a orquiectomia não alterou o número de neurônios imunorreativos para NKB em relação ao grupo Intact, porém, o tratamento com andrógenos foi capaz de reduzir este parâmetro em relação aos grupos Intact e ORX. No entanto, o grupo ORX apresentou um aumento significativo no diâmetro desses neurônios, em relação aos demais grupos dados estes também correlacionados positivamente com o aumento da TST. À análise de RT-PCR em tempo real mostrou que os esteroides gonadais E₂, T e DHT reduzem a expressão gênica de NKB em relação aos animais intactos e gonadectomizados. Em conjunto, os dados deste trabalho apoiam a hipótese da participação dos neurônios KNDy sobre a dissipação de calor em resposta à retirada dos hormônios gonadais, tanto em machos quanto em fêmeas.

Embora descrito na literatura que o E₂ atua reduzindo a ingestão alimentar e como consequência, reduzindo o peso corporal (50, 51), neste trabalho não encontramos diferença significativa no peso corporal entre animais OVX e OVX+ E₂, dados semelhantes àquele visto por Marques et al, 2017 (52). No entanto, o grupo OVX apresentou aumento de peso em relação aos animais Intact. Dados anteriores (53, 54) mostram que a modulação do peso corporal de fêmeas, pelo E₂ é dependente da dose, o que nos leva a crer que, a dose que utilizamos neste trabalho foi capaz de prevenir parcialmente o ganho de peso, uma vez que o grupo OVX+ E₂ também não se difere do grupo Intact.

Utilizamos a medida de VO₂ com intuito de avaliar se a ovariectomia é capaz de alterar o metabolismo basal, no entanto, não encontramos diferenças entre os grupos analisados, dados consistentes com a literatura (52). Ratas OVX têm a redução do peso uterino e aumento da concentração plasmática de LH, assim como já descrito pelo nosso grupo de pesquisa (41), efeitos estes, prevenidos com o tratamento com E₂, validando o tratamento hormonal com E₂.

Independentemente da temperatura ambiente de exposição, a regulação da temperatura corporal em ratos e humanos, se dá através da Integração de mecanismos comportamentais e autonômicos, como por exemplo, a ativação de vias de dissipação de calor através da vasodilatação cutânea (55, 56). No entanto, dados da literatura evidenciam que a redução dos níveis de E₂, em mulheres, durante a peri e pós-menopausa é capaz de causar um distúrbio na termorregulação hipotalâmica, gerando os *hot flashes*(57). Tendo em vista que a vasodilatação cutânea é um sintoma marcante nos episódios de *hot flash*, estudos anteriores utilizaram este parâmetro para desenvolver modelos animais para estudar este fenômeno. Em ratos, a cauda é a caracterizada por uma elevada razão superfície/volume, ausência de pelos, densa rede de vasos sanguíneos sendo por isto especializada na troca de calor com o meio ambiente(48). Sendo assim, ao medirmos a temperatura da pele da cauda, estamos mensurando indiretamente a dissipação de calor (49, 58).

Fêmeas mantidas à temperatura ambiental de 24°C, a TST aparece aumentada, no grupo OVX, em relação aos demais grupos, Intact e OVX+ E₂, indicando aumento de dissipação de calor pela pele da cauda, similar ao visto em trabalhos prévios (41, 54). Williams et al.(58), ao avaliarem a dissipação de calor pela cauda, observaram que durante a noite do proestro, fase de maior concentração de E₂, a TST aparece reduzida, e o tratamento com E₂ de ratas OVX também reduz TST. Em nosso trabalho, obtivemos dados semelhantes, uma vez que, o tratamento com E₂ reduziu a TST à valores semelhantes aos animais em diestro (Intact), corroborando então, com dados anteriores da literatura, o que reforça a ideia de que esta resposta de vasodilatação é secundária à retirada abrupta do esteroide gonadal. Ao avaliarmos Tabd, não encontramos diferenças entre os grupos estudados, assim como visto anteriormente (39, 58). Dacks et al.(59), provaram a hipótese de que a retirada do E₂ ativaria a vasodilatação da pele da cauda em temperaturas ambientes mais baixas, deslocando a zona termoneutra. Em conjunto, os dados da TST e Tabd encontrados neste trabalho, apoiam essa hipótese de que as vias termorreguladoras hipotalâmicas, na ausência do E₂, estão “mais sensíveis”, desencadeando a ativação de efetores de dissipação de calor (39, 60).

A estreita relação temporal entre os pulsos de LH e os *hot flashes* sugere que o gatilho para este fenômeno envolve a secreção pulsátil de GnRH e às vias que controlam efetores de dissipação de calor. Os neurônios KNDy parecem ser mediadores da resposta térmica à retirada de esteroides gonadais. Neste trabalho, observamos aumento do número de neurônios imunorreativos para NKB após a ovariectomia, e também aumento do tamanho destes neurônios, demonstrando uma hipertrofia dos neurônios KNDy pós castração em modelo de

roedores, dados estes que corroboram com achados anteriores em mulheres na pós-menopausa e macacas OVX (26), o que sugere o aumento da atividade dos neurônios KNDy após a retirada do E₂. Rance e Young, (24) mostraram que, em mulheres na pós-menopausa os neurônios hipertrofiados apresentavam aumento da expressão genica para NKB. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa, também observou esse aumento na expressão gênica de NKB em ratas OVX (33), dados que contradizem os achados deste trabalho, onde não observamos alteração na expressão gênica de NKB após a ovariectomia, no entanto, o tratamento com E₂ levou à redução deste parâmetro, em relação aos animais OVX e Intact. Os achados de Rance et al.(33), foram obtidos a partir de hibridização *in situ* e o tempo de tratamento foi de 2 meses, enquanto que, neste trabalho, utilizamos PCR-RT e os animais foram tratados por 2 semanas. Sendo assim, as técnicas utilizadas e o tempo de tratamento, poderiam vir a justificar a divergência nos resultados. Navarro et al. (61) ao avaliarem RNAm total para NKB, constaram o efeito inibitório do E₂ sobre a expressão gênica, similar ao visto neste trabalho, ademais, a expressão de NKB varia ao longo do ciclo estral, e; parece estar mais baixa durante na tarde do proestro, quando os níveis circulantes de E₂ estão altos. Como neste trabalho utilizamos animais intactos durante a fase diestro do ciclo estral, fase com baixos níveis de E₂, não encontramos diferença significativa entre o grupo Intact e OVX; diante do exposto, talvez se tivéssemos utilizado animais em proestro, poderíamos ter encontrado resultados diferentes do aqui expostos.

Diferentemente das mulheres, em homens, a queda dos hormônios gonadais ocorre de maneira gradual (62), o que contribui para o não aparecimento dos *hot flashes*. No entanto, pacientes durante o tratamento de câncer de próstata, apresentam alta incidência de sintomas vasomotores (11), o que nos levou a investigar o surgimento do fenômeno também em machos. Neste trabalho, a orquiectomia não alterou o peso corporal dos animais. Já é sabido que, a redução dos níveis de T ocasiona a diminuição do peso corporal uma vez que, ocorre perda de massa muscular (63), no entanto, a T também é capaz de aumentar a adiposidade (64), efeitos estes, dependentes do tempo de castração(65). Como nossos experimentos foram feitos após 15 dias de castração, o tempo poderia justificar a falta de diferença significativa, mas como não avaliamos massa muscular e adiposidade, não podemos discorrer do efeito da T sobre o peso corporal.

Como esperado, a orquiectomia reduziu o peso da vesícula seminal, próstata e aumentou os níveis de LH, efeitos estes, todos prevenidos pelo tratamento com andrógenos, a níveis semelhantes aos animais intactos, sugerindo que a dose utilizada é compatível aos níveis fisiológicos. Ademais, nossos dados revelam que, de maneira similar ao que vimos em fêmeas,

a retirada dos hormônios gonadais não alterou VO₂, assim como visto anteriormente por Marques et al.(66), o que sugere que a orquiectomia não altera o metabolismo basal, após o período estudado .

De maneira inédita, mostramos que a retirada dos hormônios gonadais, T e DHT ocasionou o aumento da TST dos animais, indicando aumento da dissipação de calor induzida pela retirada abrupta dos esteroides. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Yuzurihara et al. (67) os quais induziram o aumento da TST usando CGRP, e notaram que, ratos ORX apresentaram maior TST do que ratos tratados com placebo, e a T foi capaz de prevenir esse quadro. Até o dado momento, não há pesquisas que avaliaram a TST em diferentes temperaturas em machos. Partindo do pressuposto que, assim como em fêmeas, a retirada dos hormônios gonadais também desloca da zona termoneutra para temperaturas mais baixas, e observando os dados encontrados neste trabalho, podemos sugerir que, em machos as vias de dissipação de calor também são ativadas a partir da exposição à temperaturas mais baixas, quando comparadas aos animais tratados com T ou DHT. Isto evidencia a participação dos esteroides gonadais no controle da temperatura corporal. Não encontramos diferença em relação aos grupos estudados quando avaliamos Tabd, dados condizentes com vistos anteriormente (66).

Ao avaliarmos o número de neurônios - ir para NKB no ARC, não encontramos diferença entre os animais Intact e ORX. No entanto, o tratamento com T e DHT foi capaz de reduzir o número de NKB em relação aos animais ORX. Embora não tenha correlação entre neurônios NKB-ir e TST, a imunohistoquímica revelou o aumento do diâmetro desses mesmos neurônios após a castração, e a reposição hormonal foi eficiente para prevenir esse quadro. A partir desses dados, encontramos uma correlação positiva entre diâmetro de neurônios NKB-ir e TST, sugerindo que, em machos, nessas circunstâncias, a hipertrofia dos neurônios seria o melhor parâmetro para avaliar a ação dos esteroides sexuais no mecanismo de feedback.

Por fim, avaliamos a expressão gênica de *Nkb*, e similar ao que vimos em fêmeas, redução dos hormônios gonadais, resultante da castração, não altera a expressão de RNAm para *Nkb* em relação aos animais Intact, no entanto, o tratamento tanto com T quanto com DHT reduziu a expressão gênica de *Nkb*. Danzer et al (35) utilizando hibridização *in situ*, observaram o aumento da expressão gênica de NKB no ARC de animais ORX em relação ao grupo Intact e tratado com T, dados que corroboram parcialmente com os nossos. Tal divergência pode ser justificada pelo uso de técnicas diferentes, e o tempo de duração do tratamento, o qual foi mais longo que o utilizado em nosso estudo.

Conclusões

Os esteroides gonadais, E₂, em fêmeas; T e DHT, em machos, participam da dissipação de calor pela cauda, e são capazes de gerar alterações sobre os neurônios NKB-ir. Nossos dados evidenciam o efeito inibitório dos esteroides gonadais sobre a expressão gênica de *Nkb*, tanto em machos, quanto em fêmeas, além de sugerir que o mecanismo neuroendócrino que desencadeia o fenômeno de *hot flashes* depende da ativação dos neurônios KNDy em ambos os sexos, sendo a hipertrofia destes neurônios o índice mais fidedigno de seu aumento de função em condições de deficiência de esteroides sexuais.

Referências

1. J. F. Randolph *et al.*, Change in Estradiol and Follicle-Stimulating Hormone across the Early Menopausal Transition: Effects of Ethnicity and Age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 1555-1561 (2004).
2. M. R. Soules *et al.*, Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril* **76**, 874-878 (2001).
3. D. T. Baird, A. Guevara, Concentration of unconjugated estrone and estradiol in peripheral plasma in nonpregnant women throughout the menstrual cycle, castrate and postmenopausal women and in men. *J Clin Endocrinol Metab* **29**, 149-156 (1969).
4. L. Dennerstein, E. C. Dudley, J. L. Hopper, J. R. Guthrie, H. G. Burger, A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* **96**, 351-358 (2000).
5. R. R. Freedman, Menopausal hot flashes: mechanisms, endocrinology, treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* **142**, 115-120 (2014).
6. N. Santoro, C. N. Epperson, S. B. Mathews, Menopausal Symptoms and Their Management. *Endocrinol Metab Clin North Am* **44**, 497-515 (2015).
7. F. Kronenberg, Menopausal hot flashes: a review of physiology and biosociocultural perspective on methods of assessment. *J Nutr* **140**, 1380s-1385s (2010).
8. F. Kronenberg, Hot flashes: epidemiology and physiology. *Ann N Y Acad Sci* **592**, 52-86; discussion 123-133 (1990).
9. J. Whiteley, M. DiBonaventura, J. S. Wagner, J. Alvir, S. Shah, The impact of menopausal symptoms on quality of life, productivity, and economic outcomes. *J Womens Health (Larchmt)* **22**, 983-990 (2013).
10. W. H. Utian, The true clinical features of postmenopause and oophorectomy, and their response to oestrogen therapy. *S Afr Med J* **46**, 732-737 (1972).
11. P. Karling, M. Hammar, E. Varenhorst, Prevalence and duration of hot flashes after surgical or medical castration in men with prostatic carcinoma. *J Urol* **152**, 1170-1173 (1994).
12. I. V. Tataryn, D. R. Meldrum, K. H. Lu, A. M. Frumar, H. L. Judd, LH, FSH and skin temperature during the menopausal hot flash. *J Clin Endocrinol Metab* **49**, 152-154 (1979).
13. R. F. Casper, S. S. Yen, M. M. Wilkes, Menopausal flushes: a neuroendocrine link with pulsatile lutenizing hormone secretion. *Science* **205**, 823-825 (1979).
14. C. A. Christian, S. M. Moenter, The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* **31**, 544-577 (2010).
15. I. J. Clarke, Hypothalamus as an endocrine organ. *Compr Physiol* **5**, 217-253 (2015).
16. E. Hrabovszky *et al.*, Estrogen Receptor- β Immunoreactivity in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons of the Rat Brain. *Endocrinology* **142**, 3261-3264 (2001).
17. R. B. Simerly, L. W. Swanson, C. Chang, M. Muramatsu, Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology* **294**, 76-95 (1990).
18. T. M. Wintermantel *et al.*, Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* **52**, 271-280 (2006).
19. J. T. Smith *et al.*, Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* **146**, 2976-2984 (2005).
20. C. V. V. Helena *et al.*, Changes in α -estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *Journal of Endocrinology* **188**, 155-165 (2006).

21. V. M. Navarro *et al.*, Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* **29**, 11859-11866 (2009).
22. X. Liu, K. Lee, A. E. Herbison, Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* **149**, 4605-4614 (2008).
23. J. T. Smith, M. J. Cunningham, E. F. Rissman, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. *Endocrinology* **146**, 3686-3692 (2005).
24. N. E. Rance, W. S. Young, 3rd, Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalami of postmenopausal women. *Endocrinology* **128**, 2239-2247 (1991).
25. T. W. Abel, M. L. Voytko, N. E. Rance, The effects of hormone replacement therapy on hypothalamic neuropeptide gene expression in a primate model of menopause. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2111-2118 (1999).
26. A. M. Rometo, S. J. Krajewski, M. L. Voytko, N. E. Rance, Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2744-2750 (2007).
27. N. E. Rance, S. V. Uswandi, N. T. McMullen, Neuronal hypertrophy in the hypothalamus of older men. *Neurobiology of Aging* **14**, 337-342 (1993).
28. C. N. Jayasena *et al.*, Neurokinin B administration induces hot flushes in women. *Sci Rep* **5**, 8466 (2015).
29. J. K. Prague *et al.*, Neurokinin 3 receptor antagonism as a novel treatment for menopausal hot flushes: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **389**, 1809-1820 (2017).
30. J. K. Prague *et al.*, Neurokinin 3 receptor antagonism rapidly improves vasomotor symptoms with sustained duration of action. *Menopause* **25**, 862-869 (2018).
31. C. J. Gordon, Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* **47**, 963-991 (1990).
32. I. Baeza, N. M. De Castro, L. Giménez-Llort, M. De la Fuente, Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* **219**, 90-99 (2010).
33. N. E. Rance, T. R. Bruce, Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* **60**, 337-345 (1994).
34. T. L. Dellovade, I. Merchenthaler, Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **145**, 736-742 (2004).
35. S. C. Danzer, R. O. Price, N. T. McMullen, N. E. Rance, Sex steroid modulation of neurokinin B gene expression in the arcuate nucleus of adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res* **66**, 200-204 (1999).
36. M. Yuzurihara *et al.*, Prevention by 17 β -estradiol and progesterone of calcitonin gene-related peptide-induced elevation of skin temperature in castrated male rats. *Urology* **64**, 1042-1047 (2004).
37. S.-H. Yeo, A. E. Herbison, Projections of Arcuate Nucleus and Rostral Periventricular Kisspeptin Neurons in the Adult Female Mouse Brain. *Endocrinology* **152**, 2387-2399 (2011).
38. K. Nakamura, S. F. Morrison, A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* **11**, 62-71 (2008).
39. P. A. Dacks, S. J. Krajewski, N. E. Rance, Activation of neurokinin 3 receptors in the median preoptic nucleus decreases core temperature in the rat. *Endocrinology* **152**, 4894-4905 (2011).

40. M. A. Mittelman-Smith, H. Williams, S. J. Krajewski-Hall, N. T. McMullen, N. E. Rance, Role for kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons in cutaneous vasodilatation and the estrogen modulation of body temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19846-19851 (2012).
41. C. S. Fonseca *et al.*, Norepinephrine modulation of heat dissipation in female rats lacking estrogen. *J Neuroendocrinol* **34**, e13188 (2022).
42. A. B. Ribeiro *et al.*, Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol* **27**, 88-99 (2015).
43. P. Frappell, C. Lanthier, R. V. Baudinette, J. P. Mortola, Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *Am J Physiol* **262**, R1040-1046 (1992).
44. G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition*. C. E. A. P. San Diego, Ed., (2006).
45. J. F. Silva *et al.*, Estradiol Potentiates But Is Not Essential for Prolactin-Induced Suppression of Luteinizing Hormone Pulses in Female Rats. *Endocrinology* **161**, (2020).
46. C. V. Helena, R. E. Szawka, J. A. Anselmo-Franci, Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinising hormone secretion. *J Neuroendocrinol* **21**, 805-812 (2009).
47. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
48. A. A. Romanovsky, A. I. Ivanov, Y. P. Shimansky, Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol (1985)* **92**, 2667-2679 (2002).
49. M. A. Mittelman-Smith *et al.*, Arcuate Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Neurons Mediate the Estrogen Suppression of Gonadotropin Secretion and Body Weight. *Endocrinology* **153**, 2800-2812 (2012).
50. G. N. Wade, Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav* **8**, 523-534 (1972).
51. L. Asarian, N. Geary, Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* **42**, 461-471 (2002).
52. D. A. Marques *et al.*, Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats. *Pflugers Arch* **469**, 1277-1286 (2017).
53. D. J. Albert *et al.*, Serum estradiol concentration required to maintain body weight, attractivity, proceptivity, and receptivity in the ovariectomized female rat. *Physiol Behav* **49**, 225-231 (1991).
54. H. H. Berendsen, A. H. Weekers, H. J. Kloosterboer, Effect of tibolone and raloxifene on the tail temperature of oestrogen-deficient rats. *Eur J Pharmacol* **419**, 47-54 (2001).
55. E. Simon, Thermoregulation as a Switchboard of Autonomic Nervous and Endocrine Control. *The Japanese Journal of Physiology* **49**, 297-323 (1999).
56. P. Webb, The physiology of heat regulation. *Am J Physiol* **268**, R838-850 (1995).
57. R. R. Freedman, Biochemical, metabolic, and vascular mechanisms in menopausal hot flashes. *Fertil Steril* **70**, 332-337 (1998).
58. H. Williams, P. A. Dacks, N. E. Rance, An improved method for recording tail skin temperature in the rat reveals changes during the estrous cycle and effects of ovarian steroids. *Endocrinology* **151**, 5389-5394 (2010).

59. P. A. Dacks, N. E. Rance, Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. *Endocrinology* **151**, 1187-1193 (2010).
60. R. R. Freedman, Physiology of hot flashes. *American Journal of Human Biology* **13**, 453-464 (2001).
61. V. M. Navarro *et al.*, Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**, E202-210 (2011).
62. J. P. Deslypere, A. Vermeulen, Leydig cell function in normal men: effect of age, lifestyle, residence, diet, and activity. *J Clin Endocrinol Metab* **59**, 955-962 (1984).
63. V. Dubois *et al.*, Androgen Deficiency Exacerbates High-Fat Diet-Induced Metabolic Alterations in Male Mice. *Endocrinology* **157**, 648-665 (2016).
64. M. Baik *et al.*, Testosterone deficiency caused by castration increases adiposity in male rats in a tissue-specific and diet-dependent manner. *Genes & Nutrition* **15**, (2020).
65. J. W. Kakolewski, V. C. Cox, E. S. Valenstein, Sex differences in body-weight change following gonadectomy of rats. *Psychol Rep* **22**, 547-554 (1968).
66. D. A. Marques *et al.*, The role of testosterone in the respiratory and thermal responses to hypoxia and hypercapnia in rats. *Journal of Endocrinology* **247**, 101-114 (2020).
67. M. Yuzurihara *et al.*, Involvement of calcitonin gene-related peptide in elevation of skin temperature in castrated male rats. *Urology* **62**, 947-951 (2003).