

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Biofísica

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E DE NEURÔNIOS
HIPOTALÂMICOS NOS EFEITOS TERMORREGULATÓRIOS DO ESTRÓGENO
EM MODELO ANIMAL DE ONDAS DE CALOR DA MENOPAUSA**

Cristina dos Santos Fonseca

Belo Horizonte

2016

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Biofísica

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E DE NEURÔNIOS
HIPOTALÂMICOS NOS EFEITOS TERMORREGULATÓRIOS DO ESTRÓGENO
EM MODELO ANIMAL DE ONDAS DE CALOR DA MENOPAUSA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

Co-orientador: Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka

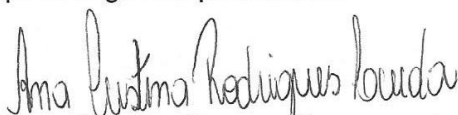
Belo Horizonte

2016

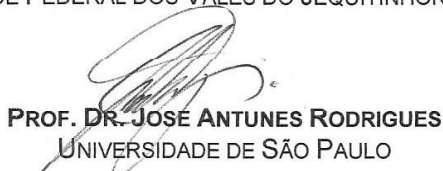
**"ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E
NEURÔNIOS HIPOTALÂMICOS NOS EFEITOS
TERMORREGULATÓRIOS DO ESTRÓGENO EM MODELO
ANIMAL DE ONDAS DE CALOR DA MENOPAUSA"**

CRISTINA DOS SANTOS FONSECA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **03 de maio de 2016**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



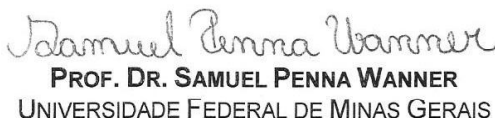
PROFA. DR^a. ANA CRISTINA RODRIGUES LACERDA
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI



PROF. DR. JOSÉ ANTUNES RODRIGUES
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



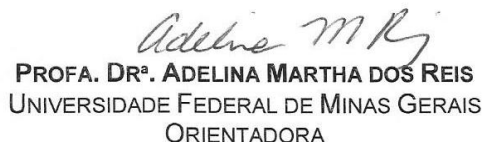
PROF. DR. FERNANDO MARCOS DOS REIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. SAMUEL PENNA WANNER
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. RAPHAEL ESCORSIM SZAWKA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR



PROFA. DR^a. ADELINA MARTHA DOS REIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 03 de maio de 2016

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos meus amores, Andre e Olivia.

“The world ain't all sunshine and rainbows. It is a very mean and nasty place. It will beat you to your knees and keep you there permanently if you let it. You, me or nobody is going to hit as hard as life. But it ain't about how hard you're hit, it is about how hard you can get hit and keep moving forward, how much can you take and keep moving forward. That's how winning is done!”

Rocky Balboa, 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, por todo apoio, conselhos, amor e dedicação em todos os momentos da minha vida. Pelo seu exemplo de determinação e trabalho árduo.

Aos meus irmãos Priscila, Fábio e Alexandre pelo apoio, carinho e incentivos.

Aos meus queridos sobrinhos, Pedro, Sabrina e Vitor que me dão a alegria de viver.

Aos meus avós, Joaquim e Filomena, por terem me criado e me educado, terem me dado todo amor e suporte necessários.

Ao meu marido, André, pelo amor, apoio, companheirismo e incentivos em todos os momentos. Pela ajuda na construção e padronização dos contêntores utilizados nos experimentos. Por nunca me deixar desistir dos meus sonhos perante as dificuldades. Por estar ao meu lado nessa próxima jornada que se inicia com a chegada da nossa Olivia. É o amor da minha vida, meu porto seguro e que faz minha vida ter sentido.

À minha amiga Giovanna, em especial, grande companheira de muitos anos, pela amizade, por muitos conselhos valiosos, pelo apoio e incentivo em todas as grandes decisões e conquistas. Por ser uma verdadeira irmã, sempre presente em todos os momentos de alegrias e tristezas. Um ombro amigo nas horas mais difíceis.

À Ludmila e Amanda, que se tornaram grandes amigas queridas ao longo dos anos, sempre me incentivando e dando apoio em todos os momentos.

À toda a família Campagnole e Santos pelo apoio e incentivo. Por me acolherem com todo carinho.

Aos meus orientadores, Adelina e Rafael, por me aceitarem como aluna, confiando na minha competência, pela amizade, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em todos os momentos e exemplo de dedicação à carreira científica.

RESUMO

As ondas de calor são caracterizadas por ativação inapropriada e coordenada de mecanismos de dissipação de calor e são efetivamente tratadas com reposição hormonal estrogênica. Os estrogênios promovem efeitos pronunciados sobre a termorregulação, mas as áreas cerebrais de integração entre reprodução e controle termorregulatório, assim como os mecanismos fisiológicos envolvidos, são ainda pouco conhecidos. Neste trabalho, avaliamos a inter-relação entre neurônios noradrenérgicos e núcleos hipotalâmicos no efeito vasomotor do 17β -estradiol (E2), em especial o papel dos neurônios produtores de kisspeptina (Kp) do núcleo arqueado (ARC) neste efeito estrogênico. Ratas adultas foram ovariectomizadas e implantadas com cápsulas subcutâneas contendo óleo (OVX) ou E2 (OVX+E2), como modelo animal de efeitos vasomotores do E2. A temperatura da cauda (TC) foi mensurada por 1 a 4 horas em diferentes períodos após a cirurgia. Os animais foram perfundidos pela manhã e os cérebros foram processados para realização de imunohistoquímica. A atividade neuronal foi avaliada por contagem do número de células marcadas para Fos em núcleos do tronco cerebral e hipotálamo. A TC apresentou-se aumentada nas ratas OVX em relação às OVX+E2 aos 7 e 14 dias após a ovariectomia. No dia 14, detectou-se maior expressão de Fos em neurônios noradrenérgicos do A1, A2 e locus coeruleus (LC), bem como em núcleos da área preóptica (APO) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratas OVX em comparação às OVX+E2. As ratas OVX também apresentaram maior número de neurônios Kp co-localizados com Fos no ARC. Além disso, houve uma correlação positiva entre a TC e a expressão de Fos na MPO (núcleo preóptico medial) AVPV (Núcleo anteroventral periventricular), PVN, ARC (núcleo arqueado), A1 e A2 e LC. Em um segundo

experimento, foi avaliado o efeito da redução da liberação da noradrenalina (NA) central sobre a TC e a expressão do gene *Kiss1* no AVPV e ARC. Para tanto, ratas OVX e OVX+E2 receberam injeções intracerebroventriculares (ICV) diárias do agonista α 2-adrenérgico clonidina (OVX+CLO; 10 μ g/3 μ L/rata) ou salina (OVX+V; OVX+E2+V) nos dias 12, 13 e 14 após a ovariectomia. As ratas OVX+V apresentaram maior TC do que as ratas OVX+E2+V, e esta resposta foi restaurada no grupo OVX+CLO, cuja TC foi semelhante ao grupo OVX+E2+V. A expressão do RNAm para *Kiss1* no ARC foi maior no grupo OVX do que no OVX+E2, e este aumento também foi revertido nas ratas OVX+CLO, demonstrando correlação significativa com os níveis de TC. Por outro lado, a clonidina aumentou significativamente a expressão de *Kiss1* no AVPV em relação aos grupos controles (OVX+V e OVX+E2+V), sendo esta resposta associada a uma maior secreção de hormônio luteinizante (LH) nas ratas OVX+CLO. Em conclusão, os resultados do nosso trabalho demonstram que o aumento da TC causado pela ausência de E2 está associado a uma maior atividade de núcleos noradrenérgicos e hipotalâmicos e parece depender da ativação dos neurônios Kp do ARC pela NA central. Estes achados contribuem para o melhor entendimento sobre os mecanismos responsáveis pelas ondas de calor da menopausa.

Palavras chaves: Menopausa, estradiol, terapia de reposição hormonal, clonidina, kisspeptina.

ABSTRACT

Hot flashes consist of episodic activation of heat dissipation mechanisms and are effectively treated by estrogen replacement. Estrogen has pronounced effects on thermoregulation, but the anatomic sites of integration between the reproductive and thermoregulatory axes are unknown as are the physiological mechanisms. In this work, the interrelationship between noradrenergic neurons and hypothalamic nuclei in the vasomotor effect of 17β -estradiol (E2) was evaluated, in particular the role of kisspeptin-producing neurons (Kp) of the arcuate nucleus (ARC). Adult female rats were ovariectomized and implanted with subcutaneous capsules containing oil (OVX) or E2 (OVX + E2), as an animal model of vasomotor effects of E2. The temperature of the tail (TC) was measured for 1 to 4 hours at different times after surgery. Animals were perfused in the morning and the brains were processed for immunohistochemistry. Neuronal activity was evaluated by counting the number of cells stained for Fos in hypothalamus and brain stem nuclei. The TC was increased in OVX rats compared to OVX + E2 after 7 and 14 days after ovariectomy. On day 14, an increased expression of Fos was detected in noradrenergic neurons of A1, A2 and locus coeruleus (LC), as well as nuclei of the preoptic area (APO) and the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) OVX rats compared to OVX + E2. OVX rats also showed a higher number of neurons Kp co-located with Fos in the ARC. Furthermore, there was a positive correlation between CT and Fos expression in the MPO (medial preoptic nucleus), AVPV (anteroventral periventricular nucleus), PVN, ARC, A1 and A2 and LC. In a second experiment, we evaluated the effect of reducing the central release of noradrenaline (NA) on TC and the expression of the

gene in Kiss1 in the AVPV and ARC. For that, OVX and OVX + E2 rats received intracerebroventricular injections (ICV) daily of α 2-adrenergic clonidine agonist (OVX + CLO; 10 g / 3 μ L / rat) or saline (OVX + V; OVX + E2 + V) on days 12, 13 and 14 after ovariectomy. OVX + V rats showed higher TC than OVX + E2 + V rats, and this response was restored in OVX + CLO group whose TC was similar to OVX + E2 + V group. The mRNA expression Kiss1 the ARC was higher in OVX group than in OVX + E2, and this increase was also reversed the OVX + CLO rats, demonstrating a strong correlation with TC levels. On the other hand, clonidine significantly increased Kiss1 expression in AVPV compared to control groups (OVX + V and OVX + E2 + V). This response was associated with an increased secretion of luteinizing hormone (LH) in OVX + CLO rats. In conclusion, the results of this study show that the increase in TC caused by the absence of E2 is associated with an increased activity of noradrenergic and hypothalamic nuclei and seems to depend on activation of ARC neurons by the central Kp. These findings contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the menopausal hot flashes.

Keywords: Menopause, estradiol, hormonal replacement therapy, clonidine, kisspeptin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

Durante o último século, com o aumento da expectativa de vida, as mulheres passaram a viver mais de um terço de suas vidas após o período de menopausa. No ano 2000, 31 milhões das mulheres nos Estados Unidos estavam no estágio pós-menopausa, e estima-se que serão 46 milhões em 2020 (Weismiller, 2009).

Sintomas da perimenopausa variam de leve a grave, com um dos sintomas clássicos sendo as ondas de calor. Este sintoma é relatado como uma sensação morna ou quente, que muitas vezes começa no topo da cabeça e avança em direção aos pés. O couro cabeludo, face e pescoço são essencialmente afetadas, mas às vezes a sensação é relatada como sendo de todo o corpo. Sintomas concomitantes incluem palpitações, ansiedade, irritabilidade, e sudorese noturna (Hazel, 2003).

As ondas de calor são tipicamente mais frequentes e graves à noite (muitas vezes despertando a mulher do sono) ou durante períodos de estresse, tendo um grande impacto na qualidade de vida das mesmas (Hazel, 2003).

A terapia hormonal é o tratamento mais efetivo para as ondas de calor, com redução de mais de 70% da frequência das mesmas (Bachmann, 1999). Entretanto, há várias situações em que a terapia de reposição hormonal é contraindicada.

Devido ao grande impacto das ondas de calor na qualidade de vida das mulheres e o fato de várias mulheres com ondas de calor não poderem receber tratamentos hormonais, novas pesquisas são necessárias a fim de desvendar a fisiologia e os mecanismos de geração das ondas de calor para desenvolver drogas eficientes que possam eliminar este sintoma sem riscos à saúde.

1.2. Revisão da literatura

1.2.1. Estrogênios e Menopausa

Os estrogênios, hormônios pertencentes ao grupo dos esteroides, derivados do precursor colesterol, são essenciais para a fisiologia normal feminina e reprodução, mas também desempenham importante papel em vários tecidos corporais, como no sistema cardiovascular, sistema musculoesquelético, cérebro, entre outros (Wend et al., 2012).

Os estrogênios exercem suas ações em células e tecidos alvos ativando receptores intracelulares (mecanismo genômico) ou ligando-se a estruturas na membrana celular (mecanismo não-genômico). Dois tipos de receptores clássicos podem ser encontrados em diferentes tecidos: ER α (receptor alfa de estrogênio) e ER β (receptor beta de estrogênio) (Kuiper et al., 1996; McEwen e Alves, 1999). Os dois subtipos de receptores diferem entre si de acordo com as características específicas e funcionais dos tecidos. ER α é expresso em grau alto ou moderado no útero, testículo, hipófise, ovários, rins e epidídimo, enquanto o ER β é abundante na próstata, ovários, pulmão, bexiga, cérebro, ossos, útero e testículo (Strauss e Barbieri, 2004).

Os estrogênios são produzidos pelos folículos ovarianos e, durante a gestação, pela unidade fetoplacentária e abrangem três principais formas fisiológicas: estradiol, estriol e a estrona. Estradiol é o mais potente deles, seguido pela estrona e então pelo estriol. O Estradiol ou 17 β -estradiol (E2) é uma forma importante de estrogênio em mulheres durante a sua fase reprodutiva. Em contraste, a estrona é uma forma predominantemente em mulheres na pós-menopausa e estriol é formado principalmente durante a gravidez (Strauss e Barbieri, 2004).

A senescência ovariana é um processo gradual que começa em torno dos 35 anos de idade e que culmina na menopausa por volta dos 51 anos de idade. Esse declínio na função ovariana é evidenciado por uma diminuição progressiva na fecundidade e aumento de falhas e irregularidades menstruais na segunda metade da quarta década de vida e dos anos que seguem (Al-Azzawi e Palacios, 2009).

Em 1900, a expectativa de vida da mulher era de 54 anos, nos Estados Unidos. Hoje, em países industrializados, as mulheres podem viver, em média, 83 anos (Singh et al., 1996). Por outro lado, a idade da menopausa espontânea permaneceu

estável, ao redor de 50 anos de idade, como era no passado. Devido ao fato de que agora as mulheres podem viver mais de um terço de suas vidas após a menopausa, novas pesquisas são indispensáveis para se prevenir os efeitos deletérios da menopausa que comprometem a sua qualidade de vida (Sherwin, 2003; Strauss e Barbieri, 2004).

O envelhecimento reprodutivo em mulheres é uma progressão natural que ocorre em três fases: a reprodução, a perimenopausa e finalmente a menopausa (Steiner, 2011). O climatério representa a transição gradual da fase reprodutiva para a não reprodutiva. A menopausa é a última menstruação e seu diagnóstico clínico é feito de forma retrospectiva quando a amenorréia atinge 12 meses. A perimenopausa caracteriza-se pelo espaço de tempo imediatamente anterior e posterior ao momento da última menstruação, com duração variável de 12 a 24 meses. No climatério ocorrem alterações morfológicas (atrofia mamária e urogenital), funcionais (distúrbios menstruais e sintomas vasomotores), hormonais (queda dos níveis estrogênicos, da progesterona e elevação dos níveis de gonadotrofinas) (Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, 1995).

A carência estrogênica está associada com múltiplas alterações do organismo, incluindo os sintomas vasomotores, incontinência urinária, osteoporose, disfunção sexual, problemas relacionados ao sono, distúrbios cognitivos e de humor (Grady, 2006; Teixeira, 2002). Na maioria das mulheres, o declínio da concentração estrogênica na menopausa causa distúrbios vasomotores, conhecidos como ondas de calor, uma desordem da termorregulação hipotalâmica (Kronenberg, 2010). As ondas de calor são caracterizadas por sensação intensa de calor com ativação transitória e coordenada de efetores de dissipação de calor, incluindo vasodilatação periférica, sudorese e mudanças comportamentais. Mulheres frequentemente descrevem esses episódios como períodos recorrentes de vermelhidão, sudorese e um intenso calor que começa na face e tórax e espalha-se por todo o corpo (Freedman, 2001). Os episódios de ondas de calor duram, em geral, de 1 a 5 minutos, mas uma porcentagem pequena de mulheres relatam duração maior do que quinze minutos (Kronenberg, 1990). A prevalência desse sintoma pode variar entre 60 e 80%, com alta prevalência em mulheres brancas e baixa prevalência em mulheres japonesas e chinesas (Gold et al., 2006). Para a maioria das mulheres, os sintomas vasomotores iniciam-se no período pré-menopausa, com o pico

coincidindo com o final do período menstrual (menopausa). Eventualmente a frequência e severidade dos sintomas diminuem no período pós-menopausa, com média de duração de 4 anos. No entanto, em alguns casos podem chegar a 20 anos ou até mesmo até o final da vida (Rödström et al., 2002; Guthrie et al., 2004; Avis et al., 2005; Feldman et al., 1985).

As ondas de calor são o principal motivo que levam as mulheres na menopausa a procurarem tratamento médico, devido ao grande impacto na capacidade funcional e qualidade de vida (Couzi et al., 1995). A reposição estrogênica é muito utilizada para o tratamento das ondas de calor, por ser considerado o tratamento mais efetivo (Gambacciani et al., 2005; Sikin e Thacker, 2004), podendo reduzir a frequência dos sintomas em 90% dos casos (Baerug et al., 1998).

Outros compostos têm sido usados como segunda linha para tratamento das ondas de calor, como a clonidina (agonista α_2 -adrenérgico), alguns antidepressivos e inibidores seletivos de recaptção de serotonina, noradrenalina e dopamina, anticonvulsivantes entre outros. No entanto, essas drogas podem causar efeitos indesejados como boca seca, constipação, coceira, sonolência, tonturas, náuseas e fadiga (Sikin e Thacker, 2004; Pachman et al., 2010), que resultam em descontinuidade do tratamento. Outras formas alternativas para o tratamento incluem isoflavonas e outros compostos derivados de plantas com propriedades estrogênicas, entre eles os derivados de soja. No entanto, estudos têm demonstrado que os resultados são comparáveis aos obtidos com a utilização de placebo (Freedman et al., 2011; Freedman, 2010). Existem também os tratamentos comportamentais que utilizam técnicas de respiração e relaxamento, mas estudos também mostram pouco efeito nos episódios de ondas de calor em relação ao placebo (Freedman, 1992; Irvim et al., 1992).

Na tentativa de esclarecer melhor os mecanismos envolvidos nos sintomas vasomotores causados pela ausência do estrogênio, uma importante ferramenta utilizada é o modelo animal de roedores. Roedores fêmeas tornam-se anovulatórios na idade de 15 e 18 meses (Sengupta, 2013), no entanto mantêm uma secreção basal de esteroides gonadais, em contraste com o que ocorre em mulheres. Apesar de não exibirem uma menopausa verdadeira, através da remoção de seus ovários, esses animais são amplamente utilizados como um bom modelo para mimetizar

estudo das alterações fisiológicas decorrentes da privação hormonal que ocorre em humanos (Baeza et al., 2010).

1.2.2. Termorregulação e ondas de calor

Acredita-se que os sintomas vasomotores sejam o resultado de uma disfunção no circuito de controle da temperatura levando a uma ativação exagerada das respostas de dissipação de calor, incluindo vasodilatação periférica e sudorese.

A homeostase da temperatura é um estado dinâmico de estabilidade entre o ambiente interno e externo do animal. Quando funciona adequadamente, o sistema termorregulatório monitora e mantém a temperatura interna dentro de uma faixa necessária para a ideal integridade de órgãos e suas funções, independente das temperaturas ambientais (Charkoudian, 2003). A zona termoneutra é definida como uma faixa de temperatura ambiente na qual o controle fisiológico da temperatura é realizado apenas por perda de calor seco e sem a ativação de mecanismos responsáveis pelo tremor involuntário. Dentro da zona termoneutra, a temperatura interna é regulada por flutuações entre constrição e dilatação dos vasos sanguíneos da pele para modificar a troca de calor com o ambiente (Romanovsky, 2002).

A regulação da temperatura é controlada por uma rede complexa, altamente regulada e integrada a respostas neuroendócrinas, autonômicas e somatomotoras (Deecher, 2005). A circuitaria termorregulatória é um sistema de retroalimentação bidirecional e as várias fases deste processo podem ser divididas em: detecção de condições ambientais e do estado térmico interno do animal, a transmissão desta informação para o cérebro por vias neurais aferentes, e a iniciação da resposta por sinais eferentes do cérebro (Nakamura e Morrison, 2008).

As áreas do sistema nervoso central que são ativadas por flutuações na temperatura ambiente e que medeiam as respostas fisiológicas a essas flutuações estão localizadas principalmente no hipotálamo (Hasegawa et al., 2000, 2005, 2008). O hipotálamo governa o sistema nervoso endócrino e autonômico, temperatura, frequência cardíaca, estados emocionais e motivacionais, reprodução, balanço energético e hidroeletrólítico e ritmo circadiano (Van den Pol e Trombley, 1993). É uma parte crucial do cérebro para a regulação da homeostase corporal e está envolvido no controle dos efetores termorregulatórios autonômicos. O hipotálamo

apresenta várias subdivisões em áreas e núcleos entre eles, o núcleo paraventricular (PVN), área dorsal hipotalâmica, núcleo dorsomedial (DMH), núcleo premamilar, núcleo ventromedial, núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico, núcleo arqueado (ARC) e área preóptica (APO) (Strauss e Barbieri, 2004). O ARC e o núcleo anteroventral periventricular (AVPV) da APO, onde estão localizados os neurônios kisspeptinérgicos em roedores (Gottsch et al., 2004; Clarkson et al., 2009), desempenham um papel importante em processos reprodutivos ao exercer um potente efeito estimulatório sobre a secreção de gonadotrofinas (Gottsch et al., 2004; Navarro et al., 2004; Navarro et al., 2005).

A APO é considerada o local primário para integração de sinais térmicos originados de diferentes partes do corpo, coordenando a regulação da temperatura corporal (Hori, 1991). Essa área contém vários neurônios termossensíveis que tem sua atividade alterada por mudanças sutis na temperatura hipotalâmica ou na temperatura corporal (Boulant, 1998). Os neurônios sensíveis ao calor são os principais efetores tanto da perda quanto da produção de calor. Esses neurônios geram sinais excitatórios para a perda de calor e sinais inibitórios para a produção de calor através do bloqueio dos neurônios sensíveis ao frio (Nagashima et al., 2000; Romanovsky, 2007). Além disso, a APO contém neurônios sensíveis aos estrogênios, desempenhando um papel crucial para processos reprodutivos, como a geração do pico pré-ovulatório de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) através da ação de estradiol e progesterona (Christian e Moenter, 2010). No geral, a APO atua como um termostato, coletando informações de temperatura e induzindo mudanças fisiológicas e comportamentais que resultam na manutenção da homeostase (Nakamura e Morrison, 2008, 2010; Nakamura 2011).

Outra área importante para processos termorregulatórios é o PVN. Este é primariamente um sítio integrador da atividade nervosa simpática fundamental para regulação cardiovascular (Li et al., 2006; Patel, 2000), no entanto, achados apontam para o envolvimento desse núcleo em vias centrais que modulam a atividade simpática para órgãos efetores termorregulatórios como o tecido adiposo marrom, glândula salivar, vasculatura da cauda, assim como rins e intestino (Cham e Badoer, 2008; Kazuyuki et al., 1998; Smith et al., 1998).

O sistema termorregulatório consiste de três componentes: uma parte sensória aferente, a parte de integração e uma parte de comando eferente. A informação

sobre a temperatura periférica chega ao cérebro através de duas vias. A via espinotalâmica, é importante para a percepção e discriminação da temperatura e para a termorregulação comportamental, a qual a informação é transmitida através do corno dorsal da coluna espinhal para o tálamo ventromedial basal e então ao neocórtex insular. Em uma segunda via, importante para a termorregulação autonômica, a informação é retransmitida do corno dorsal da medula espinhal para o núcleo parabraquial lateral do tronco encefálico e, então, subsequentemente para o núcleo preóptico mediano (MnPO) e para núcleo preóptico medial (MPO), ambos núcleos da APO (Nagashima et al., 2000).

A APO promove sinais de comando para efetores periféricos através de vias eferentes neurais e neuroendócrinas de várias áreas do sistema nervoso central, incluindo grupos neuronais do tronco encefálico e da medula espinhal. Essas vias eferentes a partir da APO projetam-se para o hipotálamo dorsomedial e núcleo da rafe pálida rostral (rRPa) e ambos promovem um impulso simpático excitatório para ativação termoeffetora. A rRPa contém neurônios pré-motores simpáticos que enviam a entrada excitatória essencial para neurônios preganglionares simpáticos para a termogênese do tecido adiposo marrom e para o controle vasomotor cutâneo (Nakamura et al., 2004; Nakamura e Morrison, 2007, 2008).

Múltiplos níveis da circuitaria neural termorregulatória central e periférica, são controlados pelo sistema catecolaminérgico. O hipotálamo é densamente innervado por neurônios noradrenérgicos (Fuxe, 1965). A maioria deles origina-se no núcleo do trato solitário (A1) (68%) e núcleo caudal ventrolateral da medula (A2) (26%), e alguns do Locus coeruleus (LC) (6%) (Lindvall e Bjorkund, 1983). Evidências indicam que aferências de A1 e A2, assim como do LC, projetam-se para APO, PVN e ARC (Liposits, Phelix e Paull, et al., 1986; Swanson e Hartman, 1980; (Makara et al., 1995; Willoughby et al., 1993; Krulich et al., 1982; Anselmo-Franci et al., 1997).

A síntese de noradrenalina (NA) ocorre em neurônios localizados no tronco encefálico, onde foram classificados em sete (A1-A7) grupos de células. A1, A2, A4 e A6 pertencem ao “sistema catecolaminérgico ascendente”, que representa o braço aferente do sistema simpático central com projeções para o prosencéfalo basal e cerebelo. A5 e A7 pertencem ao “sistema catecolaminérgico descendente”, com projeções para a medula espinhal incluindo neurônios pré-ganglionares simpáticos nos segmentos torácicos. Esses neurônios representam o braço eferente do sistema

simpático central que influencia a atividade do sistema simpático periférico (Kvetnansky et al., 2009).

O LC é a principal fonte de NA no cérebro e emite projeções para todo o sistema nervoso central, incluindo hipotálamo, tálamo, hipocampo, córtex cerebral, amígdala e áreas envolvidas na síntese e secreção de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina) (Foote et al., 1983, Wright e Jennes, 1993).

Estudos mostram evidências do envolvimento da noradrenalina como um dos neurotransmissores chaves na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG). Neurônios do tronco encefálico, A1, A2 e LC, expressam receptores de estrogênios e progestágenos (Haywood et al., 1999; Helena et al., 2006) e projetam-se para regiões cerebrais que contém neurônios GnRH (Wright e Jennes, 1993; Espana e Berridge, 2006). Neurônios GnRH encontram-se em aposição próxima a fibras imunorreativas à dopamina β-hidroxilase (DBH) (Jennes et al., 1982) e expressam receptores adrenérgicos (Hosny e Jennes, 1998). Estudos demonstraram que a lesão eletrolítica do LC reduz o teor de NA no MPO e no hipotálamo basal e bloqueia os picos pré-ovulatórios de gonadotrofinas observados durante o proestro, bem como os pulsos de LH (hormônio luteinizante) (Anselmo-Franci et al., 1997; Anselmo-Franci et al., 1999). Acredita-se que estes efeitos se devam a diminuição da liberação de GnRH (Anselmo-Franci et al., 1997, Helena et al., 2002, Martins-Afferri et al., 2003).

1.2.3. Disfunção termorregulatória associada à menopausa

O mecanismo preciso subjacente à fisiopatologia dos sintomas vasomotores da perimenopausa é desconhecido, mas existem algumas hipóteses propostas. A hipótese mais proeminente, inicialmente proposta por Tatarzyn et al., (1980), sugere a ocorrência de uma mudança na faixa de temperatura definida como zona termoneutra, ocorrendo um estreitamento dessa faixa, no qual pequenas elevações da temperatura interna poderiam ativar respostas de dissipação de calor, provocando reações exageradas, como o mecanismo de ondas de calor. Freedman e colaboradores realizaram vários experimentos a fim de testar essa hipótese (Freedman et al., 1995; Freedman e Woodward, 1995, 1996; Freedman e Krell, 1999; Freedman, 2001). Nesses estudos, foi observada a relação entre a

temperatura interna e o início das respostas de perda e conservação de calor. Os resultados dos experimentos mostram que a faixa limite para ocorrência de tremores é mais alta, ou seja, deslocada para cima, e a faixa limite para sudorese é reduzida, demonstrando que a zona termoneutra é 0,4°C mais estreita em mulheres na pós-menopausa com sintomas de ondas de calor.

A NA desempenha um papel importante na termorregulação, em parte através de receptores α_2 -adrenérgicos. Esse receptor encontra-se principalmente na porção pré-sináptica do neurônio e funciona como mecanismo de autorregulação, promovendo a regulação da síntese e liberação da NA (Svensson, Bunney e Aghajanian, 1975). A CLO, uma droga muito utilizada para o tratamento das ondas de calor em mulheres, é um agonista do receptor α_2 -adrenérgico pré-sináptico, age ativando esse receptor de forma a promover a diminuição da liberação de NA (Anden et al., 1970; Westerink, 1984). Há um considerável conjunto de evidências de que a noradrenalina (NA) liberada na APO está envolvida no controle da temperatura corporal (Feldberg e Myers, 1963), podendo causar vasodilatação periférica e perda de calor semelhante às alterações que ocorrem em mulheres durante as ondas de calor (Myers e Yaksh, 1969; Toivola e Gale, 1970). Avery (1972) demonstrou que níveis cerebrais de noradrenalina são afetados por variações tanto positivas quanto negativas da temperatura. E ainda, a injeção intraventricular de NA (Feldberg e Myers, 1963), ou micro-injeção de NA diretamente na POA, em gato (Feldberg e Myers, 1965; Rudy & Wolf, 1971), reduz a temperatura corporal. Outros achados ainda demonstraram que a castração em ratos está associada ao aumento do turnover de NA hipotalâmica (Anton-Tay & Wurtman, 1968; Bapna et al., 1971).

Vários estudos ainda demonstraram a relação da noradrenalina no mecanismo das ondas de calor. Freedman (2005) demonstrou que elevação da NA hipotalâmica diminui a zona limite para ativação de efetores de dissipação do calor. Num estudo com mulheres, o pesquisador também demonstrou que os níveis plasmáticos de 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol (MHPG), metabólito cerebral da NA, são significativamente aumentados em mulheres sintomáticas para ondas de calor em relação às assintomáticas (Freedman, 1998). Ainda, Bruck e Zeisberger (1990) relataram que respostas de perda de calor foram produzidas em animais com injeção de NA diretamente no hipotálamo. Freedman, Woodward e Sabharwal

(1990) demonstraram que um grande número de ondas de calor ocorreu em mulheres após administração intravenosa de Yohimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) e que a clonidina (agonista α_2 -adrenérgico) significativamente reduziu o número das ondas de calor. No entanto, os níveis plasmáticos de noradrenalina não se alteram durante o fenômeno de ondas de calor em mulheres na pós-menopausa.

A hipótese mais recente diz respeito ao envolvimento dos neurônios KNDy nos mecanismo de ondas de calor. Estudos morfológicos após a morte em tecidos hipotalâmicos mostraram hipertrofia de uma subpopulação de neurônios no núcleo infundibular no grupo de mulheres pós-menopausa comparado com o grupo pré-menopausa (Rance et al., 1990; Sheehan and Kovács, 1966). Esses neurônios co-expressam, kisspeptina (Kp), neuroquinina B (NKB) e dinorfina, sendo, portanto denominados neurônios KNDy. A hipertrofia celular desta população neuronal é acompanhada por aumento da expressão gênica de Kp e NKB (Rance et al., 1990; Rance e Young, 1991; Rometo et al., 2007). Estudos em roedores também mostram o envolvimento de neurônios kisspeptinérgicos em mecanismos de termorregulação. Mittelman-Smith et al. (2012) demonstraram o envolvimento dos neurônios KNDy na vasodilatação cutânea de ratas e participação destes na modulação da temperatura corporal em modelo de ratas ovariectomizadas tratadas com E2.

1.2.4. Kisspeptina

As kisspeptinas compreendem uma família de neuropeptídeos derivados do gene *Kiss1*. A nomeação desse gene é devido à sua identificação por pesquisadores da cidade de Hershey, Pensilvânia (EUA), muito conhecida pelo chocolate “kisses”. O produto inicial do gene *Kiss1* é um peptídeo de 145 aminoácidos que é clivado em um peptídeo de 54 aminoácidos, conhecido como Kisspeptina-54. Outros peptídeos menores, como kisspeptina-10 (Kp-10), 13 e 14, também podem ser formados a partir da clivagem da kisspeptina-54. Todos esses peptídeos compartilham uma sequência comum de arginina-fenilalanina-NH₂ em sua porção terminal, que é importante para a atividade biológica dessas moléculas, sendo então considerados parte de uma ampla família de peptídeos RF-amida. Kisspeptina-54 foi inicialmente denominada metastina, uma vez que sua expressão foi observada em células tumorais com capacidade para inibir metástase (Lee et al., 1996; Lee e Welch, 1997).

A expressão de Kp foi primeiramente demonstrada em concentrações elevadas na placenta e subsequentemente observada nos testículos, ovários, pâncreas, e intestino (Ohtaki et al., 2001; Gaytan et al., 2009). A expressão central de Kp e de seu receptor é encontrada em populações neuronais específicas do hipotálamo de roedores: principalmente na APO e ARC (Gottsch et al., 2004). Em humanos e primatas, a expressão desse neuropeptídeo predomina-se no núcleo infundibular (equivalente ao ARC de outros mamíferos) (Rometo et al., 2007). Em roedores, os neurônios kisspeptinérgicos do AVPV parecem ser sexualmente dimórficos, com mais neurônios presentes em fêmeas do que em machos (Clarkson e Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007). Evidências recentes suportam a possibilidade do dimorfismo sexual desses neurônios também no infundíbulo de humanos (Hrabovszky et al., 2010; Hrabovszky et al., 2011).

O receptor de Kp foi descoberto quatro anos depois da Kp como receptor órfão e originalmente era conhecido como GPR54, atualmente é conhecido como KiSS1R (Gottsch et al., 2009). Este receptor é um membro da família de receptores acoplados à proteína G e sua estrutura é similar ao receptor de galanina, sem, no entanto, ligar-se à galanina (Clements et al., 2001; Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). Quando ocorre a ligação da Kp ao seu receptor, a fosfolipase C é ativada, resultando na formação dos segundos mensageiros trifosfato de inositol (IP3) e diaciglicerol (DAG), os quais medeiam a liberação de cálcio intracelular e a ativação da proteína quinase C (Muir et al., 2001; Liu et al., 2008; Constantin et al., 2009).

Em 2003, dois pesquisadores descobriram numerosas mutações no gene para o receptor de Kp em humanos, as quais causavam um quadro de hipogonadismo-hipogonadotrófico congênito, caracterizado por deficiência na secreção de LH e hormônio folículo estimulante (FSH), retardo na maturação reprodutiva e infertilidade (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Assim, demonstrando que a Kp desempenha um papel essencial na reprodução e no desenvolvimento da puberdade. Essa descoberta tornou-se um marco e então muitos outros estudos examinaram mutações no receptor de Kp humano (Lanfranco et al., 2005; Cerrato et al., 2006; Tenenbaum-Rakover et al., 2007; Breuer et al., 2012).

Estudo em camundongos com deleção do receptor GPR54 também observaram alterações, como perda na função reprodutiva. Em machos, observaram disfunção na espermatogênese, redução do desenvolvimento de características sexuais

secundárias, testículos pequenos e baixos níveis de testosterona (Seminara et al., 2003). Em fêmeas, baixos níveis circulantes de estradiol, ausência do desenvolvimento dos folículos e corpo lúteo. Além disso, outro estudo demonstrou que a administração exógena de GnRH foi capaz de corrigir o fenótipo de hipogonadismo-hipogonadotrófico. De Roux et al. (2003) e Seminara et al. (2003) também inferiram sobre a possibilidade da Kp poder estimular a secreção de GnRH através da ativação do receptor *KISS1*. Desde então, outros grupos demonstraram que administração central ou periférica de Kp estimula a secreção de gonadotrofinas através de um mecanismo dependente de GnRH (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2008).

Neurônios kisspeptinérgicos estão localizados em estreita justaposição com neurônios GnRH no hipotálamo em várias espécies (Clarkson e Herbison, 2006; Hrabovszky et al., 2010) e os neurônios GnRH expressam receptores para Kp (Han et al., 2005; Poling et al., 2012). Estudos demonstraram que a kisspeptina estimula os neurônios GnRH levando à liberação de GnRH tanto *in vitro* como *in vivo* e que este efeito é inibido por administração de antagonistas de GPR54. Além disso, a administração tanto central quanto periférica de Kp leva ao aumento das concentrações circulantes de LH em animais e em humanos (Gottsch et al., 2004; Thomson et al., 2004). Outro estudo ainda demonstrou que os neurônios kisspeptinérgicos projetam-se para os corpos celulares dos neurônios GnRH na APO, e para a eminência mediana, próximo aos terminais dos neurônios GnRH (Clarkson e Herbison, 2006). Em conjunto esses achados sugerem que a Kp estimula os neurônios GnRH no hipotálamo para que ocorra a liberação de GnRH na circulação portal hipotálamo-hipófise, causando a liberação de gonadotrofinas produzidas na hipófise anterior (Messenger et al., 2005). E, além disso, outro estudo sugere que a ovariectomia poderia abolir a indução da liberação de GnRH pela Kp em macacas na puberdade e a reposição hormonal com estradiol poderia resultar em recuperação parcial dessa indução da liberação de GnRH causada pela Kp (Guerriero et al., 2012). Esses estudos suportam então o papel da Kp na regulação do eixo HPG em mamíferos.

Sabe-se que hormônios esteroides produzidos pelas gônadas, como os estrogênios, exercem *feedback* negativo ou positivo de sinalização para o hipotálamo para a regulação da produção e liberação de GnRH. Sabe-se que os

estrogênios exercem retroalimentação positiva por ativação do ER α na indução do pico de LH (Christian e Moenter, 2010). No entanto, os neurônios GnRH não possuem ER α , somente ER β (em ratos), sugerindo o envolvimento de uma via neuronal intermediária. Smith et al. (2006) investigaram o potencial papel da Kp em mediar a indução do pico de LH pelos estrogênios. Foi observado nesse estudo que a expressão de Kp no AVPV de ratas foi maior durante a noite do proestro, ao passo que os níveis de expressão do ARC estavam no seu mais baixo durante o mesmo período. Além disso, a expressão de Kp foi aumentada no AVPV no momento da indução do pico de LH por estradiol e progesterona em ratas ovariectomizadas, enquanto que a expressão no ARC estava no seu mais baixo nível durante o mesmo período. E ainda, os neurônios kisspeptinérgicos no AVPV co-expressaram Fos no momento do pico de LH, enquanto foi observada mínima expressão de Fos durante o diestro. Em contraste, neurônios kisspeptinérgicos do ARC não apresentaram similar aumento na expressão de Fos em nenhum dos dois períodos. Por fim, o estudo demonstrou que a maioria dos neurônios kisspeptinérgicos nos dois núcleos, AVPV e ARC, expressam ER α . Tais fatos têm embasado a hipótese da existência de duas populações funcionalmente distintas de neurônios kisspeptinérgicos, reguladas de maneira diferenciada pelo estradiol. O estradiol, então estimula a expressão de *KiSS1* no AVPV, enquanto inibe no ARC (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Assim os neurônios do AVPV estariam relacionados ao mecanismo de retroalimentação positiva, processo pelo qual os esteroides ovarianos promovem a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH e os neurônios do ARC estariam relacionados ao mecanismo de retroalimentação negativa, que consiste na inibição da secreção de gonadotrofinas pelos esteroides ovarianos (Pinilla et al., 2012).