

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Thatiane Vitoi Nascimento Ramalho

**EFEITO PROTETOR DA KISSPEPTINA NA PERDA ÓSSEA CAUSADA
PELA FALTA DE TESTOSTERONA EM RATOS**

Belo Horizonte – MG
Março - 2021

Thatiane Vitoi Nascimento Ramalho

**EFEITO PROTETOR DA KISSPEPTINA NA PERDA ÓSSEA CAUSADA
PELA FALTA DE TESTOSTERONA EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Coorientadora: Dra. Soraia Macari

Belo Horizonte – MG
Março – 2021

043 Ramalho, Thatiane Vitoi Nascimento.
Efeito protetor da kisspeptina na perda óssea causada pela falta de
testosterona em ratos [manuscrito] / Thatiane Vitoi Nascimento Ramalho. -
2021.
63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka. Co-orientadora: Dra. Soraia
Macari.

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

1. Farmacologia. 2. Kisspeptinas. 3. Osso e Ossos. 4. Testosterona. 5. Ratos. I.
Szawka, Raphael Escorsim. II. Macari, Soraia. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 537 DE THATIANE VITOI NASCIMENTO RAMALHO

Às 14:00 horas do dia 26 do mês de março de 2021, transmitida através de webconferência do Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Thatiane Vitoi Nascimento Ramalho**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Luciano José Pereira**, DSA/UFLA, **Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva**, Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Soraia Macari**, Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientadora, e **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Efeito Protetor da Kisspeptina na Perda Óssea Causada Pela Falta de Testosterona em Ratos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de março de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Tarcília Aparecida da Silva**, Professora do Magistério Superior, em 26/03/2021, às 16:54, 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 **Raphael Escorsim Szawka**, Professor do Magistério Superior, em 26/03/2021, às 16:56, 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 **Soraia Macari**, Professora do Magistério Superior, em 26/03/2021, às 16:58, 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 **Luciano José Pereira**, Usuário Externo, em 29/03/2021, às 09:52, 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 **0641171** e o código CRC **83F686EB**.

*Este trabalho é dedicado aos meus pais,
por darem-me todo amor do mundo,
e não medirem esforços para o meu crescimento.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus queridos pais, Graça e Edgar, pela dedicação, confiança e amor incondicional.

Ao meu irmão Thiago, e meus sobrinhos, por me darem suporte e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raphael Szawka, e coorientadora Profa Dr. Soraia Macari, por toda dedicação, paciência e confiança. Obrigada pela oportunidade de aprender com vocês.

A todos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo por me acolheram tão bem.

Aos professores da FISFAR pelo conhecimento compartilhado durante as aulas.

Aos funcionários e técnicos do ICB, em especial aos bioteristas, por serem tão atenciosos e prestativos.

Às meninas do grupo “kisspeptina” que, além de me auxiliarem, tornaram meus dias de trabalho mais leves.

Às minhas amigas de infância, Virgínia, Thais, Juliana, Fernanda e Carolina por sempre estarem comigo e fazerem parte das minhas melhores lembranças.

Aos amigos que BH me deu, Elder, Amanda e Vitor, por toda a amizade e por tornarem esses anos mais divertidos.

Às minhas amigas da faculdade, Alessandra e Keilla, por todo apoio e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

E sobretudo a Deus, que é sempre meu guia e porto seguro.

RESUMO

A kisspeptina é um importante peptídeo no controle das funções reprodutivas, sendo capaz de estimular os neurônios que expressam o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que por sua vez está diretamente relacionado com a secreção dos hormônios esteroidais. A deficiência dos esteroides sexuais, testosterona (T) e estradiol, está intimamente relacionada ao aumento no ritmo da remodelação óssea, causando perda óssea acentuada tanto em homens quanto em mulheres. Entretanto, a kisspeptina também parece exercer efeitos no tecido ósseo. Neste estudo, avaliamos o efeito da kisspeptina-10 (Kp10) na reabsorção óssea causada pela falta de T. Ratos adultos foram orquiectomizados (ORX) ou submetidos à cirurgia fictícia (Sham). Os ratos ORX receberam durante 30 dias tratamentos diários com Kp10, o seu antagonista kisspeptina-234 (Kp234), T, ou veículo. Foram analisados os parâmetros metabólicos, níveis plasmáticos hormonais, peso da próstata e vesícula seminal. As amostras de fêmur foram analisadas por microtomografia computadorizada (μ CT), histomorfometria e transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). O tratamento com Kp10 não causou alterações no metabolismo dos animais em comparação com o grupo Sham ou ORX tratado com veículo. O peso da próstata, da vesícula seminal bem como as concentrações de hormônio luteinizante, T, estradiol e prolactina no grupo ORX tratado com Kp10 mantiveram-se similar ao grupo ORX tratado com veículo. No fêmur, houve perda óssea trabecular nos ratos ORX e o tratamento com Kp10 preveniu este efeito de forma semelhante à T. Análise histológica demonstrou maior contagem de osteoblastos e menor número de osteoclastos nos grupos ORX tratados com Kp10 ou T do que nos ratos ORX. Estes efeitos da Kp-10 foram neutralizados pelo antagonista Kp234. Houve aumento de marcadores moleculares da remodelação óssea no grupo ORX, enquanto o tratamento com Kp10 restabeleceu a expressão de *Rankl*, *Opg* e *Runx2*. Entretanto, este efeito não foi bloqueado pela Kp234. Estes resultados demonstram que o tratamento com Kp10 é capaz de reverter a perda óssea provocados pela falta de T em modelo de ratos ORX. Este efeito parece ocorrer de forma independente das ações hormonais da kisspeptina e envolve modulação do número de osteoblastos e osteoclastos.

Palavras- chave: kisspeptina, osso, testosterona, gonadectomia, ratos.

ABSTRACT

Kisspeptin is an important peptide in controlling reproductive functions, being able to stimulate the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons, which in turn are directly related to the secretion of steroid hormones. Deficiency of the sex steroids, testosterone (T) and estradiol, is closely related to an increase in the rate of bone remodeling, causing marked bone loss in both men and women. However, kisspeptin also appears to exert effects on bone tissue. In this study, we evaluated the effect of kisspeptin-10 (Kp10) on bone resorption caused by lack of testosterone. Adult rats were either orchietomized (ORX) or subjected to sham surgery (Sham). ORX rats received for 30 days daily treatments with Kp10, its antagonist kisspeptin-234 (Kp234), T, or vehicle. Metabolic parameters, plasma hormone levels, prostate and seminal vesicle weight were analyzed. Femur samples were analyzed by computed microtomography (μ CT), histomorphometry, and reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Treatment with Kp10 caused no changes in the metabolism of the animals compared to Sham or ORX group treated with vehicle. The weight of the prostate, seminal vesicle as well as the concentrations of luteinizing hormone, testosterone, estradiol and prolactin in the Kp10-treated ORX group remained similar to the vehicle-treated ORX group. In the femur, there was trabecular bone loss in the ORX rats, and Kp10 treatment prevented this effect similarly to T. Histological analyses demonstrated higher osteoblast counts and fewer osteoclasts in the ORX groups treated with Kp10 or T than in ORX rats. These effects of Kp10 were counteracted by the antagonist Kp234. There was an increase in molecular markers of bone remodeling in the ORX group, whereas the treatment with Kp10 restored the expression of *Rankl*, *Opg* and *Run2*. However, this effect was not blocked by Kp234. These findings demonstrate that Kp10 treatment is able to reverse bone loss caused by lack of T in the ORX rat model. This effect seems to occur independently of the hormonal actions of kisspeptin and involves modulation in the number of osteoblasts and osteoclasts.

Key words: kisspeptin, bone, testosterone, gonadectomy, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão de <i>Kiss1r</i> no osso de ratos.....	24
Figura 2: Tratamento com Kp10 não altera ganho de peso e parâmetros metabólicos.....	35
Figura 3: Efeito do tratamento com Kp10 sobre o peso da próstata e da vesícula seminal.....	36
Figura 4: Tratamento com Kp10 em ratos ORX não alterou as concentrações de LH, testosterona, estradiol ou prolactina.....	37
Figura 5: Efeito do tratamento com Kp10 sobre a massa óssea trabecular do fêmur distal através de μ CT.....	39
Figura 6: Efeito do tratamento com Kp10 sobre massa óssea cortical do fêmur através de μ CT.....	41
Figura 7: Efeito do tratamento com Kp10 no número de osteoblastos e osteoclastos no fêmur.....	43
Figura 8: Efeito do tratamento com Kp10 sobre a expressão gênica de <i>Rankl</i> , <i>Opg</i> e <i>Runx2</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ CT	Microtomografia computadorizada
ALP	Fosfatase alcalina
AR	Receptor para androgênio
ARC	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
B.Ar	Área do osso
BMD	Densidade mineral óssea
BMPs	Proteínas morfogênicas ósseas
BMU	Unidade multicelular básica
B.Pm	Perímetro ósseo
BV	Volume do osso
c-Fms	Receptor fator estimulador de colônia-1
COL-1	Colágeno tipo I
DHT	Di-hidrotestosterona
DMO	Densidade mineral óssea
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptores para estrogênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FSH	Hormônios folículo estimulante
Gadph	Gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HE	Eosina e Hematoxilina
HPG	Hipotálamo-hipófise-gonadal
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina

IL	Interleucinas
Kiss1	Gene de kisspeptina
Kiss1r	Receptor de kisspeptina
KO	Knockout
Kp234	Antagonista de kisspeptina-234
Kp10	Kisspeptina-10
Kp13	Kisspeptina-13
Kp13	Kisspeptina-14
Kp54	Kisspeptina-54
LH	Hormônio luteinizante
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
OPG	Osteoprotegerina
ORX	Orquiectomizado
POA	Área preóptica
p.c	Peso corporal
PRL	Prolactina
PRT	Hormônio da paratireoide
PTHrP	Proteína relacionada ao PTH
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s.c.	Via subcutânea
SMI	Índice do modelo de estrutura
T.Ar	Área total
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
WT	Animais selvagens

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Tecido ósseo e remodelação óssea.....	15
2.2 Deficiência de esteroides sexuais masculinos e sua relação com o metabolismo ósseo	22
2.3 Kisspeptina: ações no eixo HPG e efeitos no osso	24
3. OBJETIVO	27
3.1 Objetivos específicos	27
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Desenho experimental.....	28
4.3 Anestésicos e drogas	28
4.4 Taxa metabólica de repouso.....	29
4.5 Orquiectomia	29
4.6 Microtomografia Computadorizada (μ CT).....	30
4.7 Processamento e análise histológica	30
4.8 Extração de mRNA e qPCR.....	31
4.9 Dosagens por ELISA	33
4.10 Análise estatística	35
5. RESULTADOS	35
5.1 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 sobre parâmetros metabólicos em ratos ORX	35
5.2 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 sobre os níveis séricos hormonais e sobre o peso da próstata e da vesícula seminal.....	37
5.3 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 na densidade óssea e estrutura do fêmur	40
5.4 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 no número de células ósseas no fêmur.....	43
5.5 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 sobre a expressão gênica de <i>Rankl</i> , <i>Opg</i> e <i>Runx2</i>	46
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO.....	56

1. INTRODUÇÃO

A literatura científica mostra que as concentrações séricas de testosterona em homens tendem a diminuir a partir dos 40 anos de idade e, aos 75 anos, essa queda hormonal pode atingir concentrações menores que dois terços em relação à testosterona plasmática encontrada aos 25 anos (HARING et al., 2010; KAUFMAN; VERMEULEN, 2005). A queda de testosterona pode desencadear uma patologia denominada osteoporose (ADLER, 2014; GOLDS; HOUDEK; ARNASON, 2017). Em mulheres, a ocorrência dessa patologia está intimamente relacionada com a menopausa, que acontece em torno dos 50 anos de idade, podendo variar entre 40 e 60 anos. Este quadro é caracterizado pelo envelhecimento reprodutivo marcado por um aumento progressivo dos níveis dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), juntamente com a diminuição sérica de estradiol (E2) (SANTORO et al., 1996; SEIFERT-KLAUSS et al., 2012).

A osteoporose é considerada um grave problema de saúde pública. As estimativas sobre a prevalência da doença apresenta grande variabilidade em ambos os sexos (DE LAET; POLS, 2000). A estimativa mais recente da prevalência de qualquer fratura por fragilidade, definida como o número de indivíduos portadores de deficiência, foi de 56 milhões em todo o mundo no ano 2000 (COOPER; FERRARI, 2019; JOHNELL et al., 2005; ZHANG; DENNISON; PRIETO-ALHAMBRA, 2020). A idade e a osteoporose são fatores independentes, entretanto estudo recente demonstrou que 34% do total das fraturas em mulheres e 35% em homens estão correlacionadas com o avanço da idade, redução dos hormônios sexuais na pós-menopausa e andropausa e baixa densidade mineral óssea (MAI et al., 2019). Na deficiência dos hormônios sexuais ocorre aumento da osteoclastogênese e menor formação de osteoblastos e osteócitos, provocando assim um desequilíbrio entre a formação e reabsorção ósseas com progressiva redução da mineralização e estrutura do tecido óssea com aumento do risco de fraturas (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013).

A kisspeptina é um neuropeptídeo chave no controle da reprodução e fertilidade, sendo capaz de estimular os neurônios responsáveis pela produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, conseqüentemente, a secreção de gonadotrofinas e esteroides gonadais (HARTER; KAVANAGH; SMITH, 2018). Deleções dos genes de kisspeptina (*Kiss1*) e seu receptor (*Kiss1r*) estão altamente implicadas com desenvolvimento de osteoporose (BROMMAGE et al., 2014). Ainda, a kisspeptina mostrou-se capaz de atuar na diferenciação de osteoblastos *in vitro* (SON et al., 2018) e dados recentes de nosso laboratório demonstram que a kisspeptina preveniu a redução da massa óssea observada em ratos obesos pelo tratamento com dieta hiperlipídica (HFD) (MACARI et al., 2018a).

Sendo assim, a hipótese avaliada neste estudo foi que a administração de kisspeptina 10 (Kp10) reduz a perda óssea induzida pela falta de testosterona em ratos submetidos à gonadectomia. Para isso, o presente trabalho utilizou a gonadectomia em ratos machos, como modelo experimental, capaz de mimetizar as principais características referentes à perda óssea associada à diminuição endógena dos esteroides sexuais em homens (MITTAN et al., 2002; ŚLIWIŃSKI et al., 2017; STEFFENS et al., 2014; WAKLEY et al., 1991).

Considerando-se a importância médica e sócio econômica da osteoporose associada à redução dos esteroides sexuais em homens e mulheres e a ação da kisspeptina em contrapor a reabsorção óssea, o presente estudo deve contribuir para o melhor entendimento dos efeitos ósseos da kisspeptina e os mecanismos fisiológicos envolvidos nesta nova função endócrina. Os resultados do presente trabalho demonstram que a kisspeptina é um neuropeptídeo capaz de atuar impedindo a degradação óssea causada pela falta de testosterona, através da modulação do número de células ósseas e de forma independente de seus efeitos sobre os hormônios reprodutivos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo e remodelação óssea

O tecido ósseo desempenha diversas funções no organismo, podendo-se citar três funções vitais, sendo elas a capacidade de fornecer suporte e local de fixação para os músculos, transformando suas contrações em movimentos úteis; oferecer proteção aos órgãos vitais, e atuar como órgão metabólico com grandes reservas de cálcio e fosfato. A composição óssea é estimada em 10% de células, 60% de cristais minerais (hidroxiapatita) e 30% de matriz orgânica. A matriz orgânica é constituída principalmente por fibras colágenas tipo I, glicosaminoglicanos, lipídios e outras proteínas. A hidroxiapatita é uma forma mineral natural composta por cálcio, fosfato inorgânico e hidroxila compondo pequenos cristais de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. (FENG; MCDONALD, 2011; WEINER; WAGNER, 1998).

O osso é um tecido poroso, anisotrópico e não homogêneo e, quando maduro, pode ser classificado como cortical ou trabecular, diferenciando principalmente com base na porosidade: o osso cortical tem uma porosidade de 5 a 15%, enquanto a porosidade do osso trabecular varia de 40 a 95% (MORGAN; UNNIKRSNAN; HUSSEIN, 2018). O osso cortical, também conhecido como compacto, é caracterizado por exercer função mecânica e protetora e, em geral, é encontrado na diáfise de ossos longos e circundando o osso trabecular, na metáfase e epífese. Esse tipo de osso é formado por estruturas cilíndricas conhecidas como ósteon, que consiste de um sistema haversiano que, por sua vez, é formado por lamelas cilíndricas dispostas ao redor dos canais de Havers. O osso trabecular, ou esponjoso, é encontrado principalmente no esqueleto axial e nas extremidades dos ossos longos e rígidos, seus poros são preenchidos com medula óssea, e sua função é principalmente metabólica, sendo considerado o principal local de remodelamento ósseo (FENG; MCDONALD, 2011; MORGAN; UNNIKRSNAN; HUSSEIN, 2018; WEINER; WAGNER, 1998).

O osso é um tecido biológico dinâmico e dentre seus componentes celulares estão os osteoclastos, osteoblastos e os osteócitos. Os osteoclastos são células gigantes formadas pelas junções de células tronco hematopoiéticas mononucleadas (TEITELBAUM, 2000) e podem ser identificados devido à suas características morfológicas e fenotípicas distintas atribuídas pela sua multinuclearidade, e por apresentarem expressão da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e catepsina K (TEITELBAUM; ROSS, 2003). Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea. Precusores de osteoclastos circulam no sangue direcionando-se para locais de remodelação óssea e são expostos a diversos fatores que estimulam sua fusão e diferenciação em osteoclastos multinucleados. A diferenciação e ativação dos precusores de osteoclastos na medula óssea dependem de fatores locais associados aos osteoblastos e algumas citocinas, como algumas interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF) (MACKIE, 2003; SIMS; GOOI, 2008). Em sua forma madura, os osteoclastos se aderem à matriz óssea com auxílio de uma proteína conhecida como integrina $\alpha\beta3$. Uma vez ligado ao osso, é gerado um ambiente extracelular isolado entre a célula e o tecido ósseo a partir de uma estrutura denominada zona de selagem. Cercado pela zona de selagem, há um ambiente conhecido como membrana franzida, especializado em promover a degradação óssea. O elemento básico da zona de selagem é o podossomo, caracterizado por um conjunto de adesão ao substrato à base de actina, e que também apresenta outras proteínas como a vinculina e a talina (FENG; MCDONALD, 2011; LEE, 2018; TEITELBAUM; ROSS, 2003).

A zona em escova, criada pelos osteoclastos, possui a capacidade de gerar um microambiente propício à promoção da digestão óssea, através da enzima catepsina K, quando em um ambiente acidificado. Esse ambiente posso ser chamado de lacuna de reabsorção. A alta presença de anidrase carbônica II nos osteoclastos promove a formação de ácido carbônico (H_2CO_3), gerando íons H^+ e íons bicarbonato (HCO_3^-). Essa reação possibilita a troca de HCO_3^- por Cl^- extracelular. Respectivamente, os íons H^+ e Cl^- são secretados pela bomba de prótons e

canais de cloreto, presentes na zona em escova, para a lacuna de reabsorção. Esse mecanismo resulta um pH próximo de 4,5. Esse ambiente ácido é ideal para a ativação das enzimas catepsinas K e TRAP que, por sua vez, hidrolisam as proteínas da matriz orgânica promovendo a reabsorção da massa óssea. Esse processo ocasiona erosões superficiais na matriz óssea chamadas lacunas de Howship (FENG; MCDONALD, 2011; KHOSLA; MELTON; RIGGS, 2001; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; TEITELBAUM, 2000).

Os osteoblastos, células formadoras de matriz orgânica, participam da diferenciação e ativação dos osteoclastos. As células osteoblásticas secretam o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), que se liga ao seu receptor fator estimulador de colônia-1 (c-Fms) presente na superfície dos precursores de osteoclastos (MUN; PARK; PARK-MIN, 2020). A sinalização de M-CSF induz a expressão do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), também presente na superfície dos precursores de osteoclastos que irá se ligar ao ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), promovendo a osteoclastogênese. O RANKL é uma citocina expressa por osteoblastos e leucócitos mediante a atuação de alguns fatores como a vitamina D ativa ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), hormônio da paratireoide (PTH), proteína relacionada ao PTH (PTHrP), interleucina-1 (IL-1) e TNF- α (BOYCE et al., 2012; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

Os osteoblastos são células mononucleadas com o núcleo esférico, possuem um citoplasma basófilo e um proeminente complexo de Golgi. Essas células são originadas a partir de células tronco osteoprogenitoras localizadas na medula óssea e no periósteo. Além de participarem de forma indireta na diferenciação e atividade de absorção óssea pelos osteoclastos via sistema RANK/RANKL/osteoprotegerina (OPG), os osteoblastos também atuam na deposição de massa óssea, que se faz através da secreção de componentes orgânicos da matriz óssea, gerando uma porção orgânica não mineralizada do tecido ósseo denominada osteoide. O osteoide é constituído principalmente por fibras de colágeno tipo I e também por

proteoglicanos, sulfato de condroitina e por outras proteínas. Essa porção não mineralizada, conseqüentemente, sofre mineralização atribuindo ao osso força e rigidez (DIRCKX et al., 2019). Os osteoblastos também podem agir na homeostase óssea expressando um receptor de citocina denominado OPG. A OPG pertence à família de receptores TNF, sendo capaz de atuar como receptor *decoy* solúvel de RANKL e, conseqüentemente, interrompendo a osteoclastogênese. Dessa forma, o sistema RANK/RANKL/OPG é via dominante que regula a diferenciação de osteoclastos e, conseqüentemente, o remodelamento ósseo (DIRCKX et al., 2019; PIETSCHMANN et al., 2016; UDAGAWA et al., 2020). Algumas proteínas produzidas pelos osteoblastos são consideradas marcadores de diferenciação e atividade osteoblástica, como a fosfatase alcalina (ALP), o colágeno tipo I (COL-I) e a osteocalcina (OCN) (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002). Alguns fatores de transcrição possuem ação atuando na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, como o osterix, *core-binding a1* (CBFA1) e *runt-related transcription factor 2* (RUNX2). Este último auxilia na regulação da expressão de genes que codificam osteocalcina, osteopontina, COL-I e RANKL, agindo assim na formação óssea (ERIKSEN, 2010; HARADA; RODAN, 2003).

Ao longo da linhagem osteoblástica diversos fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos afetam o desenvolvimento e maturação dos osteoblastos. Dentre esses fatores, nós podemos citar as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), a endotelina-1, prostaglandinas e também hormônios como PTH, E2 e testosterona (ERIKSEN, 2010). Os osteoblastos reduzem suas atividades de formação óssea quando maduros. Algumas dessas células permanecem nas superfícies periostais ou endostais, outras sofrem apoptose, mas uma parte dos osteoblastos se incorpora à matriz óssea e se diferenciam em osteócitos que, aos poucos, param de produzir matriz osteoide (BELLIDO, 2014; KITAURA et al., 2020).

Os osteócitos são caracterizados por apresentarem gradativa diminuição na quantidade de organelas, determinando uma menor atividade metabólica dessas células (DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013; IAIN H. KALFAS, 2001). Os osteócitos residem nas lacunas no interior da matriz óssea, conectadas por pequenos canais conhecidos como canalículos ósseos. De cada canalículo saem numerosos prolongamentos citoplasmático que se conectam, através de junções tipo gap, aos prolongamentos de osteócitos adjacentes, a osteoblastos, a células de revestimento ósseo, bem como com o endóstio e o perióstio. Essa estrutura comunicante é denominada rede lacunocanalicular dos osteócitos, possibilitando que mesmo aqueles osteócitos localizados nas porções profundas da massa óssea possam responder a modificações sistêmicas ou modificações na superfície óssea (BELLIDO, 2014; KITAURA et al., 2020). Essa rede possibilita a troca de íons e fornece oxigênio e nutrientes para a viabilidade dos osteócitos, sendo então responsável pela manutenção da vitalidade do tecido ósseo (DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013). As funções dos osteócitos não estão totalmente elucidadas, mas possivelmente essas células possuem papel multifuncional na orquestração do remodelamento ósseo como mecanotransdutores de sinais, sendo responsáveis por respostas adaptativas do osso à força mecânica e também agindo em vias de sinalização endócrina, como por exemplo, a dos receptores para PTH e estrogênio (DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013).

Os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, estão associados coordenadamente ao processo fisiológico denominado remodelamento ósseo. Este processo é realizado por uma estrutura funcional e anatômica conhecida como unidade multicelular básica (BMU) e, aparentemente, está relacionado a um limiar de tensão mecânica local que determina efeito resultante de deposição ou reabsorção óssea (FROST, 1991; SEEMAN, 2009). À medida que a BMU avança, o tecido ósseo é removido pelos osteoclastos e substituído por uma nova matriz óssea produzida por osteoblastos (MANOLAGAS, 2000). O arranjo da BMU é essencial para

o remodelamento ósseo, garantindo a homeostasia desse tecido. O mecanismo que envolve o remodelamento ósseo inicia-se com um estímulo, hormonal ou físico, que resulta no recrutamento de células hematopoiéticas em um local específico no tecido ósseo. Essas células diferenciam-se em osteoclastos, dando início à reabsorção óssea. Em seguida, células tronco mesenquimais e osteoprogenitoras são também recrutadas e diferenciadas em osteoblastos que, por sua vez, irão depositar o osteóide no local que sofreu a reabsorção. Finalmente, ocorre a mineralização do osteoide e conclusão do remodelamento ósseo (FENG; MCDONALD, 2011).

No processo de remodelação óssea há necessidade de um equilíbrio entre a reabsorção do osso e sua formação, mediada por osteoclastos e osteoblastos, respectivamente, afim de garantir que não haja grandes alterações na massa óssea após cada ciclo de remodelação. São diversos os mecanismos de sinalização envolvidos na remodelação óssea, e o desequilíbrio na proporção entre reabsorção e formação leva à remodelação óssea anormal, podendo ocasionar perda de massa ou densidade óssea quando a reabsorção se sobrepuser à deposição (IAIN H. KALFAS, 2001). Os processos fisiológicos envolvidos na remodelação óssea são importantes para a melhor compreensão da fisiopatologia das desordens ósseas, como por exemplo, a osteoporose. A osteoporose é um distúrbio comum de remodelação óssea, e pode ser definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa densidade mineral óssea (DMO) e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com consequente diminuição da resistência óssea e aumento do risco de fraturas (ANONYMOUS, 1993). Crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo ocorrem através de uma ação coordenada de deposição e reabsorção óssea garantindo a expansão (aposição periosteal do osso cortical) e alongamento (ossificação intramembranosa ou endocondral) do tecido desde a fase fetal até sua forma na fase adulta (WEAVER et al., 2016). A massa óssea alcançada na fase adulta é um importante determinante para a saúde óssea, uma vez que a partir desse momento o organismo para de acumular matriz óssea e, lentamente, tende a perder tecido ósseo. A perda óssea associada ao

envelhecimento é uma das principais causas de fraturas osteoporóticas em idosos (COOPER; FERRARI, 2019; PARFITT, 1984; WEAVER et al., 2016).

A osteoporose é um grave problema de saúde pública, afetando uma grande parcela da população em todo o mundo (HERNLUND et al., 2013). Há diversos fatores de risco associados às causas de fraturas em decorrência da osteoporose, dentre eles pode-se citar hipertireoidismo, alcoolismo, o tabagismo, bem como a deficiência de esteroides sexuais e o próprio envelhecimento (CUMMINGS et al., 1995). A perda óssea, em ambos os sexos, inicia-se geralmente logo após os 40 anos de idade. Nas mulheres, há uma rápida progressão da perda óssea nos 15-20 anos seguintes à menopausa, com importante papel da falta da produção de estrogênio pelas gônadas e predomínio de perda de osso trabeculado. A esta primeira etapa, segue-se uma fase lenta de perda óssea, que afeta tanto osso trabeculado quanto cortical, à semelhança da perda óssea associada ao envelhecimento em homens (RIGGS; KHOSLA; MELTON, 1998). Assim, nos homens, a redução da produção de testosterona e, conseqüentemente, a reabsorção óssea é lenta e progressiva e está associada ao declínio da secreção testicular de testosterona (RIGGS; KHOSLA; MELTON, 1998).

Sendo assim, a deficiência dos hormônios sexuais está intimamente relacionada ao aumento no ritmo da remodelação óssea e, conseqüentemente, predispõem à osteoporose (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013). Muitos estudos apontam os hormônios esteroides, em especial os estrogênios, como importantes reguladores do metabolismo ósseo tanto em mulheres quanto em homens (ALMEIDA et al., 2010; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013; NAKAMURA et al., 2007; RIGGS; KHOSLA; MELTON, 1998).

Manologas e colaboradores (1993) propuseram que o principal mecanismo de ação do estrogênio na prevenção da perda óssea se dá por meio da inibição da osteoclastogênese. Em 2013, esse mesmo grupo sugeriu que a inibição da osteoclastogênese associava-se à diminuição da resposta dos precursores de osteoclastos ao RANKL (MANOLAGAS; O'BRIEN;

ALMEIDA, 2013). O estrogênio também pode agir diminuindo a produção de osteoclastos por suprimir a produção de citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α (LORENZO et al., 1998; MANOLAGAS; JILKA, 1995), que estão relacionadas à produção de RANKL e M-CSF pelos osteoblastos (SRIVASTAVA et al., 1998). Outra ação antiosteoclastogênica do estrogênio inclui a produção de OPG, a qual impediria a conexão RANK/RANKL e, conseqüentemente, a formação de osteoclastos e reabsorção óssea (SATTLER et al., 2004). Os efeitos dos estrogênios e androgênios no osso são exercidos mediante ligação com alta afinidade aos receptores para estrogênio (ER) α e ER β e ao receptor para androgênio (AR), respectivamente (MANOLAGAS; KOUSTENI; JILKA, 2002; VICO; VANACKER, 2010). Esses hormônios são capazes de agir nas células hematopoiéticas e mesenquimais, atuando assim na diferenciação de osteoblastos e osteoclastos respectivamente, agindo também de maneira direta em ambas as células quando maduras e ainda nos osteócitos (ALMEIDA et al., 2017; MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013). A osteoporose também é um efeito da terapia de privação de andrógenos, empregada no tratamento oncológico de câncer de próstata em homens, destacando-se assim a relevância clínica da testosterona na saúde óssea (DIAMOND et al., 2004).

2.2 Deficiência de esteroides sexuais masculinos e sua relação com o metabolismo ósseo

O principal hormônio androgênico circulante no organismo masculino é a testosterona, que é secretada majoritariamente pelos testículos. A testosterona, por sua vez, tem sua produção dependente do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG). O hipotálamo, considerado a estrutura regulatória central do eixo HPG, possui neurônios, localizados principalmente na área préóptica (POA), que são capazes de sintetizar GnRH. Este hormônio age sobre a adeno-hipófise estimulando a produção das gonadotrofinas FSH e LH (CLARKE, 2015). As gonadotrofinas estimulam as gônadas, ovários e testículos, a produzirem os gametas e hormônios esteroides sexuais. Nos homens, o FSH atua sobre as células de Sertoli, localizadas nos túbulos seminíferos, e o LH atua sobre as células intersticiais de Leydig, estimulando-as a produzirem

testosterona. Este esteroide atua no efeito de retroalimentação negativa no hipotálamo e na adeno-hipófise regulando o eixo HPG (BAGATELL; BREMMER, 1996; CLARKE, 2015). Os andrógenos nos machos, ainda no período fetal, já exercem sua função na diferenciação sexual e desenvolvimento das genitálias e estruturas sexuais acessórias. Na puberdade, a testosterona volta a ser produzida pelos testículos, reativando o desenvolvimento e a manutenção dos órgãos reprodutivos, desenvolvendo as características sexuais secundárias e estimulando a produção de gametas e demais funções reprodutivas (HINES, 2011). A ação da testosterona nos diferentes tecidos pode ocorrer por três vias hormonais principais: 1) agindo como testosterona através da ligação do hormônio ao AR, 2) agindo como di-hidrotestosterona (DHT), após a ação da enzima 5α -redutase atuando, também via ativação de AR; e 3) agindo como 17β -estradiol (E2), após conversão pela enzima aromatase através da ativação de ER (VANDERSCHUEREN et al., 2014).

O aumento no ritmo da remodelação óssea pode estar associado a baixos níveis de andrógenos nos homens (KATZNELSON et al., 1996). Todavia, 70% da perda óssea causada pela deficiência de andrógenos é consequência da baixa ação de estrogênios, que por sua vez, derivam da aromatização da testosterona no tecido ósseo (FALAHATI-NINI et al., 2000). Os hormônios androgênicos e estrogênicos influenciam na diferenciação de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Tais hormônios atuam promovendo equilíbrio na taxa de formação e reabsorção óssea devido a seu efeito pró-apoptótico sobre os osteoclastos e seu efeito anti-apoptótico nos osteoblastos e osteócitos (ALMEIDA et al., 2010; KAMEDA et al., 1997). Os esteroides sexuais são liberados na corrente sanguínea e podem atuar em células alvo por meio da ligação aos seus receptores intracelulares, sendo AR o receptor clássico para os andrógenos, e $ER\alpha$ e $ER\beta$ os receptores clássicos para estrogênios (MANOLAGAS; O'BRIEN; ALMEIDA, 2013). Dentre os três principais estrogênios encontram-se o E2, a estrona (E1) e o estriol (E3).

O E2 é o mais potente e sua conversão de testosterona para E2 é dependente da enzima aromatase, tanto em homens quanto em mulheres.

Em ratos machos castrados, o tratamento com testosterona previne a perda de osso trabeculado tibial (WAKLEY et al., 1991). Em camundongos machos, há evidências sugerindo que a deleção de AR resulta em aumento na reabsorção óssea, bem como diminuição do volume ósseo trabecular e cortical. Nestes animais, o tratamento com testosterona, que é aromatizável em E2, restabeleceu apenas parcialmente a perda óssea enquanto a DHT não apresentou efeito (KAWANO et al., 2003). Estes dados indicam que tanto a testosterona quanto o E2 atuam na manutenção da homeostasia óssea em machos. Em animais machos e fêmeas submetidos à castração, observa-se um aumento da apoptose de osteoblastos e osteócitos, confirmando o efeito deletério da deficiência dos hormônios sexuais sobre o ciclo de vida destas células (Kousteni et al., 2001).

2.3 Kisspeptina: ações no eixo HPG e efeitos no osso

Em 1996, Lee e seus colaboradores foram os primeiros autores a descrever os peptídeos kisspeptina, então denominados de metastina devido a sua atuação na supressão de metástase em células tumorais humanas, que se originam da expressão de gene localizado no cromossomo 1, sendo assim denominado como gene *Kiss1* (LEE et al., 1996). A tradução deste gene codifica um peptídeo inativo de 145 aminoácidos que, após serem clivados em fragmentos menores, assumem sua forma ativa e são classificados como kisspeptina-54 (Kp54), kisspeptina-14 (Kp14), kisspeptina-13 (Kp13) e kisspeptina-10 (Kp10), por possuírem 54, 14, 13 e 10 aminoácidos, respectivamente (KOTANI et al., 2001; OHTAKI; SHINTANI; HONDA, 2001).

A kisspeptina exerce sua função ligando-se ao receptor acoplado à proteína G denominado inicialmente de GPR54 e atualmente reconhecido como Kiss1r (KOTANI et al., 2001; OHTAKI; SHINTANI; HONDA, 2001). Este receptor pode ser encontrado em diversos

tecidos, dentre eles os neurônios GnRH. Consistente com o fato de os neurônios kisspeptinérgicos projetarem-se para os neurônios GnRH, a kisspeptina exerce função estimulando a secreção de GnRH no sistema porta-hipofisário e, conseqüentemente, ativando o eixo HPG (GOTTSCHECH et al., 2004; NAVARRO et al., 2005a).

Os neurônios kisspeptinérgicos estão localizados, sobretudo, em duas regiões cerebrais: no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), localizado na POA, e no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (GOTTSCHECH et al., 2004). Em 2005, Smith e colaboradores (SMITH et al., 2005) observaram expressão de ER α e ER β em ambas populações de neurônios kisspeptinérgicos e demonstraram que roedores machos e fêmeas, submetidos à castração apresentavam maior perfil de expressão de mRNA de *Kiss1* no ARC e que esse aumento era suprimido após a administração de esteroides sexuais (NAVARRO et al., 2005a; SMITH et al., 2005). Estes achados foram precursores do entendimento atual de que os neurônios kisspeptinérgicos localizados no ARC medeiam o *feedback* negativo induzido por estrogênio no eixo HPG, enquanto tais neurônios localizados no AVPV medeiam o feedback positivo. Os esteroides sexuais possuem então efeito bimodal no hipotálamo regulando tanto negativamente quanto positivamente a expressão de *Kiss1*. Por conseguinte, os neurônios kisspeptinérgicos atuam nos mecanismos de retroalimentação exercidos por testosterona e E2 do eixo HPG (PINILLA et al., 2012).

Além de seu efeito crítico no controle do eixo gonadal, evidências recentes indicam o envolvimento da kisspeptina na regulação da remodelação óssea. Em estudo realizado por Son e colaboradores (SON et al., 2018), após tratar uma população de células tronco mesenquimais de camundongos com diferentes concentrações de Kp10, observou-se a diferenciação das mesmas em osteoblastos através da via de sinalização da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), indicando que a kisspeptina é capaz de promover a diferenciação de osteoblastos *in vitro*. Mais recentemente, Herber e colaboradores (HERBER et al., 2019) demonstraram que a

deleção seletiva de ER α dos neurônios kisspeptina do ARC promove aumento da densidade óssea em camundongos fêmeas, sugerindo que estes neurônios estão envolvidos no controle da homeostasia óssea pelo E2 de maneira sexo dependente. Em estudo recente de nosso grupo (MACARI et al., 2018a) foi encontrado que a kisspeptina é capaz de atuar diretamente em células ósseas para prevenir a perda óssea induzida por HFD em ratos obesos. Neste estudo, também foi observada a expressão de *Kiss1r*, mas não do gene *Kiss1*, no fêmur de ratos adultos, sendo a concentração de *Kiss1r* aumentada em ratos com obesidade induzida por HFD (Figura 1).

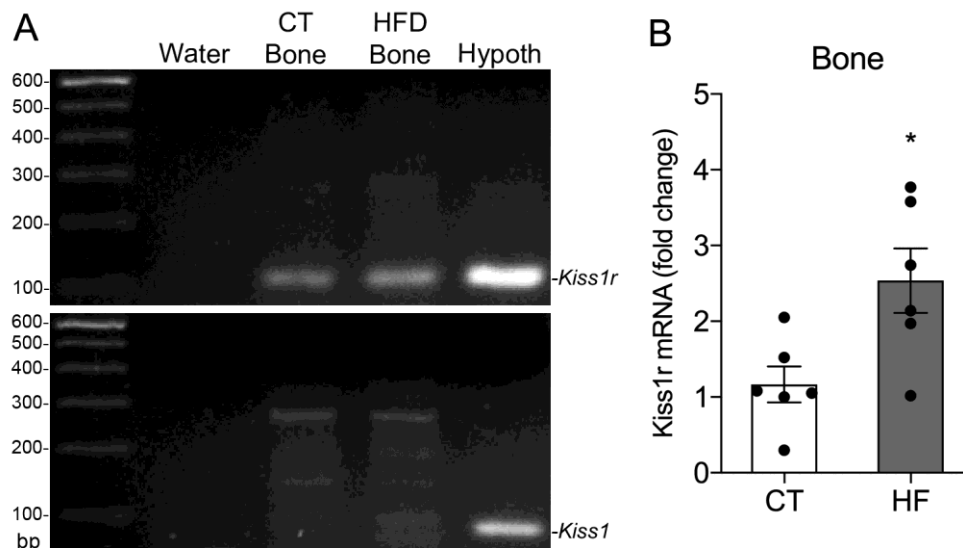


Figura 1: Expressão de *Kiss1r* no osso de ratos. Animais castrados divididos em dois grupos: controle (CT) e com dieta rica em gordura (HF). (A) Análise de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para *Kiss1r* (gel superior) e *Kiss1* (gel inferior) em amostras de fêmur (Bone) e hipotálamo (Hypoth). (B) Análise de real time RT-PCR (qPCR) para quantificação do RNAm de *Kiss1r* em amostras de fêmur de ratos CT e HF. Dados extraídos do estudo de Macari e colaboradores (MACARI et al., 2018a).

Sendo assim, neste trabalho testamos a hipótese de que a kisspeptina seria capaz de prevenir a perda óssea causada pela ausência de testosterona em modelo de ratos orquiectomizados (ORX).

3. OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos da administração subcutânea de kisspeptina na remodelação óssea em ratos adultos submetidos à orquiectomia.

3.1 Objetivos específicos

1. Avaliar se o tratamento com Kp10 promove alteração em concentrações plasmáticas hormonais em ratos ORX.
2. Avaliar se o tratamento com Kp10 afeta a estrutura mineral e microarquitetura do fêmur em ratos ORX.
3. Analisar se o tratamento com Kp10 altera a quantidade de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos no fêmur.
4. Avaliar se a expressão gênica de *Rankl*, *Opg* e *Runx2* no fêmur de ratos ORX seria modificada pelo tratamento com Kp10.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 3 meses de idade e peso corporal entre 250-300 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas (39 cm x 32 cm x 17 cm), em ambiente com controle de temperatura (22 ± 2 °C) e de ciclo de luz (12:00 h claro/12:00 h escuro; luzes acesas às 07:00 h), com água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação

Animal e aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo n° 131/2019).

4.2 Desenho experimental

Efeito da kisspeptina na remodelação óssea em ratos ORX

Inicialmente, os ratos foram aclimatados por uma semana no biotério e, posteriormente, submetidos à orquiectomia bilateral ou à cirurgia Sham. Três semanas após a cirurgia, os ratos Sham e ORX foram submetidos a um tratamento via subcutânea (s.c.) diário, por 30 dias, com veículo (grupo Sham, n = 6; grupo ORX, n = 6), Kp10 (grupo ORX+Kp, n = 6), Kp10 e kisspeptina-234 (Kp234, antagonista de Kiss1r; grupo ORX+Kp+A, n = 4), ou testosterona (grupo ORX+T, n = 6). Após o último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras de sangue foram colhidas para determinação de concentrações hormonais por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). A próstata e tecidos adiposos foram removidos e pesados para controle da eficácia e seletividade dos tratamentos. Um dos fêmures coletados foi destinado à análise da massa óssea por microtomografia computadorizada (μ CT) e, em seguida, à análise histológica. O outro fêmur foi processado para análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real (qPCR).

4.3 Anestésicos e drogas

Para realização das cirurgias, os animais foram anestesiados através de via intraperitoneal (i.p.) com solução de cetamina (cloridrato de cetamina, 80 mg/kg de peso corporal, p.c.) e xilazina (10 mg/kg p.c.). Como medida profilática, após a cirurgia, os animais receberam uma dose do analgésico/anti-inflamatório pós-cirúrgico de uso veterinário (Flunixin meglumina; Banamine, Schering-Plough; 2,5 mg/kg p.c., s.c.) e de antibiótico via intramuscular (i.m.) (Pentabiótico, Fort Dodge; 24000 UI/kg p.c.). A testosterona (propionato

de testosterona, Organon, São Paulo, Brasil; 0,25 mg/0,1mL/rato/dia, s.c.) foi administrada dissolvida em óleo de milho em dose fisiológica previamente determinada (RIBEIRO et al., 2015). A Kp10 (rat kisspeptin 10, cat. 4243, Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi administrada na dose de 1 nmol/0,2mL/rato/dia, s.c., (MACARI et al., 2018a) e a Kp234 (kisspeptin 234, cat. 3881,m Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi administrada na dose de 3 nmol/0,2mL/rato/dia, s.c., ambas as drogas diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). A administração das drogas foi realizada durante o período da manhã e os grupos Sham e ORX recebiam 0,2 mL NaCl 0,9%, s.c. (Veículo).

4.4 Taxa metabólica de repouso

Para a mensuração do consumo de oxigênio em repouso, foi utilizado um sistema de fluxo aberto de calorimetria indireta (OXYMAX v500, Columbus Instruments/Ohio, USA). Esse equipamento consiste em uma câmara hermeticamente fechada (DE LIMA et al., 2008) e previamente calibrada com uma mistura de gases (20.5% de O₂ e 0.5% de CO₂) com certificação padrão do fabricante White Martins. No dia do experimento, cada animal foi pesado, e então permaneceu por 50 minutos dentro da câmara. Os primeiros 20 minutos foram desprezados da análise, e os 30 minutos seguintes foram utilizados para a mensuração do consumo de oxigênio de repouso dos animais.

4.5 Orquiectomia

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), obedecendo às normas técnicas de assepsia e antissepsia. Para a realização da orquiectomia, sob efeito da solução anestésica, os animais foram posicionados em cama cirúrgica em posição de decúbito dorsal. Foi realizada a assepsia do escroto seguida de uma incisão na linha mediana do tecido. A *tunica vaginalis* foi então

divulsionada de forma a expor o testículo e o mesmo foi pressionado para o exterior. Com um fio de sutura, foi realizada a ligadura dos funículos espermáticos possibilitando assim a secção desse local para o corte de retirada do testículo. Esse mesmo procedimento foi repetido para a remoção do testículo contralateral. Feito isto, a *tunica vaginalis* e o escroto foram devidamente suturados. Os animais do grupo Sham passaram pelos mesmos procedimentos, exceto, a remoção dos testículos. Após a gonadectomia, para recuperação dos animais, os mesmos foram colocados em gaiolas individuais em ambiente aquecido mantido a 37 °C.

4.6 Microtomografia Computadorizada (μ CT)

As análises de μ CT foram realizadas como previamente descrito (MACARI et al., 2015, 2018b). Imediatamente após a eutanásia dos animais, o fêmur esquerdo foi coletado e armazenado em paraformoldeído 4%. Essas amostras foram então escaneadas utilizando micro tomógrafo de raio X (Skyscan 1172, Aartselaar, Belgium). As imagens geradas foram primeiramente reconstruídas com o *software* NRecon (Skyscan, Aartselaar, Belgium) e em seguida foram analisadas utilizando o *software* CT-Analyzer (Ctan, Skyscan, Belgium). A calibração do programa foi corrigida com a densidade conhecida pelo *Phanton* de hidroxiapatita. Os parâmetros analisados para osso trabecular foram: densidade mineral óssea (BMD), porcentagem de volume ósseo trabecular/volume total (BV/VT%), volume do osso (BV), índice do modelo de estrutura (SMI), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número trabecular (Tb.N); para o osso cortical utilizou-se as seguintes medidas: espessura cortical (CT.Th), área total (T.Ar), área de osso (B.Ar) e perímetro ósseo (B.Pm).

4.7 Processamento e análise histológica

As análises histológicas foram realizadas como previamente descrito (MACARI et al., 2015, 2018b). Após os resultados da μ CT, as amostras de fêmur foram submetidas ao processo de desmineralização ficando armazenadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-cético

(EDTA) 14%, com pH 7,42. Essa solução foi trocada com uma frequência de uma vez a cada 3 dias. Após um período de aproximadamente 3 meses para a completa descalcificação do tecido, as amostras foram submetidas a um processo de desidratação utilizando-se banhos de álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto, seguido por 3 banhos diferentes de xilol. As amostras foram então submetidas à dois banhos de parafina líquida com temperatura controlada entre 58 e 62 °C em estufa por 2 horas. Com as amostras incluídas, foram formados blocos de parafina possibilitando assim o corte das mesmas em secções sagitais de 4 µm na região distal do fêmur, realizado em um micrótomo. As secções foram devidamente montadas em lâminas que, em seguida, foram desparafinizadas em estufa entre 58 e 61 °C. Para a contagem de osteoblastos e osteócitos as amostras foram submetidas, respectivamente, à coloração de Tricômio de Masson e Eosina e Hematoxilina (HE). Para a contagem de osteoclastos as amostras foram coradas para a marcação de TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Lois, MO, USA) e contra coradas com hematoxilina (Sigma-Aldrich). Utilizando um microscópio acoplado à câmara digital, as imagens foram geradas utilizando objetiva de 40 x e a quantificação das células foi realizada através do *software Image J* (National Institutes Health, EUA).

4.8 Extração de mRNA e qPCR

Para a extração de mRNA foi utilizado o protocolo de instruções do fabricante Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Inicialmente, as amostras de fêmur foram colocadas dentro de um criotubo contendo 500 µL de Trizol e 2 beads metálicas. Utilizando um amalgamador adaptado, o criotubo foi agitado possibilitando a trituração dos ossos. Em seguida, adicionamos 200 µL de clorofórmio às amostras, e as mesmas foram centrifugadas por 25 minutos em 15.000 g. A fase aquosa, formada após a centrifugação, foi então separada da fase proteica e colocada em um novo tubo. Nesse tubo adicionamos 500 µL de isopropanol e em seguida o armazenamos em temperatura de -20 °C por 20 minutos. Após esse período, a amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi descartado, e então o pellet formado no côncavo do tubo foi

lavado em etanol 75%. Após o descarte do álcool, aguardamos a secagem dos tubos por 15 minutos e o pellet foi dessa vez, ressuspendido em 20 μ L de água DEPC. Em sequência, a quantificação das amostras de RNA foi verificada através da análise de 1 μ L de amostra em NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Utilizando um termociclador (BioRad T100, Hercules, Califórnia, USA) e a enzima transcriptase reversa SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) foi realizada a transcrição do RNA em cDNA. O sistema StepOnePlus Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) foi utilizado para a análise, bem como o SYBR[®] Green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A partir do cDNA foi mensurado a expressão gênica dos marcadores *Rankl*, *Opg* *Runx2* bem como a proporção *Rankl/Opg*, e o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foi utilizado como controle. Os dados foram avaliados utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). O Ct (threshold cycle ou ciclo limiar) foi determinado e o Δ C_T de cada amostra foi calculado, pela subtração dos valores de CT do gene de interesse e do respectivo gene normalizador (*Gapdh*). O cálculo do $\Delta\Delta$ Ct foi realizado pela subtração do valor de Δ CT de cada amostra pelo Δ CT das amostras do grupo calibrador (Sham). E por fim, após obtenção do valor de $\Delta\Delta$ Ct, aplicamos a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para comparar a expressão gênica entre os grupos experimentais. Os primers utilizados para amplificação são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Genes e sequências de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR em tempo real.

Gene	Primers	Número de acesso
<i>Gapdh</i>	Forward primer: 5'-ACAGCCGCATCTTCTTGTGC-3' Reverse primer: 5'-GCCTCACCCCATTTGATGTT-3'	NM_017008
<i>Rankl</i>	Forward primer 5'-CCTTGCAGCTCAACGTGGATA-3' Reverse primer: 5'-CCAGAGTCGAGTCCTGCAA-3'	NM_001271235.1
<i>Opg</i>	Forward primer 5'-GGTGAGACGTCATCGAAAGC-3' Reverse primer 5'-TCGCACAGGGTGACATCTAT-3'	NM_012870.2
<i>Runx2</i>	Forward primer 5'-CGTGGTCCTATGACCAGTCT-3' Reverse primer 5'-GAAGTCAGAGGTGGCAGTGT-3'	NM_001278483.1

4.9 Dosagens por ELISA

Primeiramente, para realizar a dosagem de testosterona por ELISA, foi necessário a realização do processo de extração do hormônio do plasma em éter utilizando 1 mL de éter etílico grau HPLC. O solvente foi adicionado a um tubo contendo 60 µL de plasma e então vedado com plástico filme e agitados duas vezes no vórtex por 60 segundos. Posto isto, os tubos foram centrifugados a 4500 rpm por 20 min à 4 °C e, em seguida, armazenados por 30 min no freezer à -80 °C. Após este período, os tubos foram retirados do freezer e a fase líquida foi transferida para novos *ependorfs*. Esses últimos permaneceram abertos *overnight* em uma capela de exaustão para evaporação do éter etílico. Em sequência, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de tampão de ensaio e agitadas duas vezes por 60 segundos no vórtex. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm durante 20 min à 4 °C, e 25 µL do sobrenadante foi utilizado para as dosagens no ensaio de ELISA para testosterona utilizando o

kit comercial DRG Testosterone ELISA (EIA-2693-96, DRG Instruments GmbH, Alemanha). Para as dosagens plasmática de E2 utilizamos o kit comercial DRG Estradiol ELISA (EIA-2693-96WELLS, DRG Diagnostics, Alemanha). Para o E2, as amostras de plasma foram analisadas sem prévia extração, pois o método se mostrou ineficiente para este hormônio em testes preliminares realizados no laboratório. Em ambos os casos, as dosagens foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Para mensurar os níveis plasmáticos de LH e prolactina (PRL) foi utilizado o método de ELISA, conforme previamente descrito no laboratório (AQUINO et al., 2017; SILVA et al., 2020). Primeiramente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-LH bovino a 1:2500 em PBS (bovine LH β 518B7 monoclonal antibody, University of California, Davis, USA) ou anti- PRL guinea pig a 1:1500 [guinea pig anti-rat PRL, AFP65191, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program (NIDDK-NHPP)] para o teste de LH e PRL, respectivamente e incubadas a 4 °C por 24 horas. Posto esse período, as placas foram incubadas com um tampão de bloqueio [leite desnatado em pó em tampão fosfato salina com Tween-20 (PBS-T), 5%] por duas horas, esse procedimento viabiliza a redução de ligações inespecíficas do anticorpo de captura. Posteriormente, pipetou-se a curva com padrão de LH ou PRL de rato, bem como as amostras de plasma dos animais em diluídas em PBS-T. Após 24 horas de incubação à temperatura ambiente as placas foram incubadas com o anticorpo de detecção anti-LH a 1:40.000 (rabbit anti-rat LH, AFP240580Rb, NIDDK-NHPP) ou anti-PRL a 1:70.000 (rabbit anti-rat prolactin antiserum, NIDDK-Anti-rPRL-S-9, AFP131581570) em tampão de bloqueio a 4 °C durante 24 horas sob agitação. No dia seguinte, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Polyclonal goat anti-rabbit IgG/HRP, P0448; Dako, USA) a 1:1.000 para LH e 1:2.000 para PRL em 50% de tampão de bloqueio e 50% de PBS pelo período de 90 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Para revelação das placas

foi utilizado o-fenilenodiamina (OPD, 00-2003; Invitrogen, USA), 1 tablete diluído em 12 mL de tampão citrato, onde adicionou-se 6 µL de H₂O₂ 30%. As placas foram incubadas em uma câmara escura, em temperatura ambiente sob agitação por 45 minutos. A reação foi interrompida com HCL 3M. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer; BioTek) em comprimento de onda de 450 nm para a dosagem de testosterona e E2. Para LH e PRL a leitura foi feita em 490 nm, e 650 nm foi utilizado como leitura inespecífica. E as concentrações foram determinadas por interpolação dos valores das amostras a partir de uma regressão linear da curva padrão dos testes.

4.10 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 8.0 para Windows destinado a mensuração dos dados estatísticos que, por sua vez, foram apresentados em média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Newman-Keuls. O valor de $P < 0,05$ foi determinado para indicar diferença significativa entre os grupos.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 sobre parâmetros metabólicos em ratos ORX

Com o intuito de investigar possíveis alterações metabólicas geradas pelos tratamentos farmacológicos administrados aos animais, realizamos a aferição do peso corporal, do fêmur, dos tecidos adiposos e a análise do consumo de oxigênio. Durante as 7 semanas de experimento os animais tratados com Kp10 não apresentaram diferença significativa quanto ao ganho de

peso corporal comparados aos demais grupos experimentais. Entretanto, nas 4 últimas semanas de experimento, os animais do grupo ORX+KP+A apresentaram menor ganho de peso corporal em relação aos grupos ORX e ORX+T ($P < 0,05$) (Figura 2A). É possível observar novamente que os animais tratados com antagonista apresentam menor ganho de peso quando comparado ao grupo ORX (Figura 2B). O índice de adiposidade calculado através dos pesos dos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico não apresentou diferença entre os grupos experimentais (Figura 2C), bem como o comprimento do fêmur (Figura 2D). Além disso, também não foi observada diferença significativa na análise da taxa metabólica de repouso, que demonstrou similar consumo de oxigênio entre os grupos (Figura 2E). Esses resultados evidenciam que o tratamento crônico com Kp10 não foi capaz de alterar o ganho de peso e a taxa metabólica dos animais, embora o antagonista Kp-234 tenha apresentado um efeito negativo sobre o ganho de peso corporal.

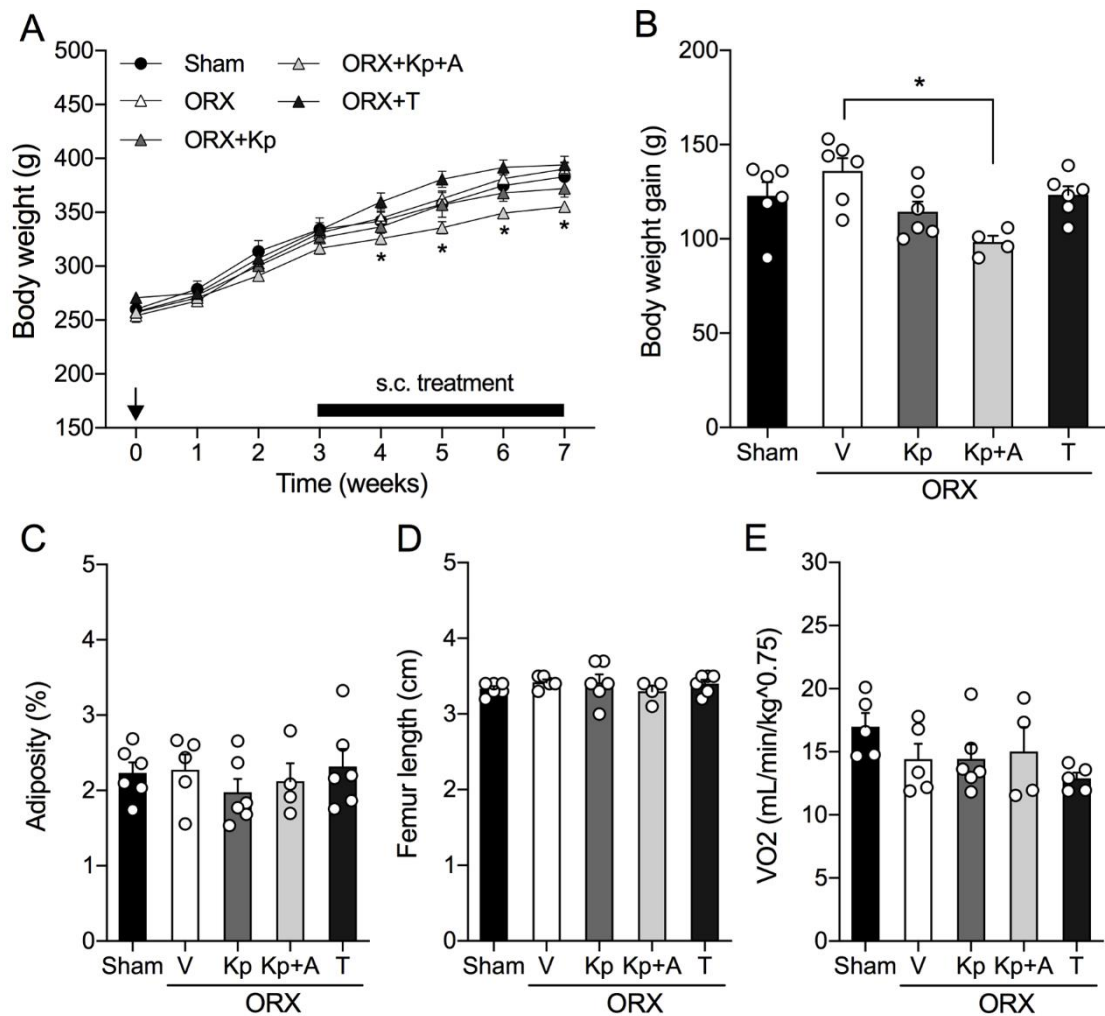


Figura 2: Tratamento com Kp10 não altera ganho de peso e parâmetros metabólicos. Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (V; grupo Sham, $n = 6$; grupo ORX, $n = 6$), Kp10 (grupo ORX+Kp, $n = 6$), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, $n = 4$) ou testosterona (grupo ORX+T, $n = 6$). (A) Mensuração do peso corporal durante as 7 semanas de experimento. * $P < 0,05$ ORX+Kp+A comparado com ORX e ORX+T. (B) Ganho de peso corporal durante o experimento. * $P < 0,05$ comparando ORX e ORX+Kp+A. (C) Índice de adiposidade. (D) Comprimento do fêmur (E) Consumo de oxigênio (VO₂) e repouso. Resultados expressos em média \pm EPM, determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5.2 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 sobre os níveis séricos hormonais e sobre o peso da próstata e da vesícula seminal

Ao final do experimento foi analisado o peso da próstata e da vesícula seminal dos animais. Observa-se na figura 3A, que os animais dos grupos ORX ($P < 0,001$), ORX+Kp ($P < 0,001$) e ORX+Kp+A ($P < 0,001$) apresentaram peso da próstata suprimido em relação ao grupo

Sham. Observa-se também que o tratamento com testosterona no grupo ORX+T foi suficiente para prevenir a atrofia da próstata ($P < 0.001$), sendo superior ao nível do grupo ORX ($P < 0,01$) (Figura 3A). Esse mesmo perfil foi encontrado na pesagem da vesícula seminal. O grupo Sham apresentou maior peso da vesícula seminal ($P < 0,001$) que os grupos ORX, ORX+Kp e ORX+Kp+A. E, novamente, a atrofia da vesícula seminal foi prevenida no grupo ORX+T (Figura 3B).

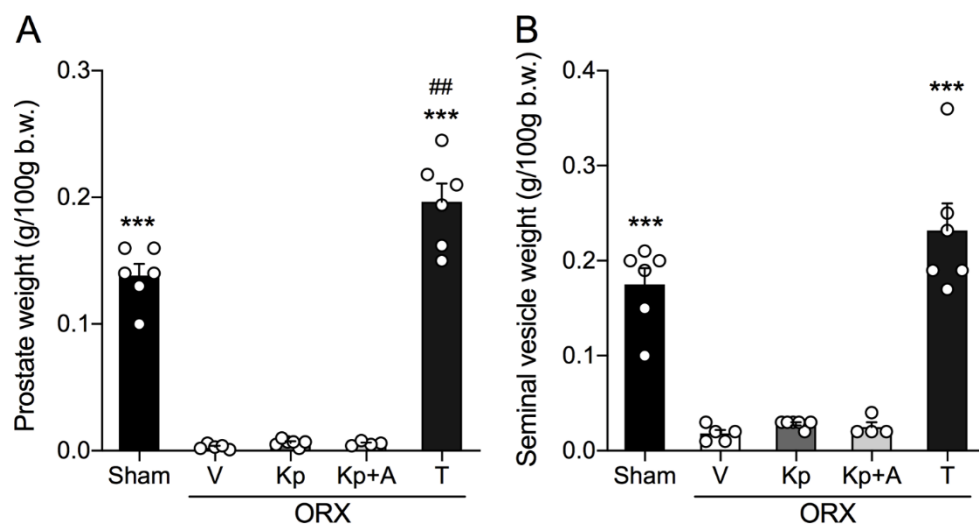


Figura 3: Efeito do tratamento com Kp10 sobre o peso da próstata e da vesícula seminal. Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (V; grupos Sham, $n = 6$; e ORX, $n = 6$), Kp10 (grupo ORX+Kp, $n = 6$), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, $n = 4$) ou testosterona (grupo ORX+T, $n = 6$). Ao final do experimento, o peso da próstata e da vesícula foram mensurados. (A) Peso da próstata. (B) Peso da vesícula seminal. *** $P < 0,001$ comparado aos grupos ORX, ORX+KP e ORX+KP+A; ## $P < 0,01$ comparado ao grupo Sham. Resultados expressos em média \pm EPM e determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

A figura 4 mostra o perfil hormonal plasmático do efeito da castração e os tratamentos sistêmicos com Kp10, Kp234 e testosterona. Pode-se observar que os animais dos grupos ORX ($P < 0,01$), ORX+Kp10 ($P < 0,01$) e ORX+Kp+A ($P < 0,01$) apresentaram níveis elevados de LH quando comparados ao grupo Sham, enquanto o grupo ORX+T apresentou níveis similares ao grupo Sham (Figura 4A). Na figura 4B, observamos que as concentrações plasmáticas de testosterona nos grupos Sham e ORX+T apresentaram-se maiores do que nos demais grupos ($P < 0,001$), sendo os níveis dos ratos ORX+T significativamente superiores aos do grupo Sham

($P < 0,05$). Ainda na figura 4, podemos observar que os níveis plasmáticos de E2 não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 4C). Resultado similar foi encontrado na dosagem das concentrações plasmáticas de PRL (Figura 4D).

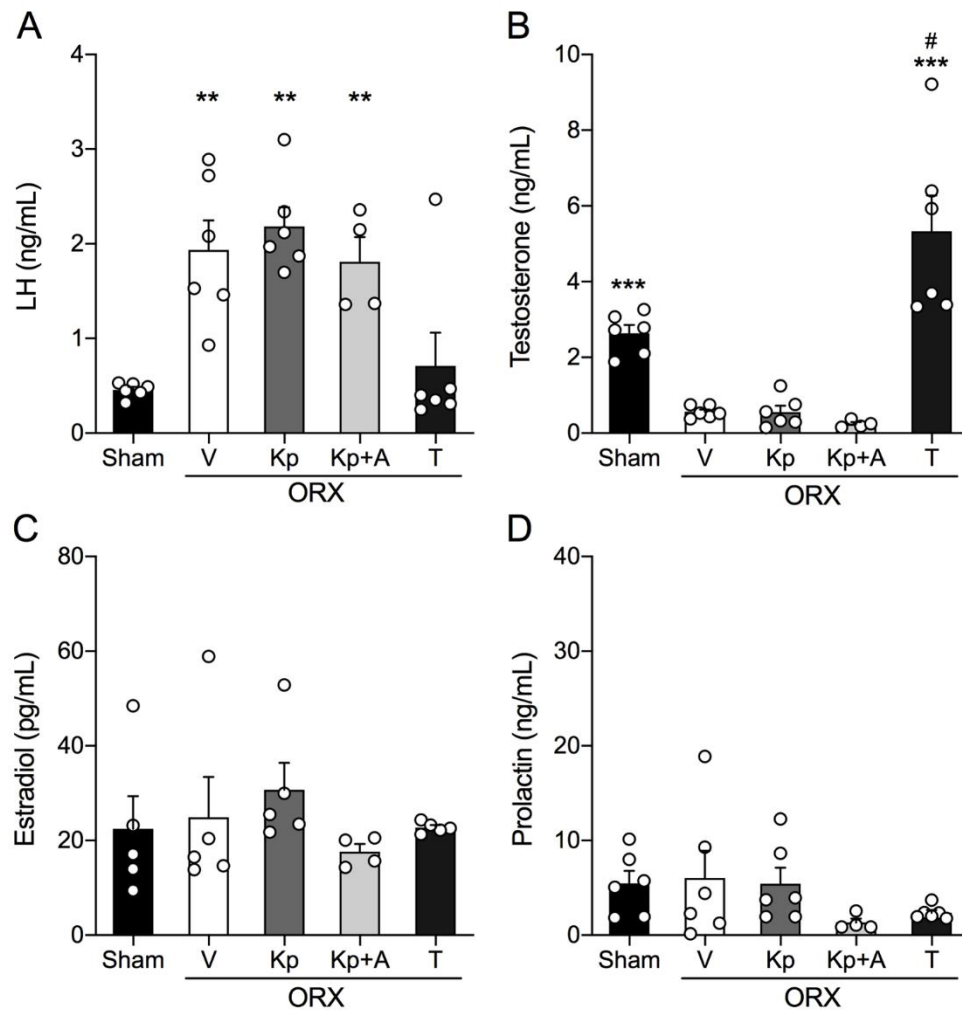


Figura 4: Tratamento com Kp10 em ratos ORX não alterou as concentrações de LH, testosterona, estradiol ou prolactina. Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (V; grupos Sham, $n = 6$; e ORX, $n = 6$), Kp10 (grupo ORX+Kp, $n = 6$), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, $n = 4$) ou testosterona (grupo ORX+T, $n = 6$). Ao final do experimento, amostras de sangue foram colhidas para a dosagem hormonal por ELISA. (A) Nível plasmático de LH. ** $P < 0,001$ comparado com Sham e ORX+T. (B) Nível plasmático de testosterona. *** $P < 0,0001$ comparado a ORX, ORX+Kp e ORX+Kp+A; # $P < 0,05$ comparado ao Sham. (C) Nível plasmático de E2. (D) Nível plasmático de prolactina. Resultados expressos em média \pm EPM e determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5.3 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 na densidade óssea e estrutura do fêmur

Para determinar quais seriam os efeitos dos tratamentos utilizados no tecido ósseo realizamos análise por μ CT da porção distal do fêmur dos animais. Na figura 5 é possível observar os resultados encontrados para os principais parâmetros utilizados na determinação da microarquitetura óssea referente ao osso trabecular. A figura 5A exibe uma imagem representativa transversal do fêmur de cada um dos grupos experimentais indicando em vermelho a área que foi analisada. A figura 5B mostra uma imagem coronal representativa do fêmur de um animal de cada grupo. A figura 5C mostra que os grupos ORX+Kp ($P < 0,05$) e ORX+T ($P < 0,01$), de forma similar ao grupo Sham ($P < 0,01$), apresentaram maior BMD que o grupo ORX. Esse mesmo perfil de resposta foi observado ao analisar o BV/TV% e também BV. Em ambas análises pode-se observar que os grupos ORX e ORX+Kp+A apresentaram valores significativamente inferiores quando comparados ao grupo Sham ($P < 0,01$), enquanto que esta perda foi prevenida nos grupos ORX+Kp e ORX+T (Figura 5D e 5E). Pode-se constatar então que, dentro desses parâmetros, o grupo tratado com Kp10 apresentou perfil ósseo similar ao grupo Sham, assim como o grupo com reposição hormonal com testosterona. Adicionalmente, o tratamento com o antagonista Kp234 foi capaz de bloquear os efeitos da Kp10, comprovando ação da Kp10 via Kiss1r. O SMI está diretamente relacionado à perda óssea, por conseguinte, um alto SMI é indicativo de perda óssea. Ao analisar o SMI, na figura 5F, observa-se que, mais uma vez, os grupos ORX+Kp e ORX+T apresentaram resultados similares ao grupo Sham, enquanto o grupo ORX+Kp+A apresentou aumento no SMI em relação aos grupos Sham e ORX+T ($P < 0,05$). Os grupos tratados com Kp10 ($P < 0,05$) e testosterona ($P < 0,05$) obtiveram um aumento no Tb.Th quando comparados aos grupo ORX e ORX+Kp+A (Figura 5G). Quanto à separação das trabéculas, observa-se que os grupos ORX ($P < 0,05$) e ORX+Kp+A ($P < 0,05$) apresentaram valores aumentados em relação ao grupo

Sham (Figura 5H). No gráfico da figura 5I é possível ver uma diferença significativa no Tb.N dos grupos Sham ($P < 0,05$) e ORX+T ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo ORX e ORX+Kp+A. Esses resultados demonstram que, de maneira geral, o tratamento com Kp10 foi capaz de agir na remodelação óssea trabecular mantendo o índice de convexidade, o tamanho das trabéculas, a separação entre as trabéculas e número de trabéculas em níveis comparáveis aos dos ratos Sham e castrados com reposição de testosterona.

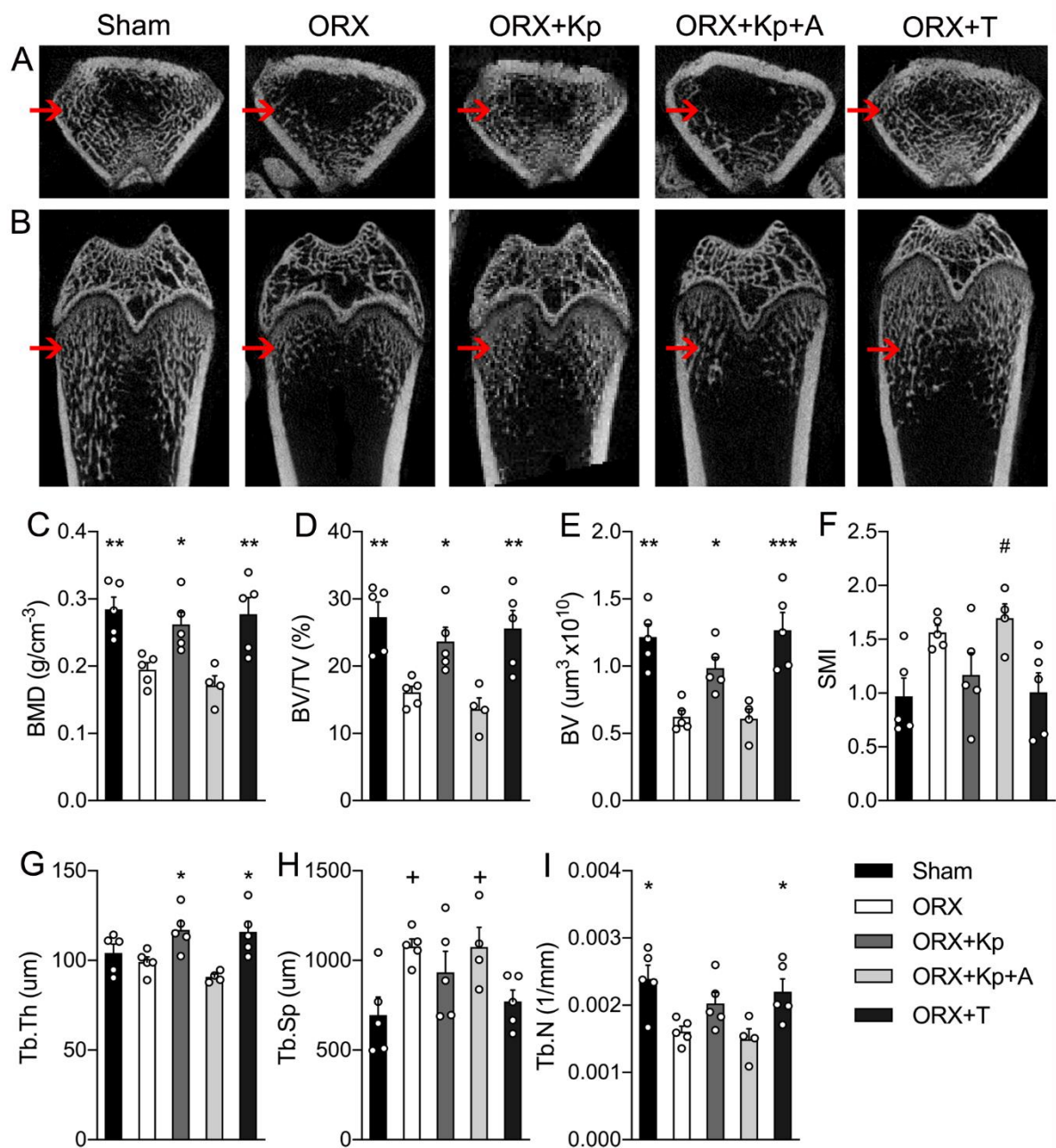


Figura 5: Efeito do tratamento com Kp10 sobre a massa óssea trabecular do fêmur distal através de μ CT. Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (grupos Sham, $n = 5$; e ORX, $n = 5$), Kp10 (grupo ORX+Kp, $n = 5$), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, $n = 4$) ou testosterona (grupo ORX+T, $n = 5$). Ao final do experimento foi realizado a μ CT do fêmur desses animais. (A) Imagens representativas transversais de cada grupo. (B) Imagens representativas coronais de cada grupo. Seta vermelha indica a região analisada. (C) Densidade mineral óssea (BMD). (D) Relação do volume de osso pelo volume total (BV/TV%). (E) Volume ósseo (BV). (F) Índice de convexidade das trabéculas (SMI). (G) Espessura das trabéculas (Tb.Th). (H) Separação das trabéculas (Tb.Sp). (I) Número de trabéculas (Tb.N). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado aos grupos ORX e ORX+Kp+A; # $P < 0,05$ comparado ao grupo Sham e ORX+T. + $P < 0,05$ comparado ao grupo Sham. Resultados expressos em média \pm EPM e determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Após analisar a microarquitetura trabecular da porção distal do fêmur, também utilizando μ CT, nós analisamos a estrutura cortical desse mesmo tecido. A figura 6A é composta por imagens representativas em corte transversal de cada um dos grupos experimentais estudados. Embora em nosso modelo de estudo não tenha ocorrido efeito da orquiectomia sobre o osso cortical do fêmur, foi possível observar um aumento na espessura cortical nos ratos ORX tratados com Kp-10 quando comparados aos grupos ORX+Kp+A e ORX+T (Figura 6B; $P < 0,05$). Todavia, não foi encontrada diferença estatística nos demais parâmetros utilizados para a análise do osso cortical como B.Ar, T.Ar, B.Ar/T,Ar, B.Pm, e B.Pm/B.Ar entre os grupos experimentais do presente trabalho. (Figura 6C–G).

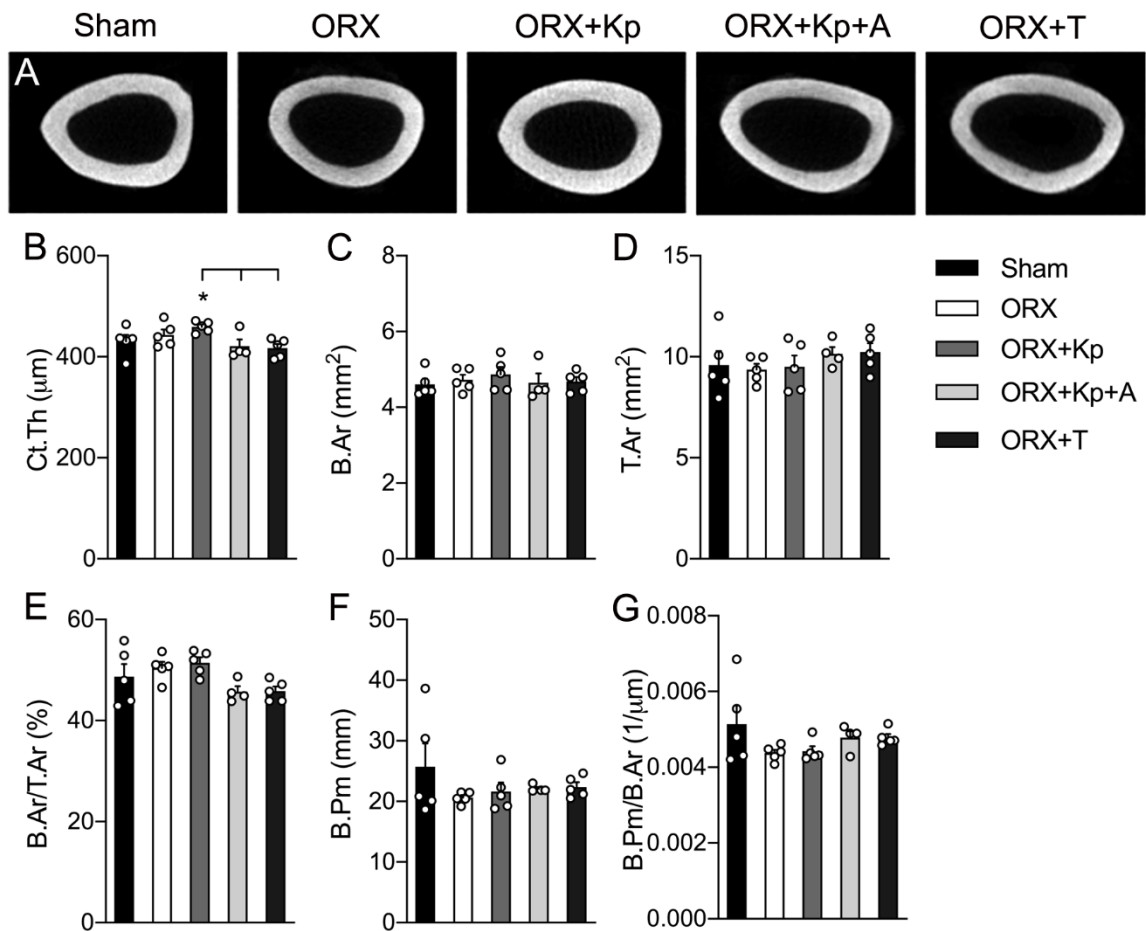


Figura 6: Efeito do tratamento com Kp10 sobre massa óssea cortical do fêmur através de μ CT. Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (grupos Sham, $n = 5$; ORX, $n = 5$), Kp10 (grupo ORX+Kp, $n = 5$), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, $n = 4$), ou testosterona (grupo ORX+T, $n = 5$). Ao final do experimento foi realizada a μ CT do fêmur desses animais. (A) Imagens representativas transversais da diáfise do fêmur de cada grupo. (B) Espessura cortical (Ct.Th). (C) Área do osso (B.Ar). (D) Área total (T.Ar). (E) Relação entre a área do osso e a área total (B.Ar/T.Ar). (F) Perímetro ósseo (B.Pm). (G) Relação entre o perímetro ósseo e a área do osso (B.Pm/B.Ar). * $P < 0,05$ comparado aos grupos ORX+Kp+A e ORX+T. Resultados expressos em média \pm EPM e determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5.4 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 no número de células ósseas no fêmur

Em seguida à análise de μ CT, realizamos a análise histológica da porção distal do fêmur dos animais para a quantificação de osteoblastos e osteoclastos por meio de coloração utilizando tricrômio de Masson e TRAP, respectivamente, com a finalidade de quantificar se haveria alterações no número de células em função da castração e tratamento com Kp10.

A figura 7 mostra imagens histológicas representativas em coloração de tricômio de Masson de fêmur de ratos Sham, ORX, ORX+Kp, ORX+Kp+A e ORX+T. Em azul, pode-se observar o tecido ósseo mineralizado e, em rosa, aderidos à parede trabecular do tecido ósseo, estão corados os osteoblastos (exemplos indicados por setas). Referente à contagem dos osteoblastos, observamos um maior número de células nos grupos Sham ($P < 0,05$), ORX+Kp ($P < 0,01$) e ORX+T ($P < 0,001$) quando comparados aos ratos ORX e ORX+Kp+A. Também observamos que o tratamento com testosterona grupo ORX+T promoveu aumento do número de osteoblastos em relação aos ratos Sham ($P < 0,05$; Figura 7F). A marcação e TRAP no fêmur de ratos Sham, ORX, ORX+Kp, ORX+Kp+A e ORX+T também é apresentada na figura 7. Ratos ORX apresentaram marcante no número de osteoclastos em relação aos demais grupos experimentais ($P < 0,01$). O número de osteoclastos em ratos ORX+Kp foi semelhante ao dos ratos Sham e ORX+T, sendo que os três grupos apresentaram contagem inferior aos animais que receberam Kp234 ($P < 0,05$; Fig 7M). Apesar das diferenças na análise histológica referente à quantidade de osteoblastos e osteoclastos entre os grupos experimentais, não foi encontrada diferença significativa entre os mesmos grupos quanto ao número de osteócitos (Sham: $28,9 \pm 1,8$; ORX: $24,1 \pm 1,8$; ORX+Kp: $29,5 \pm 2,8$; ORX+Kp+A: $22,4 \pm 2,3$; ORX+T: $30,7 \pm 4,1$ osteócitos/mm²; $P = 0,19$).

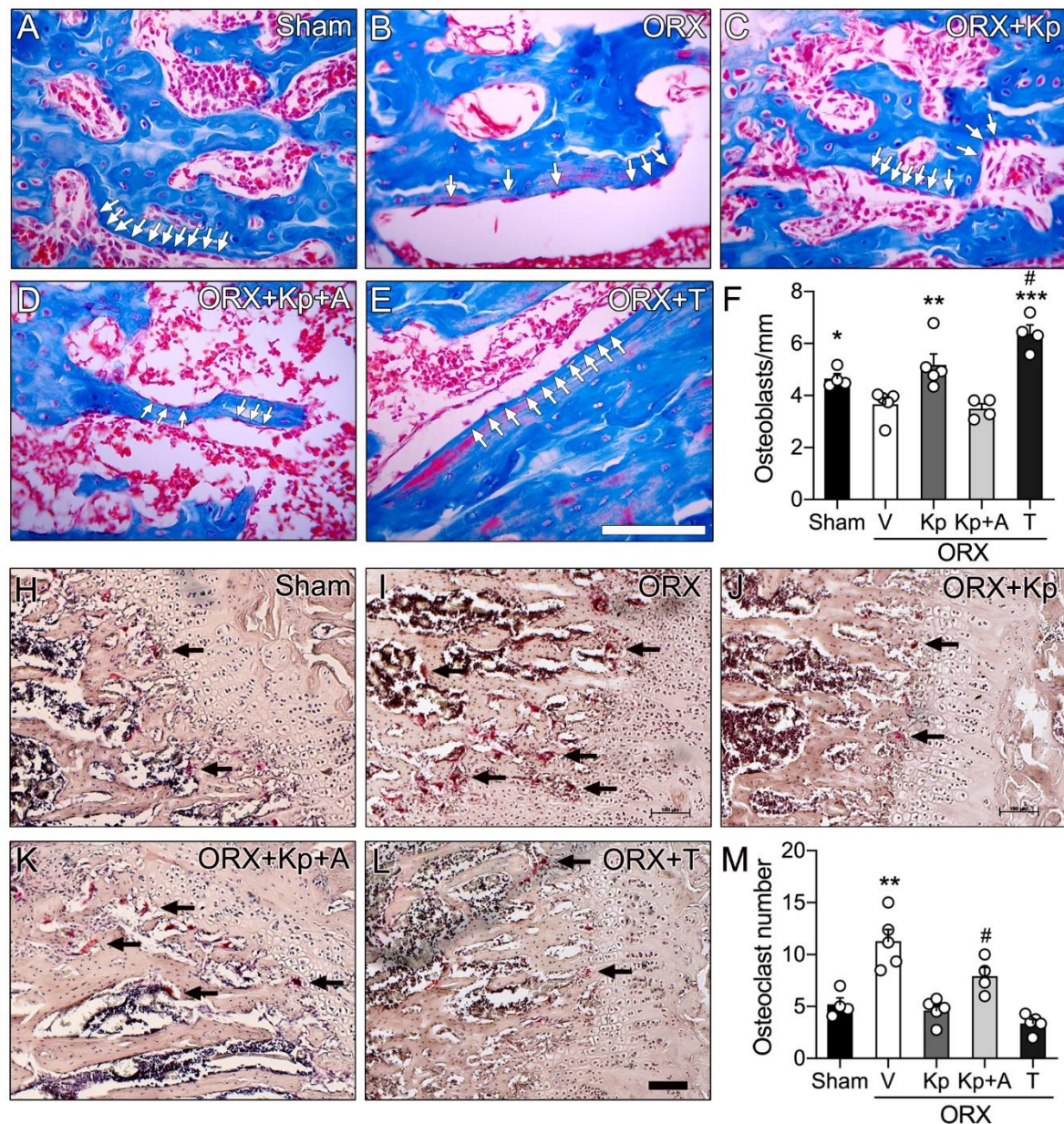


Figura 7: Efeito do tratamento com Kp10 no número de osteoblastos e osteoclastos no fêmur. Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (V; grupo Sham, $n = 5$; grupo ORX, $n = 5$), Kp10 (grupo ORX+Kp, $n = 5$), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, $n = 4$), ou testosterona (grupo ORX+T, $n = 5$). Ao final do experimento foi realizada a análise histológica do fêmur proximal. (A-E) Imagens histológicas representativas utilizando a coloração tricômio de Masson. Em azul o tecido ósseo mineralizado e em rosa, indicados pelas setas brancas, os osteoblastos aderidos à parede óssea. (A) Sham, (B) ORX, (C) ORX+Kp, (D) ORX+Kp+A e (E) ORX+T. (F) Contagem no número de osteoblastos. (H-L) Imagens histológicas representativas utilizando a coloração de TRAP. Em rosa claro o tecido ósseo mineralizado, e em rosa escuro, indicados pelas setas pretas, os osteoclastos. (H) Sham, (I) ORX, (J) ORX+Kp, (K) ORX+Kp+A e (L) ORX+T. (M) Contagem no número de osteoclastos. Imagens representativas em aumento de 40x e barra da escala em 100 μm . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparando os grupos ORX e ORX+Kp+A. # $P < 0,05$ comparado ao grupo Sham. Resultados expressos em média \pm EPM e determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5.5 Efeito da orquiectomia e tratamento com Kp10 sobre a expressão gênica de *Rankl*, *Opg* e *Runx2*

As análises moleculares da expressão dos genes *Rankl*, *Opg*, *Runx2* foram realizadas através da técnica de qPCR em amostras de fêmur afim de investigar possíveis marcadores ósseos relacionados ao impacto da Kp10, do antagonista de kisspeptina e da testosterona na remodelação óssea na falta de hormônios esteroides sexuais. Observamos inicialmente que a castração promoveu aumento significativo no mRNA para *Rankl* em relação aos ratos Sham, sendo a expressão deste gene restaurada aos níveis basais nos grupos ORX+Kp, ORX+Kp+A e ORX+T ($P < 0,05$; Figura 8A). Um padrão similar de resposta foi encontrado na expressão de *Opg*, sendo que o grupo ORX também apresentou maiores níveis de RNA em comparação aos demais grupos experimentais ($P < 0,05$; Figura 8B). Na figura 8C é apresentada a razão entre os níveis de RNAm de *Rankl* e *Opg*, para a qual não houve diferença entre os tratamentos experimentais. Como um marcador gênico da diferenciação osteoblástica, foi analisada a expressão do mRNA de *Runx2* e, à semelhança dos genes *Rankl* e *Opg*, o grupo ORX apresentou ressaltado aumento quando comparado ao grupo Sham, o que foi retornado aos níveis controles nos ratos ORX+Kp, ORX+Kp+A e ORX+T ($P < 0,05$; Figura 8D).

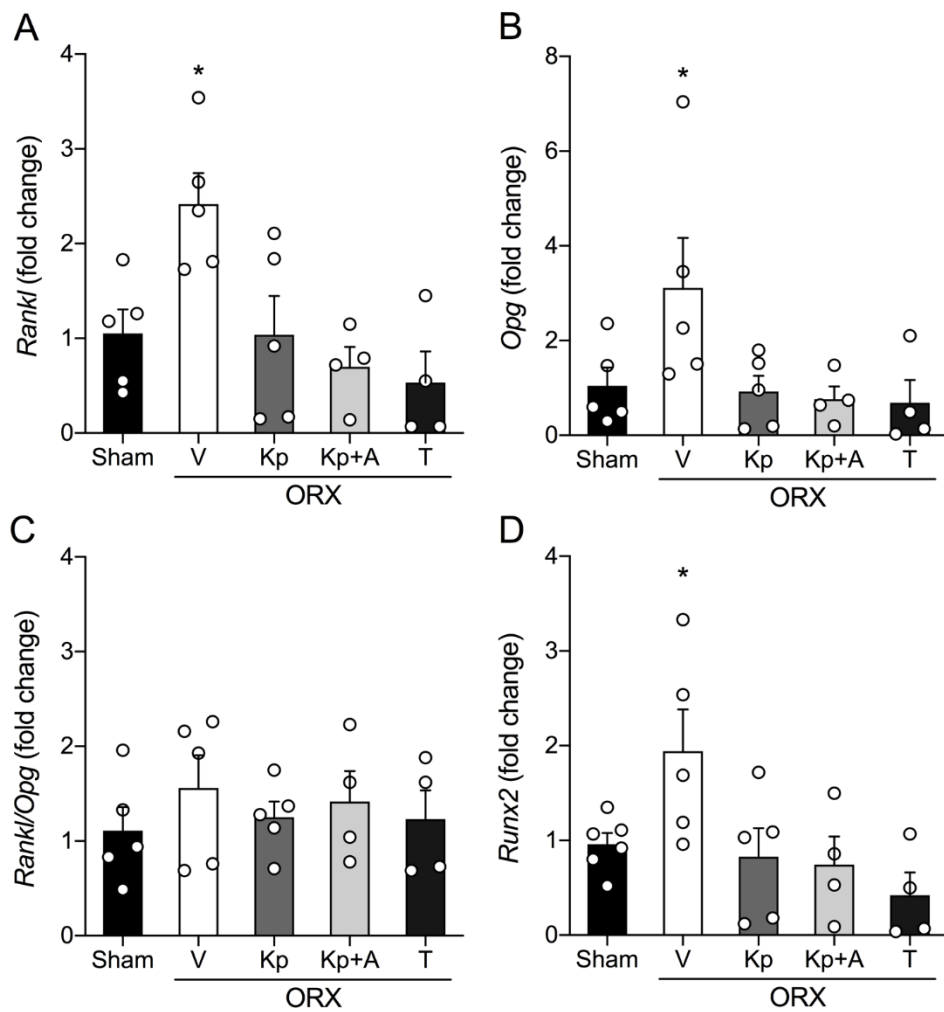


Figura 8: Efeito do tratamento com Kp10 sobre a expressão gênica de *Rankl*, *Opg* e *Runx2*. 21Ratos Sham e ORX receberam tratamento diário, por 30 dias, com veículo (V; grupo Sham, n = 5; grupos ORX, n = 5), Kp10 (grupo ORX+Kp, n = 5), Kp10 e kisspeptina-234 (grupo ORX+Kp+A, n = 4), ou testosterona (grupo ORX+T, n = 4). Ao final do experimento foi realizada análise de qPCR no fêmur desses animais. Média \pm EPM do RNAm de (A) *Rankl*, (B) mRNA fold change de *Opg*. (C) razão *Rankl/Opg* e (D) *Runx2*. Dados normalizados pela expressão de *Gapdh* e expressos relativos (fold change) ao grupo calibrador (Sham). * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos experimentais. Resultados expressos em e determinado por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

A secreção dos hormônios esteroidais, como a testosterona e estrogênio, é dependente de GnRH que, por sua vez, é regulado pela kisspeptina (DUNGAN; CLIFTON; STEINER, 2006). Além do controle das funções reprodutivas, estudos recentes verificaram que a kisspeptina participa da regulação e controle das células ósseas *in vitro* (SON et al., 2018). O

presente estudo demonstrou que o tratamento crônico com Kp10 em ratos machos castrados não alterou o ganho de peso corporal, taxa metabólica, peso da próstata e vesícula seminal dos animais, sendo o ganho de peso corporal inibido pelo antagonista Kp234. Adicionalmente, as concentrações plasmáticas de LH, testosterona, E2 e PRL não foram modificadas pelo tratamento crônico, após orquiectomia, com a dose utilizada de Kp10. Entretanto, demonstramos pela primeira vez que a kisspeptina é capaz de aumentar a densidade e a qualidade da micro arquitetura óssea nos animais castrados, impedindo o fenótipo de perda óssea. Isto envolveu aumento do número de osteoblastos e redução dos osteoclastos a níveis semelhantes àqueles encontrados em ratos Sham e ORX+T. Estes efeitos ósseos parecem estar relacionados com a redução da expressão de *Rankl*, *Opg* e *Runx2* induzida por Kp10, em contrapartida ao aumento da expressão desses genes causado pela orquiectomia.

É comumente conhecida a relação bidirecional entre a concentração dos hormônios esteroides sexuais e o metabolismo energético. Enquanto alguns estudos mostram que o declínio da testosterona sérica em homens está associado ao excesso de ganho de peso e maior índice de adiposidade (DERBY et al., 2006; KATZNELSON et al., 1996; TRAVISON et al., 2007), outros estudos apontam que a gonadectomia em machos está associada à diminuição do peso corporal (ALMEIDA et al., 2017; HOOPER; BRIEN; LAWLOR, 1986; VANDERSCHUEREN et al., 1997). Entretanto, analisando os resultados do presente trabalho, não foram observadas alterações metabólicas associadas à gonadectomia. Tais resultados vão ao encontro de outros estudos, os quais também não encontraram diferenças associadas ao peso corporal entre ratos intactos e ratos castrados, como os estudos de Wakley e colaboradores (1991) e de Schoutens e colaboradores (1984). Este último, inclusive, também não observou diferença no peso corporal dos animais após 7 semanas de castração, e apenas notaram redução de peso no grupo ORX após 12 semanas da cirurgia, quando comparados com animais intactos (SCHOUTENS et al., 1984).

Possivelmente, nos estudos em que a castração resultava em perda de peso, pode também haver uma relação entre esse efeito metabólico e o tempo de ausência dos hormônios esteroides sexuais. Por conseguinte, o presente trabalho analisou os animais gonadectomizados por apenas 7 semanas, tempo então presumivelmente insuficiente para se obter mudanças metabólicas provocadas pela gonadectomia. Os resultados do presente trabalho mostram que a administração crônica de Kp10, por 30 dias, não alterou o peso corporal dos animais no decorrer do experimento, tal como o índice de adiposidade e também o consumo de O₂. Dessa forma, foi possível constatar que não houve alterações metabólicas geradas pelo tratamento com Kp10. Todavia, no trabalho de Tolson e colaboradores (2014), investigando o papel da kisspeptina no metabolismo por meio de animais *knockout* (KO) para o *Kiss1r*, as fêmeas *Kiss1r* KO apresentaram maior peso corporal e adiposidade e menor consumo de O₂ quando comparadas com animais selvagens (WT). Entretanto, os mesmos pesquisadores, utilizando o mesmo modelo, não encontraram diferenças no peso corporal e adiposidade entre os animais machos KO para *Kiss1r* e WT (TOLSON et al., 2014, 2019). Nossos resultados são coerentes com os achados deste estudo, uma vez que não encontramos efeitos da Kp10 sobre o metabolismo energético de ratos castrados. Por outro lado, a Kp234 causou diminuição do peso corporal sem alterar a adiposidade, indicando um efeito do bloqueio farmacológico do *Kiss1r* no ganho de peso corporal, que necessita ser melhor explorado em futuros experimentos.

Dessa forma, tendo em vista que o protocolo utilizado não foi capaz de causar alterações metabólicas nos animais tratados com Kp10, o presente estudo torna-se mais seletivo no que se refere ao efeito da kisspeptina no metabolismo ósseo, diminuindo assim um possível viés referente à relação entre o metabolismo energético e a remodelação óssea.

No contexto do efeito gerado pela gonadectomia sobre os níveis hormonais, estudos comprovam a drástica redução nos níveis de testosterona ocasionados pela castração (SCHOUTENS et al., 1984; TEK et al., 2010; VANDERSCHUEREN et al., 1992, 2014;

WAKLEY et al., 1991). O aumento encontrado no presente estudo, referente ao peso da próstata e da vesícula seminal promovido pela reposição hormonal com testosterona em animais ORX, bem como a expressa atrofia desses órgãos nos demais animais castrados corroboram o estudo de Antonio e colaboradores (1999) e Wakley e colaboradores (1991). Como de conhecimento geral, estes pesquisadores observaram que a gonadectomia resulta na atrofia tanto da próstata quanto da vesícula seminal em ratos (ANTONIO; WILSON; GEORGE, 1999; WAKLEY et al., 1991). Nosso trabalho também vai ao encontro de estudos prévios do laboratório, onde observaram que o tratamento com a mesma dose de testosterona preveniu a redução do peso da próstata em animais castrados (RIBEIRO et al., 2015). Esses achados são importantes como forma de comprovação do sucesso da orquiectomia, bem como validação da eficácia do tratamento de reposição hormonal com testosterona em ratos ORX.

Assim como esperado, por interrupção do efeito de *feedback* negativo, e também em concordância com a atrofia da próstata e da vesícula seminal, a orquiectomia gerou aumento dos níveis circulantes de LH devido à falta de testosterona nos grupos castrados. Esse resultado corrobora com o estudo de Huang e colaboradores (2020), que também encontraram elevado nível sérico de LH, após 6 semanas da cirurgia, em ratos machos. E, no nosso estudo, a castração seguida de reposição hormonal com testosterona, foi suficiente para restabelecer o efeito de *feedback* negativo, restaurando então os níveis de LH neste grupo em comparação ao grupo Sham. Esse dado vai ao encontro dos estudos de Ojeda e Ramirez (1973) e Ribeiro e colaboradores (2015), que também encontraram níveis elevados de LH em ratos castrados em comparação a ratos castrados que recebiam reposição hormonal com testosterona.

Quanto a ação da kisspeptina sobre a liberação de LH, a literatura mostra que o tratamento via intracerebroventricular de Kp10 é capaz de elevar os níveis de LH em ratas castradas e tratadas com E2 e também em ratos intactos (SZAWKA et al., 2010; THOMSON et al., 2004). Estudos em homens adultos realizados por George e colaboradores (2013) e

também por Ullah e colaboradores (2019) demonstraram que a administração por via intravenosa em bolus de Kp10 utilizando 0.3 µg/kg e 1 µg/kg, respectivamente, foi capaz de estimular a secreção de LH obtendo um pico do hormônio aos 30 minutos após a administração. Todavia, nosso trabalho não encontrou alteração plasmáticas de LH após o tratamento crônico e por via s.c. de Kp10. Estes dados corroboram com os achados de Thompson e colaboradores (2006), onde os níveis de LH não sofreram alterações após a administração s.c. aguda de Kp10 na faixa de doses entre 0,1 e 50 nmol/injeção em ratos machos adultos. Em outro estudo, aumento da secreção de LH em ratos foi obtido após a administração i.p. aguda de 7,5 nmol de Kp10 (NAVARRO et al., 2005b). Assim, no presente estudo utilizamos uma dose de Kp10 (1 nmol/rato/dia) que não promove alterações na secreção LH, o que fortalece a hipótese de uma ação direta no osso da kisspeptina, independentemente de seus efeitos sobre o eixo gonadal.

Bem como altos níveis de LH, concentrações diminuídas de testosterona também são esperadas após a retirada das gônadas, como o que foi apresentado nos estudos de Gomes e colaboradores (2021) e Huang e colaboradores (2020). Tais estudos verificaram drástica diminuição dos níveis de testosterona em animais castrados, e observaram também que, a cirurgia seguida por reposição hormonal crônica com testosterona, foi eficaz ao elevar os níveis séricos desse hormônio. Nossos resultados também apontaram níveis suprimidos do andrógeno nos animais ORX, que não receberam reposição hormonal, em comparação ao grupo Sham. O tratamento crônico com testosterona foi suficiente para elevar os níveis plasmáticos desse hormônio nos animais castrados. Entretanto, o nível de testosterona encontrado nos animais ORX+T foi levemente superior àqueles encontrados nos ratos Sham, indicando que a dose utilizada promoveu altos níveis fisiológicos deste hormônio. Embora a castração tenha apresentado resultados eficazes na redução plasmática dos andrógenos em machos, não foram encontradas evidências de que a cirurgia altere os níveis de E2. Nossos dados vão ao encontro

do estudo realizado por Vanderschueren e colaboradores (1997) em que a gonadectomia de ratos machos também não reduziu os níveis de E2.

Além das dosagens dos níveis séricos de LH, testosterona e E2, realizamos análises sobre o efeito do tratamento de Kp10 na produção de PRL. A literatura aborda o possível efeito estimulatório da kisspeptina na secreção de PRL através da regulação de neurônios inibitórios de dopamina (GRATTAN; SZAWKA, 2019). Estudos prévios do nosso laboratório observaram que ratas castradas suplementadas com E2 apresentam aumento da liberação de PRL 10 minutos após a administração via intracerebroventricular de Kp10 (AQUINO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2015; SZAWKA et al., 2010). O estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (RIBEIRO et al., 2015) avaliou o efeito da administração de Kp10, também via intracerebroventricular, em ratos machos gonadectomizados e encontraram pico na produção de PRL novamente aos 10 minutos após a administração do peptídeo e de maneira dependente da dose. Entretanto, a administração de Kp10 parece não ter efeito na liberação de PRL se aplicada via intravenosa em ovelhas e macacos (RAMASWAMY; GIBBS; PLANT, 2009; SMITH; SALEH; CLARKE, 2009). E, de acordo com estes achados, nosso estudo não encontrou alterações nos níveis de PRL plasmática no grupo tratado com Kp10 por via s.c. Possivelmente, a dose utilizada juntamente com a via de tratamento escolhida no presente estudo, não foram eficazes na estimulação da liberação sistêmica de PRL.

Sabe-se do papel intrínseco dos hormônios esteroides sexuais para o desenvolvimento e manutenção normal do esqueleto durante a vida adulta, posto que a deficiência hormonal está diretamente relacionada à progressiva perda da massa óssea (BILEZIKIAN, 2002; KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). Tanto em homens quanto em outros animais, a relação da privação de testosterona com a baixa BMD está bem estabelecida (KOTWAL et al., 2018; SHIGEHARA et al., 2021; WAKLEY et al., 1991). Os dados encontrados no presente trabalho corroboram os estudos de Vanderschuren e colaboradores (1997) e Saki e colaboradores

(2019). Ambos grupos de pesquisadores encontraram redução da BMD no fêmur de ratos machos castrados em comparação com animais Sham. Nossos dados também vão ao encontro do estudo de Martín-Fernández e colaboradores (2020), que mostraram menor BV/TV e Tb.N, e aumento de Tb/Sp, em ratos castrados. A literatura evidencia a ação dos andrógenos no osso trabecular ao mostrar que camundongos machos KO para AR (ARKO) apresentam aumento na reabsorção óssea, resultando em redução trabecular. Mostrando também que a perda óssea nesse modelo animal quando tratado com testosterona é apenas parcialmente evitada (KAWANO et al., 2003). Adicionalmente a este contexto, o grupo de Chiang e colaboradores (2009) estudou a deleção seletiva de AR em osteoblastos de camundongos machos e analisou a massa óssea desses animais até 24 semanas de vida. E assim como em nossos resultados, esses pesquisadores não encontraram diferença significativa quanto ao tamanho do fêmur entre os grupos experimentais, mas observaram redução na BMD, BV/TV% e Tb.N na porção trabecular desse osso. Em conjunto, esses dados indicam a ação dos andrógenos sobre osteoblastos através dos AR.

Além da clássica ação dos andrógenos na homeostase óssea, o estudo de Brommage e colaboradores (2014) compilou que deleções dos genes de kisspeptina (*Kiss1*) e seu receptor (*Kiss1r*) estão relacionados com desenvolvimento de osteoporose. O trabalho realizado por Herber e colaboradores (2019) mostrou que a deleção de ER α nos neurônios kisspeptinérgicos do ARC resultou em alta deposição de massa óssea trabecular e cortical em camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) e intactas. Nosso estudo expande estes achados prévios e sugere uma ação direta *in vivo* da kisspeptina no remodelamento ósseo. A partir de nossos achados, podemos dizer que o tratamento crônico com Kp10 foi eficiente para prevenir a reabsorção óssea trabecular perante a falta de testosterona em machos. Observamos também a eficácia do antagonista de kisspeptina ao bloquear a ação da Kp10, indicando que trata-se de um efeito via Kiss1r.

A reabsorção óssea na porção cortical do fêmur de ratos, gerada pela orquiectomia, já havia sido observada por Vanderschueren e colaboradores (1992). Os autores relataram redução de 12% na espessura da porção cortical óssea de ratos ORX 4 meses após à castração. Adicionalmente, um outro estudo relatou redução na porção cortical da tíbia 5 meses após a orquiectomia em ratos (AMUGONGO et al., 2014). E em concordância com os achados acima Kawano e colaboradores (2003) e Chiang e colaboradores (2009) também relataram redução na espessura da porção osso cortical em ratos machos deficientes de AR. Estes estudos encontraram diminuição da espessura do fêmur cortical nos animais com 8 e 12 semanas de idade, respectivamente. Contudo, ao contrário dos estudos mencionados, não encontramos, no presente trabalho, efeito da castração na microarquitetura femoral cortical entre os grupos Sham e ORX, mediante os parâmetros analisados na μ CT. Além de o osso cortical possuir uma função mais estrutural e não tão metabólica, como é o caso do osso trabecular, uma possível explicação para a divergência entre os resultados do presente estudo e dos demais trabalhos citados envolve a diferença no protocolo utilizado quanto ao tempo entre a castração e a eutanásia dos animais. Além disso, os estudos realizados com camundongos ARKO refletem o efeito congênito na remodelação óssea, diferentemente do nosso trabalho, onde analisamos os animais na fase adulta. Com relação aos dados inéditos encontrados no presente estudo, referentes à ação estimulatória do tratamento com Kp10 no osso cortical, ainda precisamos de maiores estudos, com protocolos apropriados para avaliar melhor a ação desse peptídeo na porção cortical do osso.

O aumento na remodelação óssea após orquiectomia está diretamente relacionado com alterações celulares, sendo os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos as três principais células do tecido ósseo (CHIANG et al., 2009; KAWANO et al., 2003). Estudos demonstraram que a deleção do AR em osteoblastos e osteócitos ocasionam alterações no volume do osso trabecular (CHIANG et al., 2009; SINNESAEEL et al., 2012). E assim como no presente estudo, Yarrow e

colaboradores (2008) verificaram aumento do número de osteoblastos em ratos submetidos à orquiectomia em relação ao grupo Sham. Sabe-se também que Son e colaboradores (2018) mostraram que o tratamento *in vitro* com Kp10 tem efeito na diferenciação de osteoblastos. Todavia, em nossos resultados, não só observamos aumento no número de osteoblastos no grupo castrado e tratado com Kp10, como também verificamos que seu antagonista, Kp234, foi capaz de bloquear sua ação. Portanto, estes dados indicam que um dos mecanismos de ação da kisspeptina na remodelação óssea é através do aumento da presença de osteoblastos no osso. É conhecida a relação entre a falta dos hormônios esteroides sexuais e o aumento quantitativo de osteoclastos e diminuição da massa óssea (KAWANO et al., 2003; OTTO et al., 2012; SCHOUTENS et al., 1984; ŚLIWIŃSKI et al., 2017). Assim como na literatura, nossos resultados mostram que a castração resultou em aumento na contagem de osteoclastos associada à perda óssea. A similaridade entre o número de osteoclastos do grupo Sham com o grupo castrado que recebeu tratamento com Kp10 indica que a kisspeptina atuou de forma preventiva à osteoclastogênese, e que o antagonista Kp234 impediu tal prevenção. Portanto, a kisspeptina é capaz de modular tanto a quantidade de osteoblastos quanto osteoclastos no tecido ósseo, o que confere a base celular de seu efeito de impedir a perda óssea causada pela ausência de testosterona.

Os hormônios esteroides sexuais impactam potencialmente o metabolismo ósseo através de um processo inflamatório estéril regulado por citocinas e genes, como *Rankl* e *Opg* (AMIN et al., 2019). A literatura aborda que o modelo animal de fêmeas OVX demonstra aumento dos níveis de *RankL*, no tecido ósseo e no baço, associado à perda de massa óssea (MIYAZAKI et al., 2004; YONEDA et al., 2004). Quanto ao efeito do *Opg* sobre o tecido ósseo, o grupo de Ominsky e colaboradores (2008) ao analisar os efeitos do tratamento crônico com *Opg* em ratas OVX percebeu redução na superfície de osteoclastos e prevenção da perda óssea no fêmur e na lombar desses animais. Adicionalmente, o estudo de Ross e colaboradores

(2001) apontou que o tratamento com *Opg* em ratos intactos gerou aumento nos índices de mineralização e força no fêmur desses animais. Os achados do presente estudo mostram que a castração, apesar de gerar efeito deletério ósseo, está seguida pelo aumento da expressão gênica de *Rankl* e *Opg*. Já o tratamento conjunto com Kp10 e Kp234 em ratos ORX, ainda que bloqueando o efeito da Kp10 sobre a perda óssea, resultou em perfil gênico similar aos ratos ORX tratados com Kp10. Esses dados indicam que o receptor Kiss1r não parece estar envolvido nestes efeitos gênicos da Kp10. Assim, mais estudos precisam ser realizados para compreender o efeito da kisspeptina na expressão gênica relacionada ao metabolismo ósseo.

A literatura aponta o *Runx2* como fator essencial para a diferenciação osteoblástica, uma vez que animais com baixa expressão dessa proteína apresentam depressão na formação óssea por interrupção da osteoblastogênese (KOMORI et al., 1998; OTTO et al., 1997; TAKARADA et al., 2016). Mas diferentemente do que era esperado, no presente estudo a expressão de *Runx2* encontra-se elevada no fêmur do grupo castrado que, na análise histomorfológica, apresentou também redução de osteoblastos e aumento no número de osteoclastos. Curiosamente, um trabalho realizado por Geoffrey e colaboradores (2002), mostrou que camundongos com alta expressão de *Runx2* apresentaram um perfil de osteopenia grave devido aumento da atividade osteoclastogênica. Apesar de observarmos o efeito protetor do tratamento com Kp10 na massa óssea, o peptídeo apresentou efeito inibitório sobre a expressão gênica de *Runx2*. Assim, próximos estudos devem aprofundar no entendimento sobre os efeitos da kisspeptina sobre a expressão de fatores reguladores ósseos, que ainda precisam ser melhor entendidos.

7. CONCLUSÃO

A dose administrada de Kp10 não foi suficiente para alterar as concentrações de LH, testosterona, E2 ou prolactina em ratos ORX. Entretanto, o tratamento s.c. crônico com o

peptídeo preveniu a perda óssea no fêmur trabecular dos ratos com baixos níveis de testosterona, com correspondente aumento quantitativo de osteoblastos e diminuição de osteoclastos. O tratamento crônico com kisspeptina também gerou efeito molecular, restabelecendo os níveis de *Rankl*, *Opg* e *Runx2*. Esses achados sugerem um efeito sistêmico da kisspeptina no osso, levando a um balanço geral positivo entre a deposição e a taxa de reabsorção tecidual em condição de ausência de andrógenos. Nosso estudo contribui então para o esclarecimento dos efeitos ósseos da kisspeptina em um modelo de perda óssea induzida pela redução dos níveis de testosterona, abrindo perspectivas para o melhor entendimento e futuras aplicações desta ação periférica do peptídeo.

REFERÊNCIAS

- ADLER, R. A. Osteoporosis in men: A review. **Bone Research**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2014.
- ALMEIDA, M. et al. Estrogens attenuate oxidative stress and the differentiation and apoptosis of osteoblasts by DNA-binding-independent actions of the ER α . **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 769–781, 2010.
- ALMEIDA, M. et al. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 135–187, 2017.
- AMIN, N. et al. Probiotics and bone disorders: the role of RANKL/RANK/OPG pathway. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 3, p. 363–371, 2019.
- AMUGONGO, S. K. et al. Effect of sequential treatments with alendronate, parathyroid hormone (1-34) and raloxifene on cortical bone mass and strength in ovariectomized rats. **Bone**, v. 67, p. 257–268, 2014.
- ANONYMOUS. Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 94, n. 6, p. 646–650, 1993.
- ANTONIO, J.; WILSON, J. D.; GEORGE, F. W. Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 6, p. 2016–2019, 1999.
- AQUINO, N. S. S. et al. α -estrogen and progesterone receptors modulate Kisspeptin effects on prolactin: Role in estradiol-induced prolactin surge in female rats. **Endocrinology**, v. 158, n. 6, p. 1812–1826, 2017.
- BAGATELL, C.; BREMMER, W. Androgens in men — uses and abuses. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 11, p. 707–715, 1996.

- BELLIDO, T. Osteocyte-driven bone remodeling. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 25–34, 2014.
- BILEZIKIAN, J. P. Sex steroids, mice, and men: When androgens and estrogens get very close to each other. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 4, p. 563–566, 2002.
- BOYCE, B. F. et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 12, p. 1332–1341, 2012.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 337–342, 2003.
- BROMMAGE, R. et al. High-throughput screening of mouse gene knockouts identifies established and novel skeletal phenotypes. **Bone Research**, v. 2, n. 1, p. 1–30, 2014.
- CHIANG, C. et al. Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 4, p. 621–631, 2009.
- CLARKE, I. J. Hypothalamus as an endocrine organ. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 217–253, 2015.
- COOPER, C.; FERRARI, S. IOF Compendium of osteoporosis, 2nd edition. **International Osteoporosis Foundation**, p. 1–92, 2019.
- CUMMINGS, S. R. et al. Risk Factors for Hip Fracture in White Women. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 12, p. 767–773, 1995.
- DALLAS, S. L.; PRIDEAUX, M.; BONEWALD, L. F. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 5, p. 658–690, 2013.
- DE LAET, C. E. D. H.; POLS, H. A. P. Fractures in the elderly: Epidemiology and demography. **Baillière's Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 171–179, 2000.
- DE LIMA, D. C. et al. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, n. 4, p. 361–373, 2008.
- DERBY, C. A. et al. Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: The Massachusetts Male Ageing Study. **Clinical Endocrinology**, v. 65, n. 1, p. 125–131, 2006.
- DIAMOND, T. H. et al. Osteoporosis in men with prostate carcinoma receiving androgen-deprivation therapy: Recommendations for diagnosis and therapies. **Cancer**, v. 100, n. 5, p. 892–899, 2004.
- DIRCKX, N. et al. The role of osteoblasts in energy homeostasis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 11, p. 651–665, 2019.
- DUNGAN, H. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1154–1158, 2006.
- ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219–227, 2010.
- FALAHATI-NINI, A. et al. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating

- bone resorption and formation in normal elderly men. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1553–1560, 2000.
- FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 121–145, 2011.
- FROST, H. M. A new direction for osteoporosis research: A review and proposal. **Bone**, v. 12, n. 6, p. 429–437, 1991.
- GEOFFROY, V. et al. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing *Cbfa1/Runx2* in cells of the osteoblastic lineage. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 17, p. 6222–6233, 2002.
- GEORGE, J. T. et al. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: Kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. **Clinical Endocrinology**, v. 79, n. 1, p. 100–104, 2013.
- GOLDS, G.; HOUDEK, D.; ARNASON, T. Male hypogonadism and osteoporosis: The effects, clinical consequences, and treatment of testosterone deficiency in bone health. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, p. 1–15, 2017.
- GOMES, N. A. et al. Mandibular-related bone metabolism in orchietomized rats treated with sex hormones. **Archives of Oral Biology**, v. 122, n. 105000, p. 1–7, 2021.
- GOTTSCH, M. L. et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4073–4077, 2004.
- GRATTAN, D. R.; SZAWKA, R. E. Kisspeptin and prolactin. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 37, n. 2, p. 93–104, 2019.
- HARADA, S. I.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349–355, 2003.
- HARING, R. et al. Prevalence, incidence and risk factors of testosterone deficiency in a population-based cohort of men: Results from the study of health in Pomerania. **Ageing Male**, v. 13, n. 4, p. 247–257, 2010.
- HARTER, C. J. L.; KAVANAGH, G. S.; SMITH, J. T. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 238, n. 3, p. 173–183, 2018.
- HERBER, C. B. et al. Estrogen signaling in arcuate *Kiss1* neurons suppresses a sex-dependent female circuit promoting dense strong bones. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.
- HERNLUND, E. et al. Osteoporosis in the European Union: Medical management, epidemiology and economic burden. **Archives of Osteoporosis**, v. 8, n. 1, p. 1–115, 2013.
- HINES, M. Prenatal endocrine influences on sexual orientation and on sexually differentiated childhood behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 32, n. 2, p. 170–182, 2011.
- HOOPER, A. C. B.; BRIEN, T. G.; LAWLOR, P. G. The effects of orchidectomy and the role of testosterone in determining the growth of male mice selected for increased body weight. **Andrologia**, v. 18, n. 5, p. 509–515, 1986.
- HUANG, H. et al. Leydig-like cells derived from reprogrammed human foreskin fibroblasts by CRISPR/dCas9 increase the level of serum testosterone in castrated male rats. **Journal of**

- Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 7, p. 3971–3981, 2020.
- IAIN H. KALFAS. Principles of bone healing. **Neurosurgical Focus**, v. 10, n. 4, p. 1–4, 2001.
- JOHNELL, O. et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 7, p. 1185–1194, 2005.
- KAMEDA, T. et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 4, p. 489–495, 1997.
- KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, v. 8, n. 3, p. 147–159, 2002.
- KATZNELSON, L. et al. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, n. 12, p. 4358–4365, 1996.
- KAUFMAN, J. M.; VERMEULEN, A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 6, p. 833–876, 2005.
- KAWANO, H. et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9416–9421, 2003.
- KHOSLA, S.; MELTON, L. J.; RIGGS, B. L. Estrogens and bone health in men. **Calcified Tissue International**, v. 69, n. 4, p. 189–192, 2001.
- KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576–581, 2012.
- KITAURA, H. et al. Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–24, 2020.
- KOMORI, T. et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8692–7, 1998.
- KOTANI, M. et al. The metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34631–34636, 2001.
- KOTWAL, N. et al. A prospective, observational study of osteoporosis in men. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 62–66, 2018.
- KOUSTENI, S. et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: Dissociation from transcriptional activity. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 719–730, 2001.
- LEE, B. S. Myosins in osteoclast formation and function. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 1–16, 2018.
- LEE, J. et al. *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–1737, 1996.
- LORENZO, J. A. et al. Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 3022–3025, 1998.

- MACARI, S. et al. Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 2, p. 333–341, 2015.
- MACARI, S. et al. Kisspeptin acts on bone cells to prevent obesity-induced osteopenia. **9th International Congress of Neuroendocrinology**, 2018a.
- MACARI, S. et al. Lactation induces increases in the RANK/RANKL/OPG system in maxillary bone. **Bone**, v. 110, p. 160–169, 2018b.
- MACKIE, E. J. Osteoblasts: Novel roles in orchestration of skeletal architecture. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, n. 9, p. 1301–1305, 2003.
- MAI, H. T. et al. Two-thirds of all fractures are not attributable to osteoporosis and advancing age: implications for fracture prevention. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 104, n. 8, p. 3514–3520, 2019.
- MANOLAGAS, S. C. et al. Estrogen, cytokines, and the control of osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. **Osteoporosis International**, v. 3, n. 1 Supplement, p. 114–116, 1993.
- MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 115–137, 2000.
- MANOLAGAS, S. C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R. L. Sex steroids and bone. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 385–409, 2002.
- MANOLAGAS, S. C.; O'BRIEN, C. A.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 12, p. 699–712, 2013.
- MANOLAGAS, S.; JILKA, R. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **New England journal of medicine**, v. 332, n. 5, p. 10–12, 1995.
- MARTÍN-FERNÁNDEZ, M. et al. Comparative study of the effects of osteoprotegerin and testosterone on bone quality in male orchidectomised rats. **The Aging Male**, v. 23, n. 3, p. 189–201, 2020.
- MITTAN, D. et al. Bone loss following hypogonadism in men with prostate cancer treated with GnRH analogs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 8, p. 3656–3661, 2002.
- MIYAZAKI, T. et al. Changes in receptor activator of nuclear factor- κ B, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 93, n. 3, p. 503–512, 2004.
- MORGAN, E.; UNNIKRSNAN, G.; HUSSEIN, A. Bone mechanical properties in healthy and diseased States. **Annual review of biomedical engineering**, v. 20, p. 119–143, 2018.
- MUN, S. H.; PARK, P. S. U.; PARK-MIN, K. H. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1239–1254, 2020.
- NAKAMURA, T. et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of fas ligand in osteoclasts. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 811–823, 2007.
- NAVARRO, V. M. et al. Effects of Kiss-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-

- stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1689–1697, 2005a.
- NAVARRO, V. M. et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 156–163, 2005b.
- OHTAKI, T. et al. Metastasis suppressor gene Kiss-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, 2001.
- OJEDA, S. R.; RAMIREZ, V. D. Short-term steroid treatment on plasma LH and FSH in castrated rats from birth to puberty. **Neuroendocrinology**, v. 12, n. 1, p. 100–114, 1973.
- OMINSKY, M. S. et al. RANKL inhibition with osteoprotegerin increases bone strength by improving cortical and trabecular bone architecture in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 5, p. 672–682, 2008.
- OTTO, C. et al. Estradiol release kinetics determine tissue response in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 1725–1733, 2012.
- OTTO, F. et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 765–771, 1997.
- PARFITT, A. M. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: Cellular mechanisms and biomechanical consequences. **Calcified Tissue International**, v. 36, n. 1 Supplement, 1984.
- PIETSCHMANN, P. et al. Europe PMC funders group immunology of osteoporosis : A mini-review. **Gerontology**, v. 62, n. 2, p. 128–137, 2016.
- PINILLA, L. et al. Kisspeptins and reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1235–1316, 2012.
- RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.
- RAMASWAMY, S.; GIBBS, R. B.; PLANT, T. M. Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 10, p. 795–804, 2009.
- RIBEIRO, A. B. et al. Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, n. 2, p. 88–99, 2015.
- RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 763–773, 1998.
- ROSS, A. B. et al. The effects of osteoprotegerin on the mechanical properties of rat bone. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n. 7, p. 583–588, 2001.
- SAKI, F. et al. The effect of testosterone itself and in combination with letrozole on bone mineral density in male rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 37, n. 4, p. 668–675, 2019.
- SANTORO, N. et al. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the

- perimenopause. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, n. 4, p. 1495–1501, 1996.
- SATTLER, A. M. et al. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. **Calcified Tissue International**, v. 74, n. 1, p. 103–106, 2004.
- SCHOUTENS, A. et al. Growth and bone haemodynamic responses to castration in male rats. Reversibility by testosterone. **European Journal of Endocrinology**, v. 107, n. 3, p. 428–432, 1984.
- SEEMAN, E. Bone modeling and remodeling. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 10, n. 3–4, p. 219–233, 2000.
- SEIFERT-KLAUSS, V. et al. Bone loss in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women: Results of a prospective observational study over 9 years. **Climacteric**, v. 15, n. 5, p. 433–440, 2012.
- SHIGEHARA, K. et al. Testosterone and bone health in men: A narrative review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 3, p. 530, 2021.
- SILVA, J. et al. Estradiol potentiates but is not essential for prolactin-induced suppression of LH pulses in female rats Juneo. **Endocrinology**, v. 161, n. 6, p. 1–32, 2020.
- SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 444–451, 2008.
- SINNESAEI, M. et al. Androgen receptor (AR) in osteocytes is important for the maintenance of male skeletal integrity: Evidence from targeted AR disruption in mouse osteocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 12, p. 2535–2543, 2012.
- ŚLIWIŃSKI, L. et al. Effects of fenoterol on the skeletal system depend on the androgen level. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 260–267, 2017.
- SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3686–3692, 2005.
- SMITH, J. T.; SALEH, S. N. H.; CLARKE, I. J. Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the Ewe. **Neuroendocrinology**, v. 90, n. 3, p. 283–291, 2009.
- SON, H. E. et al. Kisspeptin-10 (KP-10) stimulates osteoblast differentiation through GPR54-mediated regulation of BMP2 expression and activation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2–10, 2018.
- SRIVASTAVA, S. et al. Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 10, p. 1850–1859, 1998.
- STEFFENS, J. P. et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. **Hormones et métabolisme**, v. 46, n. 3, p. 193–200, 2014.
- SZAWKA, R. E. et al. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3247–3257, 2010.
- TAKARADA, T. et al. Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. **Development**, v. 143, n. 2, p. 211–218, 2016.

- TEITELBAUM, S. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504–1508, 2000.
- TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638–649, 2003.
- TEK, M. et al. The effect of testosterone replacement therapy on bladder functions and histology in orchietomized mature male rats. **Urology**, v. 75, n. 4, p. 886–890, 2010.
- THOMPSON, E. L. et al. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, p. 1074–1083, 2006.
- THOMSON, E. L. et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, n. 10, p. 850–858, 2004.
- TOLSON, K. P. et al. Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 3075–3079, 2014.
- TOLSON, K. P. et al. Cre/lox generation of a novel whole-body Kiss1r KO mouse line recapitulates a hypogonadal, obese, and metabolically-impaired phenotype. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 498, n. 110559, p. 1-8, 2019.
- TRAVISON, T. G. et al. The relative contributions of aging, health, and lifestyle factors to serum testosterone decline in men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 549–555, 2007.
- UDAGAWA, N. et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 1, p. 19–26, 2020.
- ULLAH, H. et al. Age-dependent changes in the reproductive axis responsiveness to kisspeptin-10 administration in healthy men. **Andrologia**, v. 51, n. 4, p. 1–9, 2019.
- VANDERSCHUEREN, D. et al. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. **Endocrinology**, v. 130, n. 5, p. 2906–2915, 1992.
- VANDERSCHUEREN, D. et al. Aromatase inhibition impairs skeletal modeling and decreases bone mineral density in growing male rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 6, p. 2301–2307, 1997.
- VANDERSCHUEREN, D. et al. Sex steroid actions in male bone. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 6, p. 906–960, 2014.
- VICO, L.; VANACKER, J. M. Sex hormones and their receptors in bone homeostasis: Insights from genetically modified mouse models. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 3, p. 365–372, 2010.
- WAKLEY, G. K. et al. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 4, p. 325–330, 1991.
- WEAVER, C. M. et al. The National Osteoporosis Foundation’s position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 4, p. 1281–1386, 2016.
- WEINER, S.; WAGNER, H. D. The material bone: Structure-mechanical function relations. **Annual Review of Materials Science**, v. 28, n. 1, p. 271–298, 1998.

YARROW, J. F. et al. Supraphysiological testosterone enanthate administration prevents bone loss and augments bone strength in gonadectomized male and female rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 5, p. 1213–1223, 2008.

YONEDA, T. et al. Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-mediated osteoclastogenesis. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2384–2391, 2004.

ZHANG, J.; DENNISON, E.; PRIETO-ALHAMBRA, D. Osteoporosis epidemiology using international cohorts. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 32, n. 4, p. 387–393, 2020.