UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FERNANDA LUIZA MENEZES BELLO

EFEITO DA REPOSIÇÃO HORMONAL COM 17B-ESTRADIOL SOBRE O BALANÇO DE CALOR CORPORAL E MITOCÔNDRIAS DO TECIDO ADIPOSO MARROM EM MODELO EXPERIMENTAL DE MENOPAUSA

Diamantina/MG

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FERNANDA LUIZA MENEZES BELLO

EFEITO DA REPOSIÇÃO HORMONAL COM 17B-ESTRADIOL SOBRE O BALANÇO DE CALOR CORPORAL E MITOCÔNDRIAS DO TECIDO ADIPOSO MARROM EM MODELO EXPERIMENTAL DE MENOPAUSA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Kinulpe Honorato Sampaio

Diamantina/MG

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B446e Bello, Fernanda Luiza Menezes
Efeito da reposição hormonal com 17β-estradiol sobre o balanço de calor corporal e mitocôndrias do tecido adiposo marrom em modelo experimental de menopausa / Fernanda Luiza Menezes Bello, 2019.
62 p. : il.

Orientador: Kinulpe Honorato Sampaio

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Menopausa. 2. Ovariectomia. 3. Ondas de calor. 4. Termogênese. 5.Mitocôndria. I. Sampaio, Kinulpe Honorato. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 612

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa, CRB6 – 3468.

FERNANDA LUIZA MENEZES BELLO

Efeito da reposição hormonal com 17β-estradiol sobre o balanço de calor corporal e mitocôndrias do tecido adiposo marrom em modelo experimental de menopausa

Dissertação apresentada ao MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, nível de MESTRADO como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Orientador (a): Prof. Dr. Kinulpe Honorato Sampaio

Data da aprovação : 05/04/2019

Prof.Dr. KINULPE HONORATO SAMPAIO - UFVJM

Prof.Dr.ª ANA CRISTINA RODRIGUES LACERDA - UFVJM

Prof.Dr.ª LUANA PEREIRA LEITE SCHETINO - UFVJM

AGRADECIMENTOS

No dia que cheguei em Diamantina lembro de pensar “vou morar aqui”. Logo em seguida desvencilhei-me do pensamento, imaginando ser um devaneio da minha parte, tendo em vista que nem sequer a prova eu havia feito ainda. Hoje entendo o pensamento, na verdade, a voz que soprou em meu ouvido: Diamantina estava prestes a se tornar o meu lar! E como se tornou!! Encontrei mais que amigos aqui, encontrei uma segunda família! Sair do ninho poderia ser difícil se não fossem as pessoas maravilhosas que, mesmo sem me conhecer, me acolheram tão acaloradamente!

Agradeço a Deus, por todo o caminho ter sido tão tranquilo e em tanta paz (mesmo em meio ao caos, nunca perdi a fé e a esperança). Agradeço de todo meu coração e minha alma aos meus pais, empresa de fomento mais séria e responsável desse país (Bruno Mendes, por favor, não me acuse de plágio!). Mãe, eu não sei como colocar em palavras a gratidão que eu tenho, por você ter sido meu conforto, meu colo, minha paz, meu alimento espiritual, meu alicerce, minha colaboradora mais fiel, quem se preocupou dia e noite comigo, que me perguntava todos os dias como estavam os experimentos, que mais vibrou com a notícia de que eu tentaria um mestrado, que mesmo de longe se fazia tão presente, pessoa cujo colo e afago eu mais senti falta, mas com a certeza de que sempre que eu quisesse, eu poderia voltar pra casa! Mamãe, obrigada por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia! Papai, obrigada por ser o melhor pai, mais coruja, mais puxa saco, mais companheiro que existe! Que me ensinou os caminhos, literalmente, que me acompanhou aqui em Diamantina em cada etapa, desde a prova até a matrícula, me ensinou a pegar a estrada propriamente dita e a estrada da vida, me orientou física e espiritualmente, com a oração de Santa Rita que guardo sempre comigo! Obrigada pela preocupação, amor e carinho sempre dedicados a mim!!!!! Rimã, obrigada por ser minha companheira de shows, de risadas, de séries, além de partilhar da vida comigo!! Obrigada por me ensinar inglês, por puxar minha orelha sempre que eu preciso, por ter um carinho mais que de irmã, mas de mãe!! Serei eternamente grata por tudo que você é pra mim!! Você é foda!! Irmão, obrigada por ser o irmão mais puxa saco desse mundo, por sempre ter acreditado em mim e sempre ter apoiado minhas decisões!! Além de ter me suportado cada vez que queria imitar tudo que você fazia, do Taekwondo, Kung Fu, até os rolês que eu te obrigava a me levar! Muito obrigada! Rê, obrigada por ter se aproximado tanto de mim, por sempre preocupar, por ter se feito presente mesmo quando na ausência física, e por todo o carinho comigo! Você é um exemplo de superação a ser seguido, te admiro muito! Obrigada Hadassinha, que me fez ver o que era o amor, e que desde tão pequena é um

exemplo de generosidade, titia te ama demais! Mãe, pai, irmãos, sobrinha... eu amo vocês mais do que eu amo a mim mesma! Obrigada por tudo!

Obrigada a minha vó Maria, por ser o exemplo de mulher doce, guerreira, exemplo de amor e de sabedoria!! Ao vovô Paulo cujos ensinamentos são motivos das minhas reflexões diárias e me ajudam no autoconhecimento e amadurecimento, eu amo muito vocês! Aos meus tios Marcos, Carlos, Paulo Roberto e Ronaldo, por sempre estarem presentes na minha vida e vibrarem comigo a cada vitória! Em especial ao Marcos que, junto com a Rimã, foi meu mestre e responsável pela minha segunda profissão. Minha gratidão será eterna! Aos meus avós Célia e Milton, que foram também parte da minha instituição de fomento, aos meus tios Paulo e Vera e aos meus primos maternos e paternos, especialmente Marcelo, que antes de mim, já sabia que eu acabaria ingressando nas veredas da academia.

Aos meus amigos de BH, FAP-C (Milão, Ph e Lecão), porque é muito ruim brigar com quem a gente ama! Obrigada por serem tão companheiros, por sempre fazerem questão e por nunca desistir da nossa amizade! Eu amo vocês demais!

Ao Sued e Fefê, duplinha que carregarei comigo sempre em meu coração, obrigada por terem me ajudado a chegar até aqui, sem vocês não tinha nem feito o TCC até hoje, hehehe.

Aos amigos de faculdade, obrigado a todos, em especial à Ruckert e a Livinha! Vocês foram afago no coração!

Ao Chiquinho por proporcionar momentos agradabilíssimos com todos os meus amigos!

Às minhas amigas Manu, Cecela, Aninha, Gabi, Ju, Issa, por terem surgido do nada e acrescentado tanto na minha vida! Manu que além de amiga foi minha marida, me acompanhou em tudo, me fez cafuné, esquentou meu pé, fez meu café da manhã, lanchinho pros meus amigos e foi a melhor conselheira em tudo que precisei! Que compartilhou comigo momentos de alegrias e tristezas, e que me deu colo mesmo quando da sua boca saíam alguns sermões e que mesmo quando não estava bem, abria mão de si mesma por mim! Você é especial demais pra mim!! Gabi, que mesmo com a agenda lotada, sempre fez questão de se fazer presente e sempre separou um tempinho pra nós! Com seu jeitinho meigo me conquistou apesar de não gostar de FRIENDS.... Obrigada por tudo gatinha, você é um exemplo pra mim

de estudo e dedicação! Aninha Freitas que de longe se faz mais presente do que muitos a minha volta... Amoras, eu amo vocês demais!

Aos agregados mais paradoxalmente legais e chatos: João e Tutu! Obrigada por suportar toda a ladainha e conversa fiada nossa!

A minhas amizades de infância e adolescência, em especial Aninha, que desde a evangelização infantil ao Taekwondo, sempre foi minha dupla e parceira, que mesmo ficando tempo sem nos falarmos, quando encontramos é sempre mágico! Obrigada, nega, por ter feito de Porto uma viagem sensacional, e por ser do jeitinho que você é!! Você é foda, mulher!!

Às minhas amizades da academia, que tanto compartilharam de momentos bons comigo, em especial à Nath, sempre muito mais que uma professora, amiga, ouvinte e conselheira!! Se tornou uma pessoa muito especial pra mim, meus sinceros agradecimentos!

À Baba, que mesmo de longe continua sendo minha siamesa e responsável pela saudade eterna que eu tenho da nossa infância! Obrigada por ter feito parte de todos os momentos da minha vida, bons e ruins, por ter sido minha sócia no empreendimento das miçangas e por não ter desistido de mim mesmo quando te expulsei da minha casa! Daria uma dissertação inteira se eu citasse todos os momentos icônicos que passamos juntas, te amo!

À Cibele e Buiu por serem os compadres mais legais desse mundo, por me suportarem e por me darem o Biel (amor da dinda) pra batizar. Vocês são mais que amigos pra mim, são como minha família, obrigada por não terem desistido de nossa amizade, vocês são fodas demais, amo muito vocês! Ao meu afilhado por desde tão pequeno me dar lições de vida e de amor, dinda te ama!

Ao Bruno por ter sido meu companheiro e suportado todas as adversidades da vida acadêmica comigo, segurado em minha mão e me impulsionado a sempre seguir em frente, com muita paciência e carinho, muito obrigada a você e a sua família que me acolheu, sobretudo a Mary, que foi mais que uma sogra, mas uma segunda mãe, que sempre teve muita consideração e afeto comigo!

Ao Lucas Liberato, por ser um amigo mucho louco, mas que sempre ouviu minhas loucuras e devaneios sem julgar, sempre me apoiando e mesmo que de longe, se fazendo presente em minha vida! Obrigada meu amigo, por não ter me bloqueado (apesar de ter ameaçado inúmeras vezes) e por ser quem você é!

Aos meus primeiros roomies de Diamantina: Gabriel, Gabrielle e Isabela, por terem sido amigos, companheiros, por terem me dado apoio, principalmente no início do mestrado, por terem sido meu alicerce para o desenvolvimento do meu projeto! Sem vocês minha trajetória seria muito mais difícil! Obrigada por terem sido os primeiros a me acolher, sobretudo o Biel, que literalmente foi meu primeiro amigo em Diamantina, sempre disposto a ajudar em todos os sentidos!! Muito grata sempre!

À minha marida, Hulie, que sempre foi muito mais que amiga, foi a família mais não tradicional que tive na vida, contrapondo tudo que a sociedade pré-julga como inapropriado. Nossa bolha de normalidade é algo que transcende a compreensão dos reles mortais. Obrigada por ter feito parte de TUDO que aconteceu comigo até aqui, por não me julgar, por ser a pessoa mais sensata, mesmo que na insensatez inerente ao nosso modo de viver! Devo a você da comida na mesa à água que eu bebo, afinal, você é a única que lava o filtro nessa casa.

Aos meus amados amigos do LetFis, que foram companheiros de experimentos e ciladas, de cerveja e de artigos, de lágrimas e de risos: Lili, que com seu jeitinho meigo segurava dois copos de caipirinha e um cigarro na boca na foto mais icônica do nosso grupo, mas que independente do rolê estava sempre trabalhando no dia seguinte, sempre com boa vontade para ajudar e compartilhar de seus conhecimentos. Caique, que pronunciava meu nome no laboratório apenas para dizer coisas inapropriadas e fazer piadas chulas, mas que no fundo tem um coração enorme e mesmo sem parecer, é um amorzinho. Bruno, sempre acompanhando meu raciocínio em assuntos não acadêmicos, mas também sempre disposto em ajudar, e a pessoa mais calma que já vi na vida. Talita, que foi minha companheira de projeto, me auxiliou o tempo inteiro e compartilhou de seus animais e do seu tempo comigo, sempre com uma piadinha sem graça que me faz rir demais, estar com você deixa tudo mais leve! À Cíntia, que mais que amiga, foi uma irmã que eu ganhei (gêmea, inclusive, ninguém na faculdade sabe quem é quem), me deu abrigo quando eu precisei e sempre me ajudou em tudo que se tratava de assuntos acadêmicos e dos não acadêmicos também. Que ficava bolada em solidariedade a mim quando algo de ruim acontecia, que me mostrava os melhores memes e que mesmo no auge do estresse sempre encontrava motivos pra nos fazer sorrir! Amigos, eu não sei descrever o quanto eu sou grata a Deus por terem colocado vocês em minha vida! Vocês fizeram com que meu mestrado fosse muito mais suave do que imaginei que seria!

À Maria José, que me recebeu como uma filha em sua casa, abdicando de sua própria cama para meu conforto! Muito obrigada por me acolher e por todo o carinho sempre dispensado a mim!

Agradeço aos amigos de laboratório, Karine, Bruna, Gabi, Ju, Vini, Marcelo, Gra, Stefanye, Mateus, Paulo e todos os outros colegas do LetFis e CIPQ, que por motivos de memória da Dory não lembrarei nome de todos para citar! Obrigada por terem compartilhado os momentos comigo!

Aos nossos alunos de IC antigos e novos: Bruno, Fred, Patrick, Nat, Letícia, Halanda, obrigada pelo suporte que vocês nos deram! Agradeço imensamente aos alunos emprestados: Walter, Ramona, Ju e Lucas!! Obrigada pelo auxílio, mesmo que fora da alçada de vocês e por terem sido mais que alunos, meus amigos!! Desejo todo sucesso do mundo pra vocês todos! Karen, obrigada tanto pelo trabalho compartilhado, quanto por ser minha amiga e companheira de forró, por ter esse jeitinho especial que me faz ter a certeza de que será uma exímia médica! Tenho muito orgulho de poder ter trabalhado com vocês e compartilhado, mesmo que muito pouco, do meu conhecimento com alunos tão especiais! Adoro vocês todos!

Um agradecimento especial à minha nutri linda, Kamila, que tanta paciência teve comigo para me ajudar nos PCR e também para dividir sanduíche depois do trabalho!!! Meus mais sinceros agradecimentos pela ajuda e por ser minha amiga, sempre pronta para ouvir e me acolher!

Agradeço ao professor Danilo, pela colaboração e boa vontade em me auxiliar nos experimentos, bem como por ter aceito o convite para suplente da banca! À banca Ana Cristina e Luana, agradeço por terem aceito o convite e pela certeza que serão pessoas que irão colaborar e muito para meu projeto!

Agradeço ao professor Marco Fabrício, por ter sido um colaborador do nosso grupo e sempre ter nos amparado sempre que preciso foi, muito obrigada!

O melhor eu guardei para depois. O motivo de tudo, de cada palavra aqui escrita, o que me fez seguir carreira acadêmica, que é meu amigo e companheiro de trabalho há 12 anos: Kinulpe. Sem você nada disso teria acontecido. Todos estão cansados de saber que, mesmo sem conhecer o programa, sem conhecer a cidade, e sem entender muito bem o que estava fazendo aqui, vim por sua causa. Vim com a certeza de ter aqui alguém familiar, alguém que eu tinha certeza que poderia contar, e que seguraria minha mão sempre que

preciso fosse. E não foi diferente, você sempre foi isso tudo e muito mais!! Imagina uma pessoa explicar Sistema Renina Angiotensina para uma adolescente de 14 anos?! Pois é, foi você Kinulpe, e olha que eu aprendi... Porque você SEMPRE teve alma de professor, sempre teve o dom de ensinar e se fazer entender, sempre foi doce, sempre teve uma palavra de conforto a todos, sempre foi luz em meio a trevas, sempre foi alegria, sempre foi competência, sempre foi abrigo e sempre foi amor! Eu lembro que antes mesmo de entrar na graduação, e mesmo antes de você sonhar em ser professor, eu disse: "serei sua aluna de mestrado". E assim foi! A decisão mais sábia da minha vida foi vir aqui por você, e ainda que parecesse impossível, você foi melhor do que fora outrora! Minha formação inteira eu devo a você, não existem palavras suficientes no mundo pra agradecer você pela orientação! Você foi mais do que orientador da dissertação, você ajudou a orientar minha vida! Serei eternamente grata, e serei eternamente filhota sua e da Vi, por quem também tenho um carinho imensurável! Obrigada, Vi, por ter sido minha mami e amiga e ter vibrado quando disse que faria mestrado com Kinulpe! Você é a pessoa mais doce que conheço na vida! Obrigada aos meus irmãozinhos Vini e Fê! Que família linda eu adquiri no meio do caminho! Muito muito muito obrigada! Coração grato e cheio de amor por vocês!

Agradeço às ratinhas que tiveram suas vidas ceifadas pelo bem da ciência!

Por último, mas não menos importante, agradeço ao Crohn, por ter me dado uma brecha e não ter atrapalhado meus estudos, e à Sertralina por ter mantido minha sanidade mental em meio ao caos.

Muito obrigada a todos que cruzaram meu caminho nessa trajetória! Todos foram muito importantes na minha formação! GRATIDÃO!

RESUMO

Os estrógenos, hormônios pertencentes ao grupo dos esteroides gonadais, têm importante papel na fisiologia reprodutiva feminina. Aproximadamente na quinta década de vida, as mulheres entram na menopausa que é caracterizada por uma queda de produção dos hormônios sexuais e que pode ser acompanhada sintomas responsáveis pela diminuição da qualidade de vida, destacando-se as ondas de calor. Essa disfunção pode ser revertida através da terapia de reposição hormonal. O tecido adiposo marrom (TAM) é um tecido termogênico e desempenha um importante papel na produção de calor devido a sua grande quantidade de mitocôndrias e à presença da proteína desacopladora 1 (*Ucp1*). Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estradiol sobre o balanço de calor e sobre as mitocôndrias do TAM em ratas ovariectomizadas (OVX), que são utilizadas nos estudos das ondas de calor na menopausa. Para isso, foram realizadas análise de temperatura e calorimetria de ratas OVX com e sem reposição de estradiol (E2), e fragmentos do TAM foram submetido à microscopia eletrônica de transmissão para avaliar a morfologia das mitocôndrias e PCR em tempo real para análise da expressão de genes relacionados à biogênese (*Pgc1a*), fusão (*Mfn1* e *Mfn2*) e termogênese (*Ucp1*) mitocondrial. Nossos resultados mostraram que o estradiol previne o aumento de temperatura que acontece nos animas ovariectomizadossem alteração na temperatura interna. Já os dados da calorimetria não apontaram diferenças na taxa metabólica basal das ratas. As mitocondrias dos animais tratados com E2 foram maiores e apresentaram expressão de *Mfn2* aumentada e *Mfn1*reduzido em relação ao grupo OVX. Os adipócitos dos animais castrados apresentram maior densidade volumétrica mitocondrial, expressão aumentada de *Pgc1a* e *Ucp1*, e tamanho reduzido das mitocondrias, sugerindo maior atividade termogênica dos adipócitos dos animais OVX. Nossos resultados sugerem que a ovariectomia promove aumento na termogênese através de alterações morfofuncionais em mitocôndrias do TAM e que o estradiol é capaz de prevenir essas alterações.

Palavras-chave: menopausa, ovariectomia, ondas de calor, termogênese, tecido adiposo marrom, mitocôndria.

ABSTRACT

Estrogens, hormones related to the gonadal steroid group, play an importat role in female reproductive physiology. Approximately in the fifth decade of life, as women enter the menopause, which is characterized by a drop in production of hormones, there are some symptoms responsible for the loss of quality of life, such as the hot flashes. This dysfunction can be reversed through hormone replacement therapy. Brown adipose tissue (BAT) is a thermogenic tissue, playing an important role in the production of heat due to its large amount of mitochondria and the presence of uncoupling protein 1 (*Ucp1*). The aim of this study was to evaluate the effect of estradiol on the heat balance and on the mitochondria of BAT in ovariectomized rats (OVX), which are used in the study of hot flashes during menopause. For this purpose, we analysed the temperature and calorimetry of OVX rats with andwithout estradiol replacement(E2), and fragments of BAT was used to perform transmission electron microscopyto evaluate the mitochondrial morphology and real time PCR to the analysis of the expression of genes related to biogenesis (*Pgc1a*), fusion (*Mfn1* and *Mfn2*) and thermogenesis (*Ucp1*) in mitochondria. The OVX animals exhibited higher tail temperature than the E2 group without alteration in the internal temperature. The calorimetry data did not showdifferences in the basal metabolic rate of the rats. The mitochondria of the animals treated with E2 were larger and showed increased *Mfn2* expression and reduced *Mfn1*compared to the OVX group. The adipocytes of the castrated animals presented increasedmitochondrial volume density, higher*Pgc1a* and *Ucp1*expression, and reduced mitochondrial size, suggesting a greater thermogenic activity of the adipocytes fromthe OVX animals. Our results suggest that ovariectomy promotes an increase in thermogenesis through morphofunctional changes in mitochondria of BATand that estradiol is able to prevent these alterations.

Key words: menopause, ovariectomy, hot flashes, thermogenesis, brown adipose tissue, mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema simplificado da esteroidogênese no ovário. 21

FIGURA 2: Esquema do delineamento experimental realizado 30

FIGURA 3: Medida de temperatura interna e da cauda 38

FIGURA 4: Média das temperaturas interna e da cauda 39

FIGURA 5: Medida da temperatura da cauda por termometria. 40

FIGURA 6: Dados de calorimetria indireta 41

FIGURA 7: Micrografia eletrônica de transmissão de adipócitos marrons. 42

FIGURA 8: Densidade volumétrica (Vv) mitocondrial do tecido adiposo marrom..... 43

FIGURA 9: Percentual de conteúdo citoplasmático do tecido adiposo marrom..... 43

FIGURA 10: Parâmetros de tamanho mitocondrial do tecido adiposo marrom. 44

FIGURA 11: Razão perímetro:área das mitocôndrias do tecido adiposo marrom 45

FIGURA 12: Parâmetros de formato de partículas mitocondriais do tecido adiposo marrom 45

FIGURA 13: Expressão gênica relativa (RNAm) 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Primers utilizados para o PCR em tempo real. 36

TABELA 2: Caracterização dos parâmetros corporais 37

TABELA 3: Análise de correlação da expressão gênica relativa. 47

TABELA 4: Síntese dos resultados obtidos 53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

cm: Centímetros

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

E1: Estrona

E2: 17β-estradiol

E3: Esriol

ER: receptor de estrógeno

ERα: Receptor de estrógeno alfa

ERβ: Receptor de estrógeno beta

ERE: elemento responsivo ao estrógeno

Fig: Figura

h: Horas

i.p: Injeção peritoneal

i.m: Injeção intramuscular

mg/Kg: Miligrama por quilograma

mL: Mililitros

µL: Microlitros

NE: Norepinefrina

OVX: Rata ovariectomizada

OVX+E2: Rata ovariectomizada que recebeu cápsula de estradiol

OVX+Veh: Rata ovariectomizada que recebeu cápsula de óleo

s.c: Injeção subcutânea

SNC: Sistema nervoso central

TAM: Tecido adiposo marrom

$TC_{intema:}$ Temperatura corporal interna

Ucp1: Proteína desacopladora 1

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFVJM: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Veh: Veículo

VCO_2: Produção de dióxido de carbono

VO_2: Consumo de oxigênio

α: Alfa

β: Beta

ºC: Graus Celsius

µm: Micrômetros

%: Porcentagem

±: Desvio Padrão

<: menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2.1 Menopausa 19
2.2 Estrógenos 20
2.3 Termorregulação e ondas de calor 22
2.4 Tecido adiposo marrom 23
2.5 Mitocôndria 24
3 OBJETIVOS 28
3.1 Objetivo geral 28
3.2 Objetivos específicos 28
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 Animais 29
4.2 Delineamento experimental 29
4.3 Ovariectomia e reposição hormonal 30
4.4 Análises *in vivo* 31
4.4.1 Temperatura da cauda e temperatura interna 31
4.4.2 Termometria 31
4.4.3 Calorimetria indireta 32
4.5 Análises por microscopia 32
4.5.1 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão 32
4.5.2 Densidade volumétrica mitocondrial 33
4.5.3 Medidas mitocondriais 33
4.5.4 Quantificação de gotículas lipídicas dos adipócitos por microscopia de luz 33
4.6 Biologia Molecular 34
4.6.1 Extração de RNA total e retro transcrição 34
4.6.2 Transcrição reversa 34
4.6.3 PCR em tempo real 35
5.7 Análises estatísticas 36
5 RESULTADOS 37
5.1 Balanço de Calor 37
5.2 Microscopia 41
5.3 Expressão gênica 45
6 DISCUSSÃO 48

7 CONCLUSÃO 55
8 REFERÊNCIAS 56

1 INTRODUÇÃO

Os estrógenos, hormônios pertencentes ao grupo dos esteroides gonadais, são essenciais na fisiologia femininae desempenham importante papel em várias células e tecidos. Muitos desses papéis foram observados em mulheres que estavam na menopausa, portanto, na ausência desses hormônios. A senescência ovariana ocorre entre a quarta e quinta década de vida da mulher, levando à diminuição dos hormônios sexuais, destacando-se os estrógenos. Tais mudanças hormonais também podem ser induzidas cirurgicamente através de ovariectomia bilateral, levando, assim como na menopausa, na queda dos hormônios sexuais (Al-Azzawi e Palacios, 2009; Wend et al., 2012).

O controle termorregulatório é vital para a manutenção da homeostase térmica do organismo dentro de uma faixa ideal para a manutenção e integridade dos sistemas. Durante a menopausa, as alterações hormonais desequilibram essa homeostase, promovendo as ondas de calor observadas na menopausa. As ondas de calor são um dos sintomas mais comuns em mulheres na menopausa, ocorrendo em aproximadamente 73% das mulheres, afetando a qualidade de vida e o trabalho dessa parcela da população (Freeman, 2007; Sassarini, 2012). Essas ondas se caracterizam por períodos de calor intenso, sudorese e vasodilatação periférica. Embora o aparecimento dessas ondas de calor coincida com a retirada do estrógeno, os mecanismos pelos quais isto ocorre não estão completamente elucidados (Charkoudian, 2003; Freedman, 2005; Thurston, 2017).

O tecido adiposo marrom (TAM) desempenha um importante papel no controle termorregulatório em pequenos mamíferos (Heaton, 1978; quarta, 2012), além de ser alvo para os hormônios sexuais (Quarta, 2012). Em roedores, o TAM é provavelmente o tecido termogênico mais importante, porque é capaz de aumentar a produção de calor através do desacoplamento da cadeia respiratória da produção de ATP nas mitocôndrias, dissipando o gradiente de prótons gerado pela cadeiarespiratória na forma de calor. Este mecanismo é mediado através da proteína desacopladora 1 (*Ucp1)*, localizada na membrana mitocondrial interna (Pedersen, 2001; Cuenca, 2007).

A mitocôndria é uma organela dinâmica e sua atividade está relacionada àalterações em suamorfologia e em sua biogênese, requerendo a contribuição do genoma mitocondrial e nuclear (Ostronoff, 1996). O co-ativador 1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (*Pgc1a*) é o principal regulador do processo de biogênese mitocondrial. A regulação dessas vias metabólicas e celulares pelo *Pgc1a* é feita através de uma variedade de

fatores de transcrição (Puigserver, 2003). Além da biogênese, estudos recentes apontam que a arquitetura mitocondrial está diretamente relacionada ao seu estado funcional (Schrepfer & Scorrano, 2016). Para que ocorra alterações na morfologia mitocondrial, há a participação de diferentes proteínas que atuam nos processos de fusão e fissão das membranas mitocondriais, resultando em estruturas que vão desde uma rede reticular integrada até a formação de partículas amplamente dispersas (Hoppins, 2007).

Os trabalhos realizados sobre os mecanismos que geram as ondas de calor investigam principalmente as vias centrais que desencadeiam a dissipação de calor. Até o momento, não são investigadas alterações periféricas que podem promover um aumento da produção de calor e que possam contribuir para o fenômeno das ondas de calor. Tendo em vista as informações supracitadas, nossa hipótese é que a ausência de estradiol que ocorre na menopausa promove um aumento na produção de calor que contribui para o fenômeno das ondas de calor através de alterações mitocondriais que promovem aumento da termogênese. Para isso, utilizaremos ratas ovariectomizadas (OVX), que são empregadas como modelo experimental para o estudo de ondas de calor na menopausa, e investigaremos o efeito da castração e da reposição hormonal com estradiol sobre as mitocôndrias do TAM, que um dos tecidos com maior produção de calor em roedores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1Menopausa

A menopausa como um evento da vida, foi notada por Aristóteles em 384-322 a.C, quando observou que as mulheres na faixa de 40 anos cessavam a menstruação, bem como seu período fértil (Utian, 1997). A senescência ovariana (ou climatério) é um processo gradual que culmina aproximadamente na quinta década de vida. A diminuição da função ovariana é evidenciada pela irregularidade da menstruação, declínio da fecundidade e aumento de índices de abortos espontâneos. Clinicamente, a menopausa é diagnosticada após a ausência de fluxo menstrual durante um ano (Al-Azzawi, 2009). Durante a menopausa os níveis de estrógenos caem bruscamente, levando à perda do *feedback negativo* sobre a liberação das gonadotrofinas hipofisárias (FSH – hormônio folículo estimulante; LH – hormônio luteinizante) e do hormônio libertador de gonadotrofina (GnRH) cujos níveis tornam-se elevados no sangue (Hall, 2015). A menopausa pode ocorrer de maneira natural devido à depleção folicular espontânea ou iatrogênica (secundária) que ocorre devido a remoção dos dois ovários (ovariectomia bilateral) ou na disfunção ovariana ocasionada por radioterapia/quimioterapia ou algum processo patológico (Davis, 2015).Com isso, a ovariectomia bilateral é amplamente utilizada em modelos experimentais de animais na menopausa (Al-Azzawi e Palacios, 2009)

Em uma meta-análise feita por Schoenaker e colaboradores, percebeu-se que a média de idade para a menopausa é de 48,78 anos, havendo, porém, uma heterogeneidade entre os estudos, com a média variando de 46 a 52 anos. A idade de menopausa também parece estar relacionada geograficamente, sendo geralmente menor nos países da África, América Latina e Oriente Médio, e maiores nos países da Europa e na Austrália, seguida pelos EUA. Em um estudo populacional feito pelo mesmo autor, que avalia a média de entrada na menopausa em relação a nível de educação, foi encontrado que mulheres com nível médio entravam na menopausa 4 meses depois quando comparadas às mulheres com nível baixo de educação, e 8 meses mais tarde em mulheres com nível elevado de escolaridade. Embora haja alguma discrepância entre os estudos, o tabagismo e sedentarismo parecem adiantar a menopausa, enquanto o índice de massa corporal não exerce efeitos sobre o adiamento ou adiantamento do climatério (Schoenaker, 2014).

Além das disfunções reprodutivas associadas à menopausa, vários distúrbios são responsáveis pela diminuição da qualidade de vida de mulheres nesse período, sendo eles:

sudorese noturna, irritabilidade, dores de cabeça, disfunções cardiovasculares, distúrbios de sono e ondas de calor. Esses sinais e sintomas ocorrem em 50% a 80% das mulheres na meia-idade, podendo ocorrer antes da interrupção completa do ciclo menstrual (Abdi, 2016; Pedro, 2003). A falta de estrógeno na menopausa também resulta em diversas mudanças/disfunções no organismo, como: perda óssea, tendência a um maior acúmulo de tecido adiposo na região abdominal, maior propensão a eventos cardiovasculares e diabetes (Davis, 2015).

2.2 Estrógenos

Os estrógenos são hormônios pertencentes ao grupo dos esteroides gonadais essenciais na fisiologia feminina. Esses esteroides desempenham importantes papeis em vários sistemas, tendo participação no sistema reprodutivo, na manutenção da massa óssea, além de efeitos cardioprotetores. Muitos desses papéis foram observados em mulheres que estavam na menopausa, apresentando, com a queda de hormônios, osteoporose e maiores chances a eventos cardiovasculares, além da disfunção no sistema reprodutivo (Al-Azzawi, 2009; Wend et al., 2012).

O estrógeno ou seus derivados têm um importante papel no sistema nervoso central (SNC). Durante o desenvolvimento, diferentes aspectos neuronais como sinapses e formação do circuito neuronal, estão sob o controle de estrógenos, independente do gênero. Além disso, a maturação do SNC sexo-específica, está intimamente ligada à presença ou ausência de estrógeno durante uma janela pré-determinada do desenvolvimento cerebral. O estrógeno atua centralmente através da circulação periférica atingindo o SNC, ou da formação local nos neurônios. Na vida adulta, os estrógenos são essenciais no controle do eixo hipotalâmico-hipofisário da reprodução (Arnold, 2012).

Sendo fundamentais na fisiologia da mulher, os estrógenos são responsáveis pelo desenvolvimento e regulação do sistema reprodutor e características secundárias femininas. As formas estrogênicas humanas são: estrona (E_1), 17β-estradiol (E_2) e estriol (E_3). São formas derivadas do colesterol e prontamente difundidos através da membrana para dentro da célula para se ligar ao seu receptor e gerar sua resposta biológica. O E_2 é o mais potente e prevalente dos estrógenos endógenos, porém muitos metabólitos do E_2 possuem atividade hormonal (Nazari, 2016).

O E2 é sintetizado sob o controle citocromo P450 aromatase (P450arom) (Fig.1), que converte a testosterona em estradiol e androstenediona em estrona. A P450arom que é codificada pelo gene humano CYP19 (Fig. 1). Nos ovários, o E_2 é produzido pelos folículos

ovarianos durante a fase reprodutiva como resultado de ações coordenadas das células da teca interna e da granulosa do folículo ovariano sob influência das gonadotrofinas hipofisárias.OLH age sobre as células da teca estimulando a secreção de androstenediona e testosterona, que são convertidos em E_1 e E_2 nas células da granulosa pela ação da P450arom após do FSH (Meinhardt, 2002).

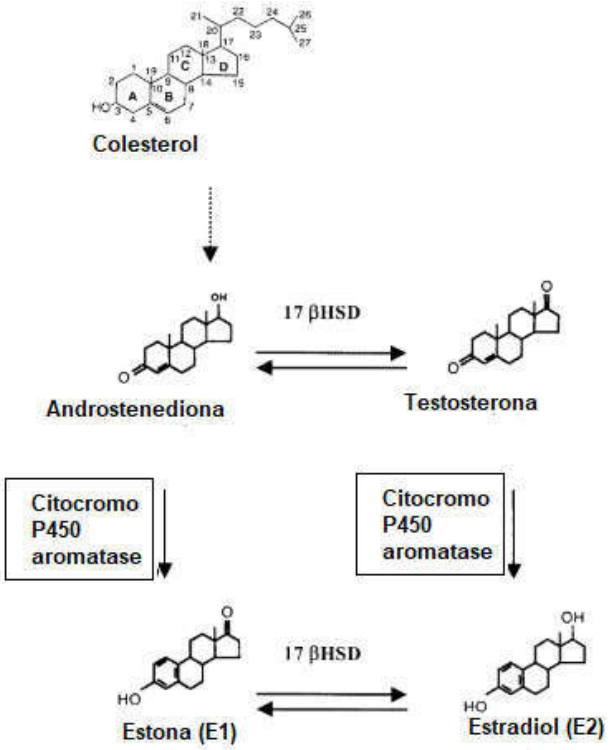

FIGURA 1: Esquema simplificado da esteroidogênese no ovário. (Adaptado de Meinhardt, 2002).

Os estrógenos agem através de sua ligação a dois receptores principais, sendo eles: o receptor de estrógeno alfa (ERα) e o receptor de estrógeno beta (ERβ). Uma vez ativado pelo E_2, os receptores (ER) se dimerizam, translocam-se para o núcleo e se ligam ao elemento responsivo ao estrógeno (ERE) localizado na região promotora do gene-alvo. No núcleo, os receptores de estrógeno modulam a transcrição gênica, e os produtos proteicos resultantes determinam as ações biológicas exercidas pelo esteroide sexual. Estudos mostraram também que os estrógenos podem ativar mecanismos não genômicos envolvendo diferentes vias de sinalização celular (Mattingly, 2008). O GPER, um receptor acoplado à proteína G, destacou-se recentemente como um receptor de estrógeno de membrana capaz de ativar vias rápidas de sinalização celular, tais como MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases - Proteína-quinases ativadas por mitógenos) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (Levin, 2005; Wend, 2012).

Zhai e colaboradores (2000) também demonstraram a importância do estrógeno na função mitocondrial em animais *knockou t*para o ERα (ERKO), e animais ovariectomizados, onde animais ERKO que sofriam isquemia e reperfusão apresentavam danos ultraestruturais nas mitocôndrias e um declínio da função da cadeia respiratória mitocondrial (Zhai et al., 2000). Um estudo similar com animais castrados com e sem reposição de estradiol demonstrou que o dano nas mitocôndrias dos cardiomiócitos e o declínio da função da cadeia respiratória em animais ovariectomizados eram revertidos quando tratados com E_2 (Zhai, 2000).

2.3 Termorregulação e ondas de calor

O sistema termorregulatório é de extrema importância para a homeostase térmica, pois mantém a temperatura do organismo em uma faixa ideal para o funcionamento adequado dos órgãos e sistemas, independente da temperatura ambiente. A zona termoneutra é definida como uma faixa de temperatura ambiental que o controle fisiológico da temperatura é realizado pela perda de calor seco, ocorrendo dentro de uma faixa onde o estresse térmico é o mínimo possível (Rance, 2013).

A regulação da temperatura é um circuito complexo composto pelos sistemas neuroendócrino, autonômico e respostas somatomotoras. A termorregulação funciona através de *feedback* bidirecional, onde vias aferentes enviam informações sobre a temperatura corporal e a estimulação térmica de várias áreas do sistema nervoso central, incluindo grupos neuronais do tronco encefálico, enviam sinais eferentes para produzir a resposta termorregulatória (Deecher, 2005; Deecher, 2007).

A resposta termorregulatória pode ocorrer tanto através do controle do fluxo sanguíneo que promove conservação ou dissipação de calor, quanto através do aumento da termogênese. A regulação do fluxo sanguíneo é fundamental para a manutenção da temperatura diante de situações que tendem a desequilibrar a homeostase térmica. A vasodilatação pode aumentar o fluxo sanguíneo na superfície corporal de 6 a 8 L/min durante um aumento severo da temperatura para facilitar a dissipação de calor. Enquanto na exposição ao frio, a vasoconstrição diminui a perda de calor, protegendo o organismo contra a hipotermia (Imai, 2013; Taylor, 1984). Outro exemplo do aumento da termogênese é a ativação do tecido adiposo marrom (TAM) (Cannon, 2004). Foi descrito por Nakamura e Morrison, em 2006, vias eferentes centrais da área pré-óptica que medeiam o controle da termogênese do TAM, demonstrando ser este, importante para o controle termorregulatório.

A temperatura corporal geralmente se encontra dento de uma faixa específica, com oscilações que variam de acordo com o ritmo circadiano. O processo fisiológico de conservação e dissipação de calor é responsável pela manutenção da temperatura, e uma regulação estreita é necessária para o funcionamento ideal do organismo. A falha nesse controle ocasiona em uma dissipação exacerbada de calor apresentada como sintomas vasomotores ou *Hot flashes* (Deecher, 2007).

As ondas de calor ou *Hot Flashes* são sinais muito comuns em mulheres na menopausa, sendo notada em cerca 80 a 95% das mulheres durante esse período. As ondas de calor são semelhantes à resposta de dissipação de calor, com sudorese e vasodilatação periférica, contudo os mecanismos que promovem as ondas de calor não estão ainda completamente elucidados (Freedman, 1999). Segundo estudo feito por Avis e colaboradores (2015), os sintomas vasomotores da menopausa, assim como as ondas de calor e sudorese noturna, podem variar com a etnia, estado emocional, estilo de vida, níveis de estresse e depressão, e dura em média 7,4 anos.

Em um estudo epidemiológico sobre prevalência da menopausa e sintomas associados, Feldman e colaboradores (1985) mostrou que de 594 mulheres estudadas, 525 (88,4%) relataram sintomas de ondas de calor no período de transição para a menopausa. 60% das mulheres que relataram sintomas de ondas de calor foram na faixa dos 40 a 50 anos de idade, sendo 45 anos a idade com maior prevalência.

A alteração nos níveis séricos dos hormôniossexuais tem um papel importante na etiologia dos sintomas vasomotores encontrados nas ondas de calor. A terapia com estrógeno tem se mostrado eficiente em aliviar os sintomas associados aos *hot flashes*em 95% das mulheres na menopausa. Em mulheres na pós-menopausa, a terapia de reposição hormonal com estrógeno é capaz de diminuir a temperatura em repouso em aproximadamente 0,5ºC (Bcerug, 1998; Charkoudian, 2003).

2.4 Tecido adiposo marrom

O tecido adiposo marrom (TAM) é um órgão altamente especializado responsável pela termogênese sem tremores, que permite que animais endotérmicos lidem com condições onde a temperatura está muito baixa. Assim, o TAM desempenha um papel importante no controle do balanço energético em pequenos mamíferos devido a sua alta capacidade termogênica que se dá devido à grande quantidade de mitocôndrias e à presença da proteína desacopladora 1

(*Ucp1*), sendo eficiente então na geração de calor afim de manter a temperatura corporal constante (Heaton, 1978; Vucetic, 2011; Quarta, 2012).

Em roedores, o TAM é provavelmente o tecido termogênico mais importante, pois é capaz de aumentar a produção de calor através do desacoplando da cadeia respiratória da produção de ATP nas mitocôndrias, dissipando o gradiente de prótons gerado pela corrente respiratória na forma de calor. No TAM, este mecanismo é mediado através da *Ucp1*, localizada na membrana mitocondrial interna (Pedersen, 2001; Cuenca, 2007).

O TAM pode gerar calor em resposta a mudanças da temperatura ambiente ou dieta, em um processo chamado de termogênese adaptativa. A termogênese do TAM pode ser ativada em resposta ao frio através da liberação local de norepinefrina (NE) pelos neurônios simpáticos. A NE, por sua vez, realiza a lipólise através da sinalização por cAMP. Após a lipólise, a liberação de ácidos graxos livresservirão de substrato para oxidação além de promover a ativação da *Ucp1*que aumentará a termogênese por esse tecido (Cannon, 2004; Gantner, 2016).

2.5 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas intracelulares que evoluíram a partir de relações endossimbióticas. Há aproximadamente 2 bilhões de anos atrás, uma bactéria consumidora de oxigênio (que se tornaria mitocôndria) foi endocitadapela célula hospedeira, que não tinha mitocôndria, para se tornar a célula de mamífero que conhecemos hoje. Como resultado, a mitocôndria agora sustenta a vida humana através da produção de energia e sinalização intracelular (Picard, 2018)

O genoma mitocondrial é de extrema importância, porque codifica genes essenciais para produção de energia na cadeia respiratória. Esta, também conhecida como cadeia transportadora de elétrons, está localizada na membrana interna, na crista mitocondrial, e contém 5 complexos enzimáticos multiproteicos. A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear (> 1500), exceto por 13 que são codificadas pelo genoma mitocondrial (Picard, 2018).

Além da produção de energia e de desempenhar um papel crucial no metabolismo energético celular, a mitocôndria desempenha papéis importantes na apoptose, proliferação celular, esteroidogênese, sinalização celular e metabolismo lipídico. As mitocôndrias são dinâmicas e passam por rearranjos contínuos através do processo de fusão e fissão

mitocondrial, dependendo do ambiente, assim como o estado nutricional (Zorzano et al, 2009).

A biogênese mitocondrial, consiste no aumento do conteúdode mitocôndrias por célula, e no aumento da atividade das mitocôndrias pré-existentes, e requer contribuição do genoma mitocondrial e nuclear. Há evidências crescentes na literatura que o co-ativador 1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (*Pgc1a*) é o regulador principal da biogênese mitocondrial. Uma vez ativado, ele estimula o metabolismo oxidativo mitocondrial do TAM, a comutação do tipo de fibra no músculo esquelético, e vários aspectos da resposta ao jejum do fígado. A regulação dessas vias metabólicas e celulares pelo *Pgc1a* é feita através de uma variedade de fatores de transcrição (Ostronoff, 1996; Lee, 2005, Puigserver, 2003).

Segundo Mattingly e colaboradores (2008), o estrógeno estimula a função mitocondrial através da ação genômica envolvendo interação direta dos receptores de estradiol α e β com o elemento responsivo ao estrógeno (ERE) no promotor do gene do fator respiratório nuclear-1 (NRF-1). O NRF-1 é um fator transcricional que regula a expressão de genes mitocondriais codificados, como por exemplo o fator transcricional mitocondrial A (TFAM). Além da ação através da ativação de receptores nucleares, o estradiol também atua através de mecanismos não genômicos envolvendo diferentes vias de sinalização em especial a via do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt). Por sua vez, a via PI3K/Akt converge com outras vias na regulação de expressão e sinalização de NRF-1, sendo também responsável pelo controle da biogênese mitocondrial em células de mamíferos em resposta a estímulos ambientais e fisiológicos (Filardo & Thomas, 2012; Lee, 2005; Cuenca, 2006; Ge *et al.,* 2012; Suliman, 2003).Em suma, o estrógeno é capaz de modificar a atividade mitocondrial através da regulação do processo de biogênese mitocondrial(Vucetic, 2011)

Outra proteína que também participa da biogênese mitocondrial é a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que é um dos sensores do estado energético celular e funciona como um dos principais reguladores da reprogramação do metabolismo. A AMPK foi vista principalmente como um sensor de depleção energética intracelular aguda, mas sua função mais ampla na regulação a longo prazo do equilíbrio energético de todo o corpo é agora reconhecida, assim como sua modulação da termogênese no TAM (Morentin, 2014).

Além da biogênese mitocondrial, estudos recentes apontam que a arquitetura mitocondrial está diretamente relacionada ao seu estado funcional. Para que ocorra alterações na morfologia mitocondrial, há a participação de diferentes proteínas que atuam nos processos de fusão e fissão des membranas mitocondriais, resultando em estruturas que vão desde uma rede reticular mitocondrial integrada até uma morfologia mitocondrial amplamente dispersa,

permitindo o intercâmbio dinâmico de constituintes da membrana interna e externa (Schrepfer & Scorrano, 2016; Hoppins, 2007). As proteínas de fusão e fissão mitocondrial são essenciais para a função celular, garantindo a eficácia bioenergética.

A fusão mitocondrial é um processo complexo que envolve a fusão de duas membranas lipídicas (interna e externa). Esse processo é constituído por duas etapas, onde as membranas externas e internas se fundem em momentos diferentes. A proteína pró-fusão localizada na membrana mitocondrial interna, OPA1 (*gene da atrofia óptica 1*), e as proteínas de fusão localizadas na membrana externa (mitofusinas ou *Mfn*) são essenciais para que o processo de fusão ocorra, visto que uma irregularidade nas *Mfn* ou na OPA1 já é suficiente para que o processo de fusão mitocondrial se interrompa (Meeusen et al., 2004; Zorzano, 2009). As *Mfns* e OPA1 são proteínas ancoradas nas membranas mitocondriais e apresentam atividade GTPase, que é essencial para sua atividade. Apesar dessas semelhanças, a OPA1 possui muitas características específicas em sua regulamentação que não são compartilhadas com as *Mfns*. A OPA1 demonstra uma regulação pós-transcricional e pós-traducional única e acentuada. A OPA1 é expressa em oito isoformas de *splicing* alternativo em humanos, o que mostra atividades quantitativamente diferentes que promovem a fusão mitocondrial. Além disso, as oito isoformas são reguladas por proteólise e mostram diferentes locais de clivagem. Essas isoformas exercem atividades distintas na promoção da fusão e formação de cristas mitocondriais. De fato, o controle da morfologia das cristas mitocondriais parece ser uma característica específica da atividade da OPA1, já que a disfunção das mitofusinas (*Mfn1* ou *Mfn2*) não induz estruturas de cristas anormais (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2006; Frezza et al., 2006; Zorzano, 2009).

Condições onde são requeridas maiores taxas de síntese de ATP estão associadas ao alongamento mitocondrial, tendo, portanto, maiores taxas de fusão. Em contrapartida, o processo de fissão está relacionado ao estresse mitocondrial, culminando com a apoptose. Entretanto o processo de fissão mitocondrial no tecido adiposo marrom não é deletérico. De fato, a estimulação adrenérgica no tecido adiposo marrom induz uma série de mudanças na arquitetura mitocondrial, incluindo a alta taxa de fragmentação. Este fenômeno favorece o desacoplamento mitocondrial e o consumo energético (Molina, 2009; Twig, 2011; Pisani, 2018).As proteínas que se destacam no processo de fissão mitocondrial são as *Drp1*(*proteína relacionada a dinamina 1*) e proteína de fissão mitocondrial 1 (*Fis1*). A *Drp1* foi amplamente caracterizada e provavelmente promove a fissão da membrana através de uma força mecânico-química durante a endocitose. Já a *Fis1* é uma proteína de 18kDa ancorada na

membrana mitocondrial externa e também está envolvida na fissão mitocondrial (Boutant, 2017; Meeusen, 2006; Das, 2012; Hoppins, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da reposição hormonal com 17β-estradiol sobre o balançode calor corporal e sobre as mitocôndrias do tecido adiposo marrom deratas wistar.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da reposição hormonal com17β-estradiol sobre:

- Balanço de caloratravés de medidas de temperatura corporal e calorimetria indireta;
- Morfologia e densidade volumétrica mitocondrial no tecido adiposo marrom;
- Expressão de genes envolvidos nos processos de termogênese, fusãoe biogênese mitocondrial no tecido adiposo marrom.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 14 ratas (7 em cada grupo) adultas (5 meses) Wistar provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados no Biotério do Laboratório Experimental de Treinamento Físico, Departamento de Educação Física da UFVJM, acondicionados em caixas de polipropileno coletivas (41x34x16 cm) com 4 animais e expostos ao ciclo claro/escuro invertido de 12h das 06 às 18 horas, em um ambiente com temperatura de 22º C ± 2ºC, circulação de ar por meio de exaustor e livre acesso à água e ração. Os animais foram mantidos, manipulados e eutanasiadosde acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório do "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 2011)e de acordo com as diretrizes com Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), obedecendo os critérios da Lei Nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA-UFVJM) (protocolo 032/2017).

4.2 Delineamento experimental

Para o modelo de ondas de calor na menopausa, foi realizada ovariectomia bilateral. A aferição da temperatura (cauda e interna), calorimetria indireta e termometriaforam realizadas 14 dias após a castração, período em que ocorre o fenômeno de ondas de calor nesse modelo de acordo com Kobayashi *et al.* (2000)(Kobayashi et al., 2000). Para reposição hormonal foram implantadas na fáscia subcutânea dos animais, no momento da ovariectomia, cápsulas de Silastic com 17β-estradiol (Grupo E2)ou óleo (Grupo OVX). Para aferição da temperatura foi realizada a habituação dos animaisao contensor durante quatro semanas. A habituação começou duas semanas antes da ovariectomia e foi realizada até o 13º dia após a castração, apenas com intervalo de 3 dias após a ovariectomiapara recuperação dos animais. Todas as medidas foram realizadas no 14º dia após a castração, no ciclo ativo do animal (ciclo escuro), pareando-se sempre um animal do grupo OVX com um do grupo E2.No 15º dia foi realizada a eutanásia por exsanguinação após anestesia. O útero e o tecido adiposo marrom (TAM)

interescapular foram dissecados e pesados. Fragmentos do TAM foram quimicamente fixados para as análises por microscopia ou congelados em N_2 líquido e armazenados em freezer -80ºC para biologia molecular.

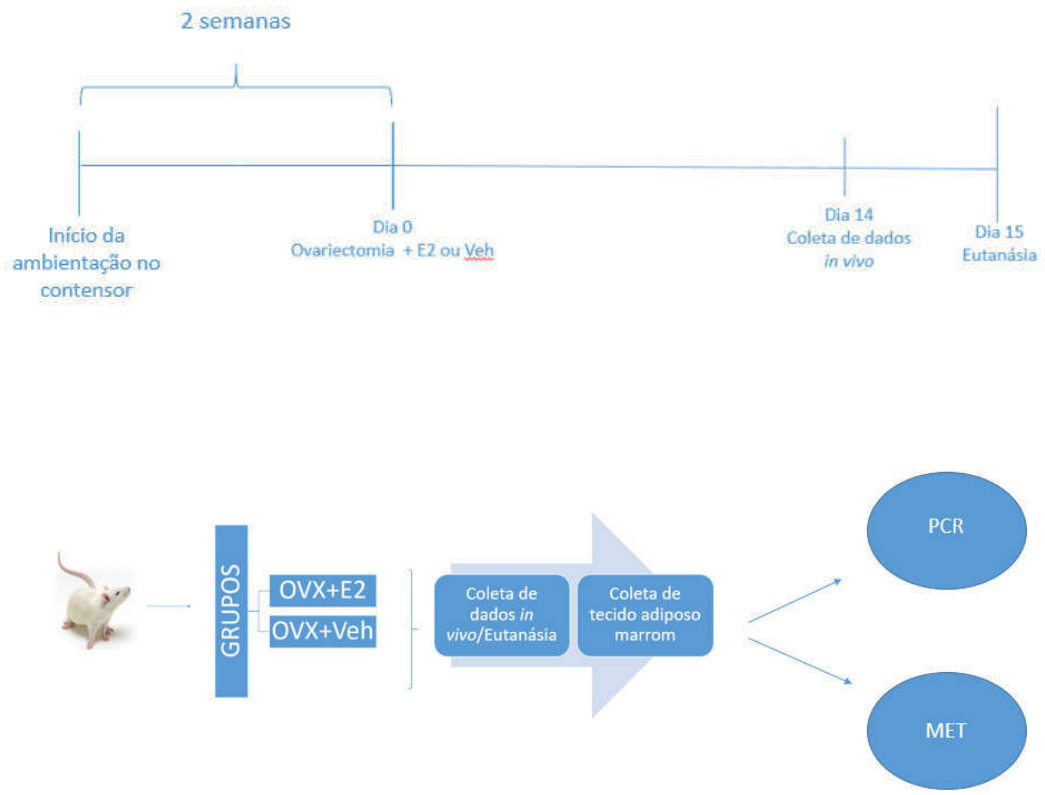

FIGURA 2: Esquema do delineamento experimental realizado nos grupos ovariectomizados tratados com estradiol e veículo.Os animais foram habituados durante 4 semanas (com início 2 semanas antes da ovariectomia até o dia da coleta de dados in vivo). Após eutanásia o tecido adiposo marrom foi usado para PCR em tempo real ou para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.3 Ovariectomia e reposição hormonal

A cirurgia de ovariectomia foi realizada sob anestesia com solução de cetamina (Cloridrato de cetamina; 80 mg/Kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Foi realizada tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura foram incisas longitudinalmente, na região abaixo da última costela e próxima ao nível do rim. Os ovários foram identificados e retirados, e a pele suturada com fio absorvível. Para reposição hormonal foi realizada tricotomia da região interescapular e através de uma pequena incisão foram implantadas na fáscia subcutânea dos animais cápsulas de Silastic contendo de 17β-estradiol dissolvido em

óleo de milho(6 µg/cápsula/rata) (Fonseca, 2016)ou somente óleo.A cápsula consiste de um tubo de silicone poroso de dimensões: comprimento de 20mm, diâmetro interno de 1,02mm e diâmetro externo de 2,16mm Após a cirurgia, os animais receberam tratamento profilático com pentabiótico (24000 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixina meglumina; 2,5 mg/Kg, s.c.).

4.4 Análises *in vivo*

4.4.1 Temperatura da cauda e temperatura interna

A aferição da temperatura da cauda e da temperatura interna foi realizada com os animais acordados em contensão. Os animais foram habituados diariamente no contensor em tempos crescentes (30 minutos, 1h e 2h) por 2 semanas. Após este período, as ratas foram ovariectomizadas e então, 14 dias depois, realizadas as medidas da temperatura. Para medir a temperatura da cauda, foi colocado um termossensor de alta precisão na superfície dorsal da cauda, a 1cm da base. A temperatura interna foi realizada através da inserção de sonda retal conectada a um termômetro com 4,0 cm de profundidade. Os registros de temperatura foram realizados em intervalos de cinco minutos, durante umahora, em uma sala fechada, com a temperatura ambiente controlada variando entre 20 e 22 ºC.

4.4.2 Termometria

A termometria foi realizadana sala climatizada com sistema de controle de temperatura e umidade relativa do ar do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFIEX) do Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq) da UFVJM. Os animais foram previamente ambientados na sala por 2 horas durante 3 dias, permanecendo separados individualmente em caixas de polipropileno. As imagens foram obtidas através da câmera termográfica FLIR T450sc (FLIR Systems AB, Danderyd, Sweden) a uma distância fixa de 1m com intervalos de 5 minutos durante uma hora. Os animais foram mantidos livres na caixa. Foi avaliada a temperatura máxima da cauda a uma distância de aproximadamente 1cm da base através do Software FLIR tool (versão 5.13). As medidas de temperatura ponto a ponto foram transferidas para uma planilha e submetidos à análise estatística.

4.4.3 Calorimetria indireta

As medidas de consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono (VCO_2), taxa metabólica basal (EE) e coeficiente respiratório (R.Q.) foram realizadas com auxílio decalorímetro indireto (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) acoplado à caixa metabólica (fluxo de ar = 1,0/min), local em que as ratas foram acomodadas(Melo et al., 2016). O sistema foi calibrado com mistura conhecida de gases. O VO_2 e VCO_2 foram medidos continuamente por meio de sistema computadorizado e os parâmetros metabólicos foram avaliados utilizando o software específico para análise do metabolismo respiratório (software Metaoxy, Harvard Apparatus, Espanha). A medida foirealizada durante duas horas, em uma sala fechada, com a temperatura ambiente controlada variando entre 20 e 22 ºC.

4.5 Análises por microscopia

4.5.1 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação de alterações mitocondriais do tecido adiposo marrom (TAM), os animais foram eutanasiados e fragmentos do tecido foram fixados em Karnovsky (glutaraldeído 5% e paraformaldeído 4%), ambos em tampão cacodilato0,1M, pH 7,3 durante 24 h à 4 ºC. Em seguida, as amostras foram submetidas à pós-fixação com tetróxido de ósmio 2% reduzido com ferrocianeto depotássio 1,5%, durante 2h à temperatura ambiente, com o objetivo de aumentar o contraste das organelas. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada e mantidas em acetado de uranila 2% (contrastação em bloco) *overnight*. Os espécimes foram desidratados em uma bateria crescente de álcoois e incluídos em resina Epon 812. Para seleção da área do TAM para análise por microscopia eletrônica, foram realizados cortes semifinos de 200nm de espessura, corados com azul de toluidina borato de sódio 1% e observados por microscopia de luz. Em seguida, foram realizadas secções de 60nm de espessura que foram depositadas em telas de cobre, contrastadas com nitrato de chumbo de Reynolds e avaliadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) modelo Tecnai G2-12 Spirit (Fei Company, Hillsboro, Oregon, USA), à 80kV do Centro de Microscopia da UFMG. Esse microscópio apresenta resolução de ponto de 0.49 nm.

4.5.2 Densidade volumétrica mitocondrial

Para análise do conteúdo mitocondrial, foram utilizadas micrografias obtidas através da câmera CCD modelo SIS-MegaView 3 com resolução de 1373 x 1070 pixels acoplada ao TEM. Foram obtidas de imagens do citoplasma de 10 adipócitos de cada animal com aumento de 11000X. A densidade volumétrica mitocondrial dos adipócitos foi mensurada através do método clássico de contagem de pontos com a sobreposição de uma grade de 204 pontos (500 X 500nm) projetados sobre cada imagem de acordo com Queiroz et al. (2017)(De Queiroz et al., 2017). Foram utilizadas imagens apenas do citoplasma de cada célula. As análises foram realizadas com o auxílio do software Image J (US National Institutes of Healthy, Bethesda, USA).

4.5.3 Medidas mitocondriais

Para análise do tamanho e formato das partículas mitocondriais dos adipócitosfoiutilizado o software Image J (US National Institutes of Healthy, Bethesda, USA).Cada mitocôndriadas micrografias eletrônicas foicontornada manualmente, obtendo-seas medidas de perímetro, área, maior e menor diâmetro.Para análise dos parâmetros relacionados ao formato das mitocôndrias, foram obtidos valores de elipsidade (maior diâmetro/menor diâmetro) e esfericidade [4 x (área)/π x (maior diâmetro)^2]. Foram analisadas ao todo 3137 mitocôndrias de 30 adipócitos/grupo.

4.5.4 Quantificação de gotículas lipídicas dos adipócitos por microscopia de luz

Para quantificação das gotículas lipídicaspresentes nos adipócitos do tecido adiposo marrom foram utilizadas 5 imagens aleatórias do tecido adiposo marrom de 3 animais de cada grupo. Para aquisição das imagens foram mantidas constantes as condições de luz e tempo de exposição após iluminação Köhler do microscópio. As fotografias foram obtidas através de objetivas 100x usando imersão com óleo com o auxílio do microscópio Olympus BX-53F2, sendo as imagens obtidas RGB de 2560 x 1920 pixels, resolução de 18,5 pixels/µm e formato TIFF. As imagens digitais foram convertidas em imagens binárias, tornando as imagens com conteúdo celular em negro e as gotículas lipídicas em branco. Em seguida foi calculada a porcentagem da área em branco.

4.6 Biologia Molecular

4.6.1 Extração de RNA total e retro transcrição

As amostras congeladas em N_2 líquido foram descongeladas e homogeinizadas manualmentecom adição de 500 µL de Trizol. Como as amostras tinham alto teor de gordura, o lisado foi centrifugado por 5 minutos à 12.000g à 4ºC e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir a completa dissociação do complexo nucleoproteico. Em seguida foi adicionado 100 µL de clorofórmio em cada tubo, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente, seguida de centrifugação por 15 minutos à 12.000g (4ºC), a qual separou a solução em três fases: uma fase orgânica no fundo do tubo, uma fase constituída principalmente por DNA que se localizava na parte média e uma fase aquosa contendo RNA total, localizada no sobrenadante. A fase aquosa (transparente) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e o restante foi descartado. Então, foram adicionados 250 µL de álcool isopropílico seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O material então foi centrifugado por 10 minutos (12.000g, 4ºC) para promover a precipitação do RNA total. Os sobrenadantes foram descartadose o precipitado (pellet) foi ressuspendido em 500 µL de etanol a 75%, seguido de centrifugação por 5 minutos a 7.500g (4ºC) e o sobrenadante descartado novamente.

Posteriormente, os tubos com precipitado de RNA foram deixados secando sobre um papel toalha por 5 minutos e então foram ressuspendidos em 20 µL de água ultra-pura livre de DNAse e RNAse e aquecido a 55ºC por 10 minutos em banho maria para solubilização do RNA.

4.6.2 Transcrição reversa

Para se obter o cDNA, foi realizado a transcrição reversa, onde, inicialmente, foram adicionados 11,5 µL da amostra com 1 µL do *Randon Primer* e incubados a 70ºC por 5 minutos, depois retirados e incubados mais 5 minutos em gelo. Em seguida, a mistura anterior foi adicionada ao mix contendo: 4 µL de tampão TR4, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 1,5 µL de mix de nucleotídeos, 1 µL de enzima TR4 e 2 µL de água. A amostra final foi então colocada em um termociclador, programado da seguinte maneira: 5 minutos a 25ºC, 1 hora a 37ºC e 15 minutos a 70ºC.

4.6.3 PCR em tempo real

Após a síntese de cDNA foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do cDNA com pares de primers baseados em sequências previamente publicadas ou desenhados com auxílio do Primer-BLAST (NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine USA) (Tabela 1). Para o normalizador foi utilizado o gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Os *primers* utilizados foram produzidos pela Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil).

O PCR em tempo real foi realizado, utilizando-se e 5 µL de *SybrGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,4 µL do *primer*de interesse, 3,6 µL de água DPEC, e 1 µL de amostra totalizando 10 µL de volume final. Todas as reações foram realizadas em duplicatas em placas ópticas de 48 poços (Applied Biosystems). Os parâmetros para o PCR foram: um ciclo à 52ºC por 2 min, um ciclo à 95ºC por 10 min e 40 ciclos à 95ºC por 30 segundos e 50ºC por 1 min. O controle negativo da reação foi obtido substituindo a amostra de cDNA por água DEPC.

A quantificação relativa do mRNA foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, de acordo com LIVAK & SCHMITTGEN (2001)(Livak and Schmittgen, 2001). O Ct (*Threshold cycle*) dos genes alvos foi normalizado com o Ct do gene de expressão constitutiva através da seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = Ct^{\text{Gene alvo}} - Ct^{\text{Gapdh}}$$

Em seguida foi calculado o ΔΔCt para receptor de cada grupo, tendo como referência a média do ΔCt do grupo OVX:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{\text{Gene alvo}} - \text{média do } \Delta Ct^{\text{Grupo OVX}}$$

Para posteriormente se obter o $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

TABELA 1: Primers utilizados para o PCR em tempo real.

Genes	*Primer Forward* (5'→3')	*Primer* Reverso (5'→3')	Tamanho (pb*)	Referência
Mfn1	ATGTGTCGCCTTCTTGCTCT	ATCTACTGCCTGGGGACCTT	69	(Sacks et al., 2018)
Mfn2	ATGTGTCGCCTTCTTGCT CT	ATCTACTGCCTGGGG ACCTT	135	(Sacks et al., 2018)
Pgc1a	ATGTGTCGCCTTCTTGCT CT	ATCTACTGCCTGGGG ACCTT	179	(Amengual-Cladera et al., 2012)
Ucp1	AGACAGAAGGATTGCCGAAACT	TCTTGCTTCCCAAAGAGGCAG	150	Desenho novo*
Gapdh	ACATGGCCTCCAAGGAGTAA	GGATAGGGCCTCTCTTGCTCA	74	Desenho novo*

* Primers desenhados com auxílio do Primer-BLAST (*NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine USA*).

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 6.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Os resultados foram expressos como média ± erro–padrão da média e os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov and Smirnov. Os dados apresentaram distribuição paramétrica e foram submetidos ao teste T de Student. Os dados de expressão gênica também foram submetidos à análise de correlação usando o coeficiente de correlação de Pearson seguida de regressão linear simples. O nível de significância adotado em todos os testes foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Balanço de Calor

Logo antes da eutanásia os animais foram pesados para ajustar a dosagem de anestésico, bem como para se ter um parâmetro de avaliação na pesagem dos tecidos *post mortem*. Os dados dos pesos dos animais, do tecido adiposo marrom (TAM) e do útero são mostrados na Tabela 2: Foi observado aumento significativo dos úteros dos animais com reposição hormonal com E_2 aos 14 dias após a ovariectomia, indicando a eficácia o tratamento. Também foi observado menor peso do tecido adiposo marrom dos animais com tratamento hormonal.

TABELA 2: Caracterização dos parâmetros corporais de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2) (n = 7/grupo).* : Teste T de Student.

Parâmetros	OVX	E2	Valor de P*
Peso Corporal (g)	257,70±14,01	243,70 ± 3,62	0,3525
Tecido adiposo Marrom (g)	0,20± 0,02	0,13 ± 0,01	< 0,05
Tecido adiposo Marrom (g) / Peso corporal (Kg)	0,84 ± 0,09	0,57 ± 0,07	< 0,05
Útero (g)	0,16 ± 0,01	0,34 ± 0,03	< 0,001
Útero (g) / Peso corporal (Kg)	0,62 ± 0,06	1,41 ± 0,14	< 0,001

Para avaliar o efeito da reposição hormonal com E_2 sobre o balanço de calor de ratas ovariectomizadas, foram realizadas medidas da temperatura interna, da cauda, calorimetria indireta e análise da temperatura da superfície da cauda por termometria. Como pode ser observada na Figura 3, asratas castradas apresentarammaiores oscilações da temperatura da cauda, condizente com o modelo de ondas de calor. O tratamento hormonal com estradiol aboliu essas oscilações. Não foram observadas oscilações na temperatura interna em ambos grupos.Ao avaliar a média da temperatura interna e cauda no intervalo de 1 hora, não foi observada diferença significativa na temperatura interna, já o grupo OVX apresentou temperatura da cauda significativamente maior (24,6º ± 0,3 ºC) que o grupo E2 (22,7 ± 0,3 ºC), indicando menor dissipação de calor após a reposição hormonal (FIG. 4).

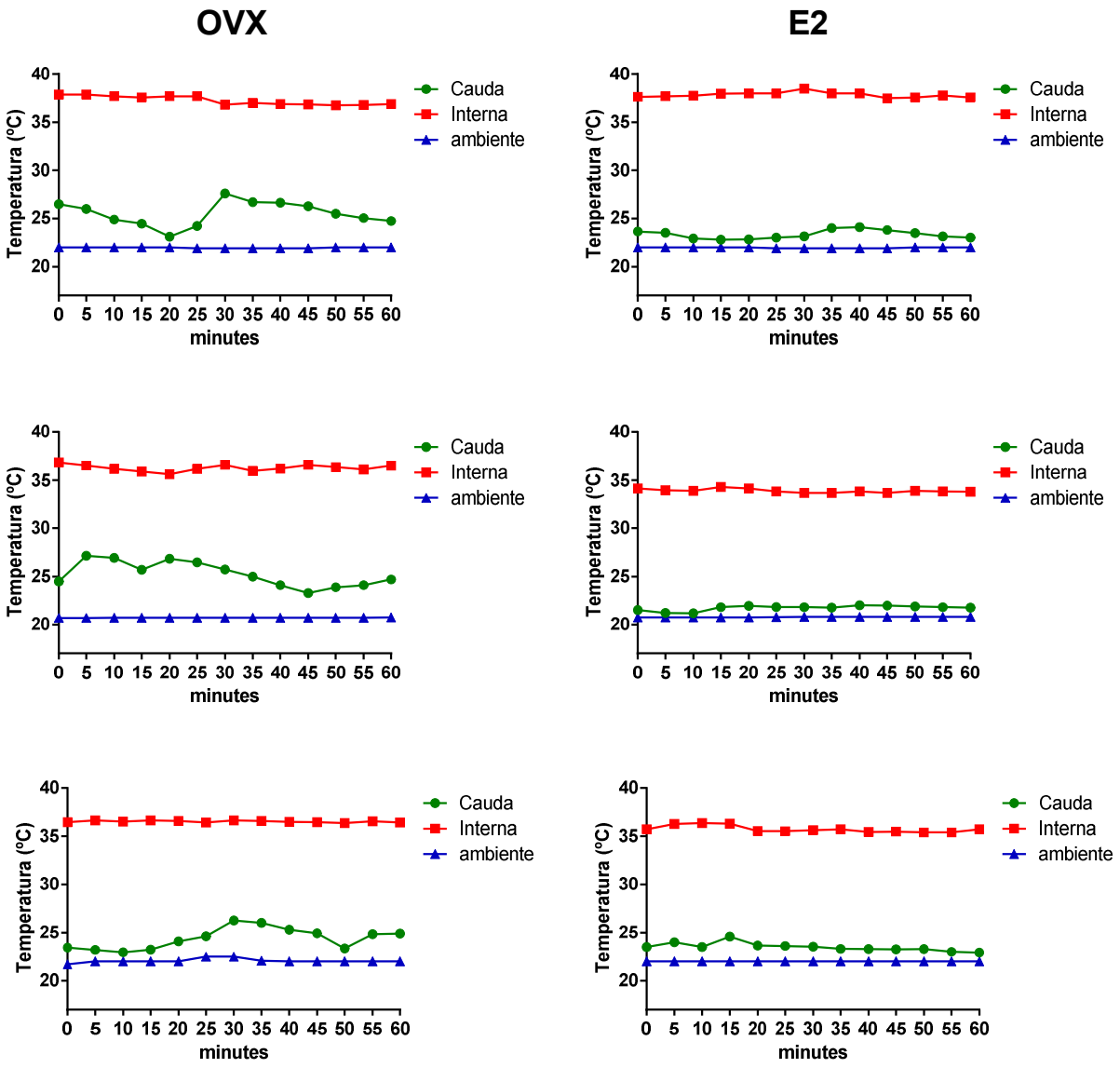

FIGURA 3: Medida de temperatura interna e da cauda de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2). Foram feitas medidas de 5 em 5 minutos durante uma hora.

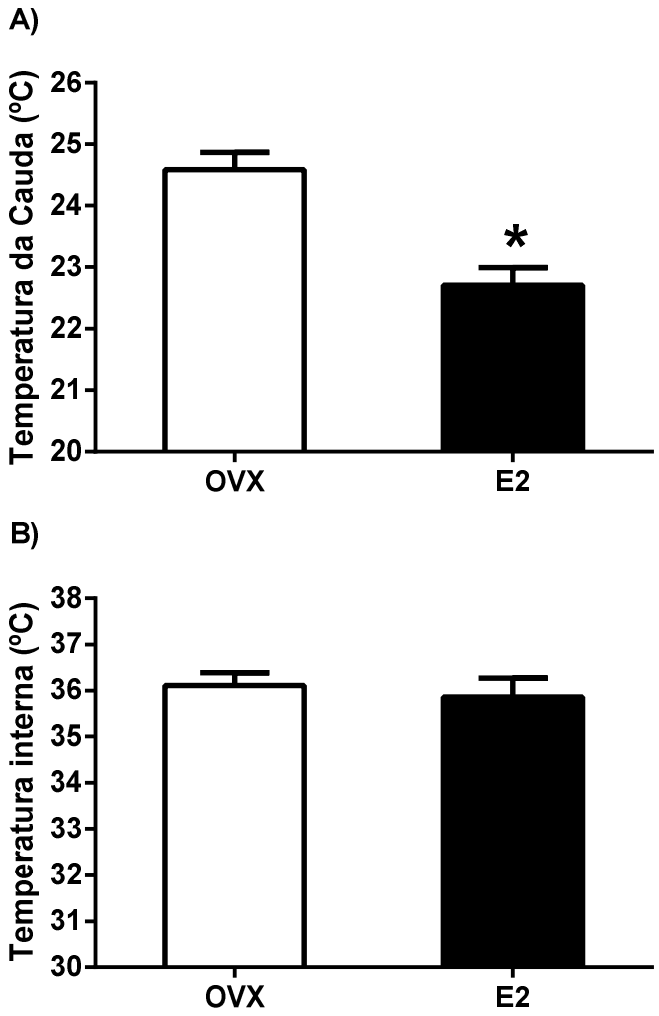

FIGURA 4: Média das temperaturas da cauda (A) e da temperatura interna (B) de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2) durante 1 hora de registro ; *: $p<0,05$, teste T de Student (n= 7/grupo).

A temperatura da superfície da cauda também foi avaliada por termometria como pode ser observado na Figura 5, observou-se oscilação das medidas de temperatura em ambos os grupos com maiores picos de dissipação de calor no grupo OVX. Também foi observada uma redução da área sob a curva da temperatura da cauda após tratamento hormonal com estradiol.

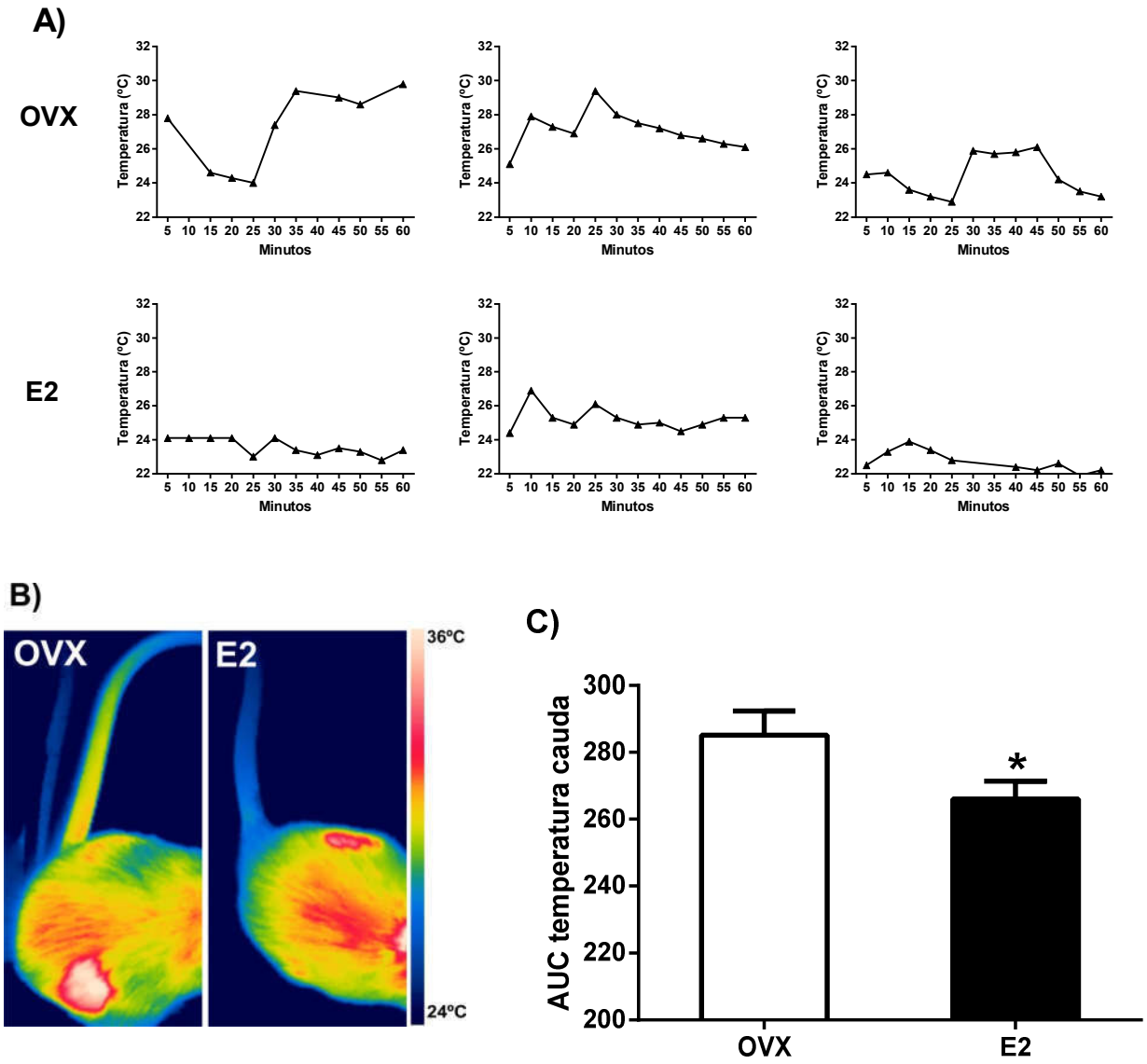

FIGURA 5: Medida da temperatura da cauda de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2) durante 1 hora de registro através da câmera termossensível. Foram feitos registros de 5 em 5 minutos durante uma hora. A) Variação da temperatura durante o tempo amostrado. B) Imagens termométricas representativas de um animal de cada grupo; C) Área sobre a curva da temperatura da cauda (C) durante 1 hora de registro. *: $p<0,05$, teste T de Student (n= 7/grupo).

Para dar continuidade à análise do balanço de calor, foi realizada calorimetria indireta que permitiu avaliar o metabolismo respiratório dos animais, principalmente o consumo de O_2 (VO_2) que é uma medida indireta da produção de ATP e de calor pelas mitocôndrias. Como pode ser observado na Figura 7, não houve diferença significativa entre ambos os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados.

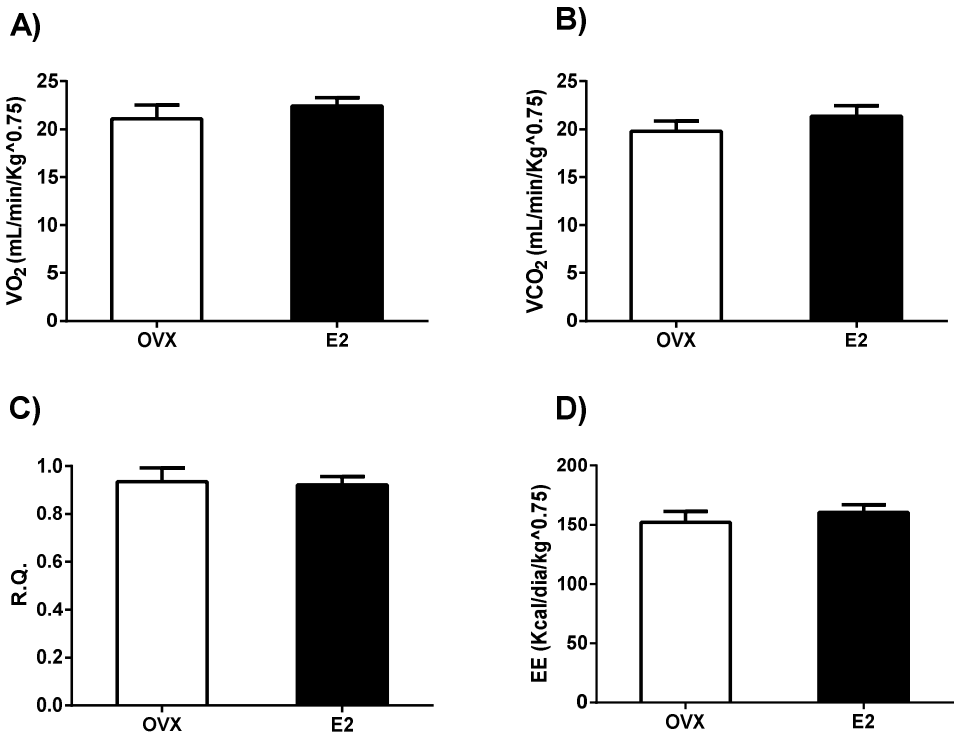

FIGURA 6: Dados de calorimetria indireta de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2) durante 2 horas de registroA) Consumo de oxigênio (VCO_2); B) Produção de gás carbônico (VCO_2); C) Coeficiente respiratório (R.Q); D) Taxa metabólica basal (EE). Não foram observadas diferenças significativas (Teste T de Student, n= 7/grupo).

5.2 Microscopia

Para compreender o efeito do estradiol sobre TAM, foi avaliado as alterações na população mitocondrial dos adipócitos através de microscopia eletrônica de transmissão

(TEM). Como pode ser observado na Figura 7 os adipócitos apresentam citoplasma relativamente abundante, núcleo ligeiramente excêntrico, gotículas lipídicas de tamanhos diversos e mitocôndrias com cristas paralelas distribuídas aleatoriamente no citoplasma.

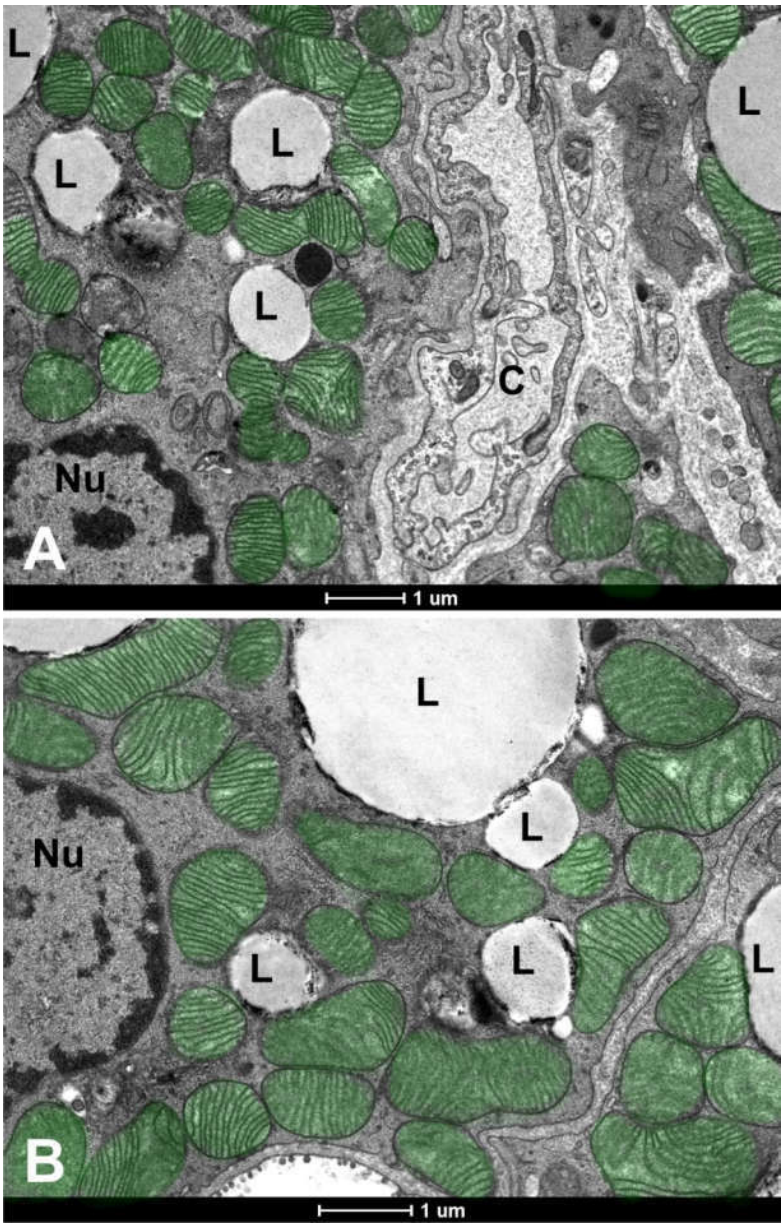

FIGURA 7: Micrografia eletrônica de transmissão de adipócitos marrons de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal. (A) e com reposição com 17β-estradiol (B). As mitocôndrias foram destacadas de verde; C: capilar; L: gotículas lipídicas; Nu: núcleo.

Após a análise de densidade volumétrica, observou-se conteúdo mitocondrial significativamente menor no grupo com reposição hormonal (27,1%) em comparação com o

grupo OVX (32.4%) (FIG. 9). Já o grupo E2 apresentou maior porcentagem de gotículas lipídicaspor microscopia de luz (FIG. 10).

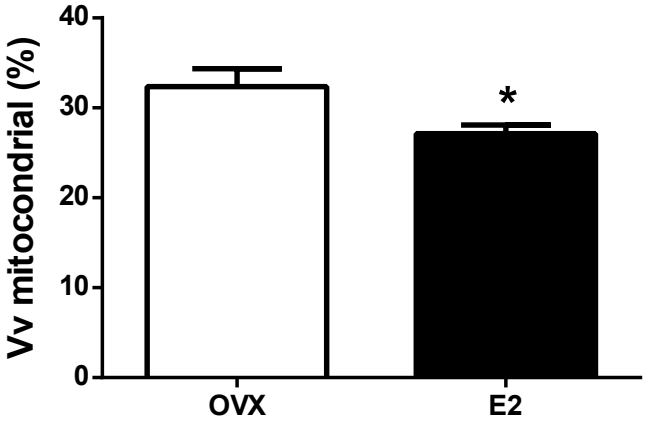

FIGURA 8: Densidade volumétrica (Vv) mitocondrial do tecido adiposo marrom de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2); *: p<0,05, teste T de Student (n= 30 adipócitos/grupo).

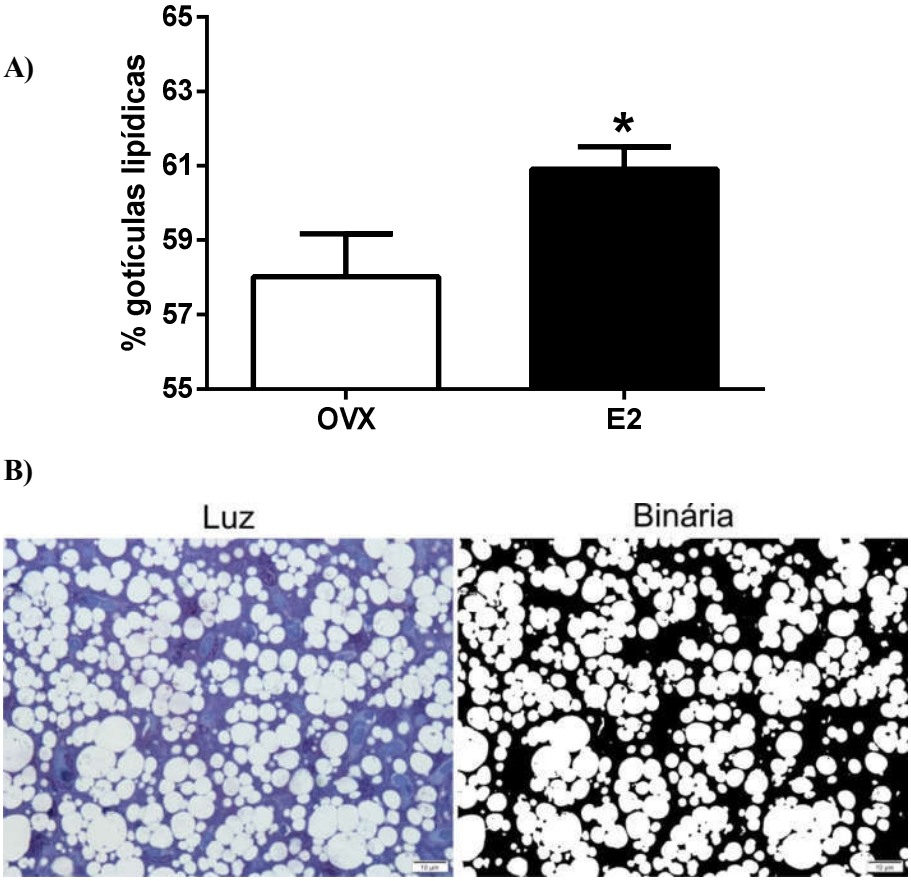

FIGURA 9: A) Percentual de conteúdo citoplasmático do tecido adiposo marrom de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2); B)

Imagem representativa do corte semifino de 200 nm de espessura corado com azul de toluid; Barra de escala = 10µm; *: p<0,05, teste T de Student (n= 15 imagens/grupo).

Ao se avaliar o tamanho das partículas mitocôndrias, observou-se que os adipócitos dos animais tratados com estradiol apresentavam mitocôndrias significativamente maiores que o grupo OVX (FIG. 11), sugerindo maior processo de fusão mitocondrial no grupo E2 ou de fissão no grupo OVX. Os parâmetros de tamanho mitocondrial avaliados foram: área, perímetro, maior e menor diâmetros. Ao se avaliar a razão entre perímetro:área, observou-se que o grupo OVX apresentou valores significativamente maiores, indicando maior superfície de troca entre mitocôndrias e citoplasma nos adipócitos desse grupo (FIG. 12).

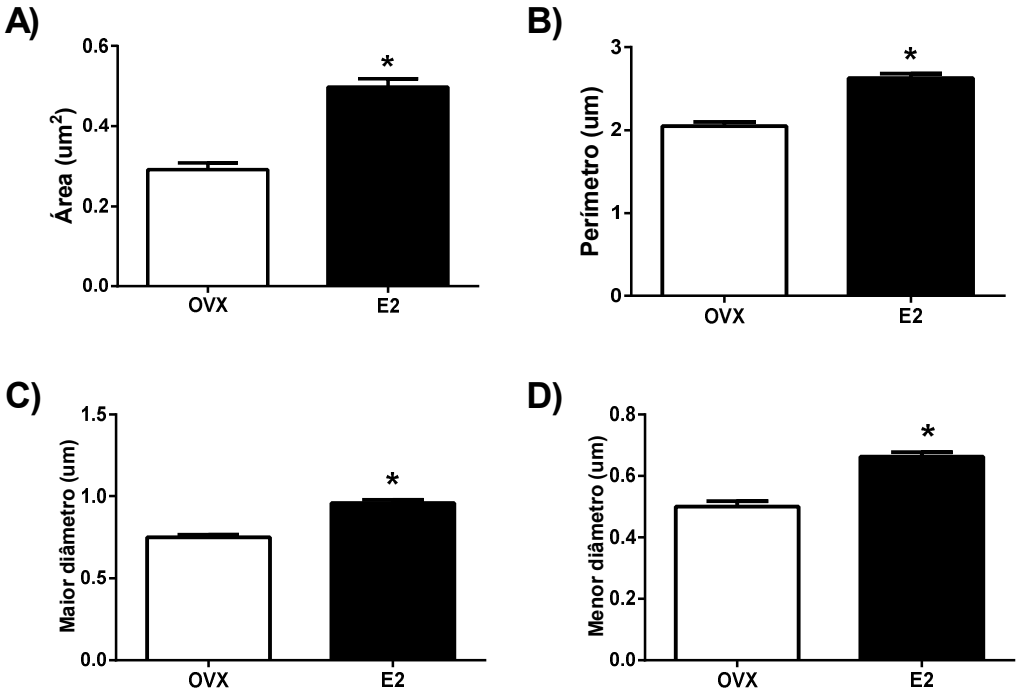

FIGURA 10: Parâmetros de tamanho mitocondrial do tecido adiposo marrom de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2); A) Área; B) Perímetro; C) Maior diâmetro; D) Menor diâmetro; *: p<0,05, teste T de Student (n = 30 adipócitos /grupo).

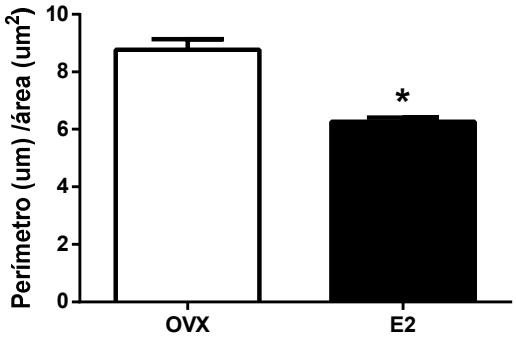

FIGURA 11: A) Razão perímetro:área das mitocôndrias do tecido adiposo marromde ratas ovariectomizadas (OVX) e ratas ovariectomizadas tratadas com 17β-estradiol (E2); *: p<0,05, teste T de Student (n= 15 imagens/grupo).

No entanto, ao se avaliar os parâmetros de formato das partículas mitocondriais não foram observadas diferenças nos parâmetros de esfericidade e elipsidade entre ambos os grupos. (FIG. 13).

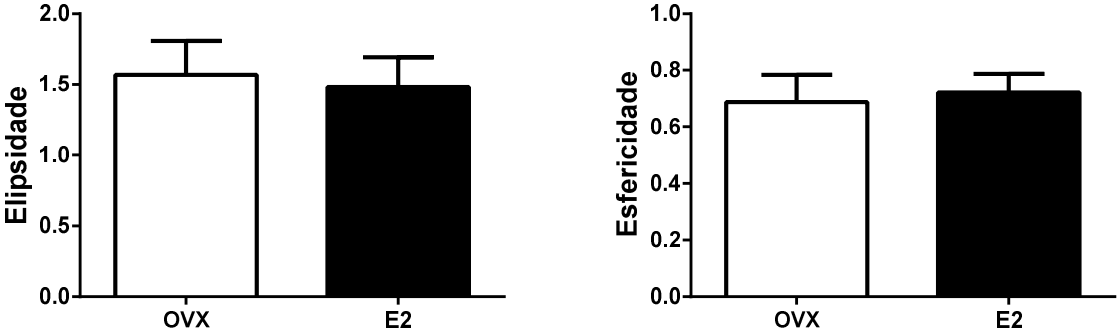

FIGURA 12: Parâmetros de formato de partículas mitocondriais do tecido adiposo marrom de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX) e com reposição com 17β-estradiol (E2); *: p<0,05, teste T de Student (n = 30 adipócitos /grupo).

5.3 Expressão gênica

Para elucidar os mecanismos moleculares responsáveis pelas diferenças dos parâmetros mitocondriais observados na microscopia no presente estudo, fizemos a análise de genes relacionados combiogênese mitocondrial (*Pgc1a*),termogênese (*Ucp1*) e fusão mitocondrial (*Mfn1* e *Mfn2*).Foi observada expressão reduzida do RNAm dos genes

para*Pgc1a,Ucp1* e*Mfn1*dos animais com reposição hormonal (FIG. 14A-C), e expressão aumentada da *Mfn2* nesse mesmo grupo (FIG. 14D). Foi observada também forte correlação entre a expressão dos genes*Pgc1a*, *Ucp1* e *Mfn1* como pode ser observada na Tabela 3.

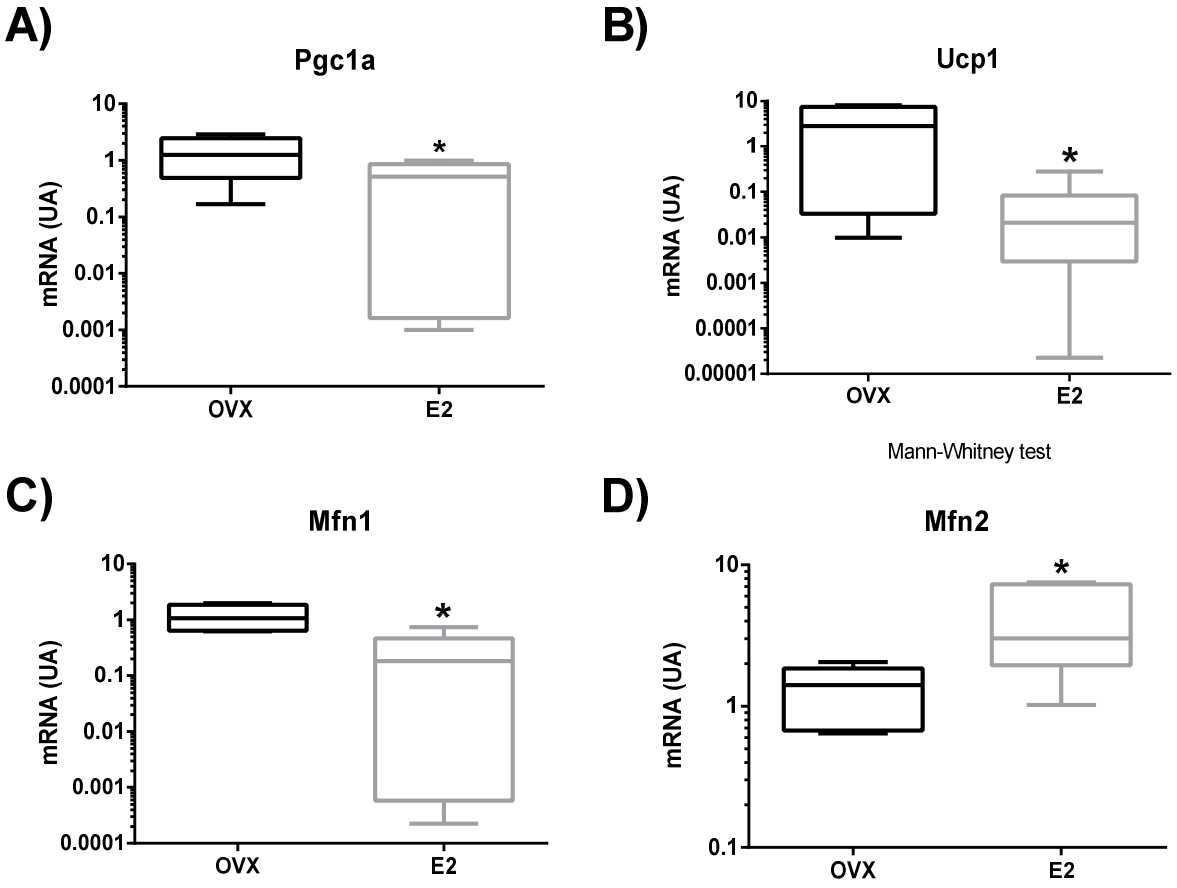

FIGURA 13: Expressão gênica relativa (RNAm) para os genes Pgc1a (A), Ucp1 (B), Mfn1 (C) e Mfn2 (D) no tecido adiposo marrom de ratas ovariectomizadas sem reposição hormonal (OVX, n = 5) e com reposição com 17β-estradiol (E2, n = 7); *: $p<0,05$, teste T de Student.

TABELA 3: Análise de correlação da expressão gênica relativa.

	Pgc1a			***Ucp1***			***Mfn1***			***Mfn2***	
	β	**P**	**R^2**	**B**	**P**	**R^2**	**β**	**P**	**R^2**	**β**	**P**
Pgc1a				0,891	**0,0002**	0,793	0,849	**0,0001**	0,772	-0,262	0,465
Ucp1							0,841	**0,002**	0,708	-0,285	0,457
Mfn1										-0,585	0,098
Mfn2											

6 DISCUSSÃO

As ondas de calor sãoum fenômeno experenciado pela maioria das mulheres durante a fase de transição da menopausa, sendo caracterizada por sudorese, calor intenso e vasodilatação periférica, acarretando em prejuízos na qualidade de vida nessa parcela da população. É sugerido que a diminuição dos estrógenos durante a transição da menopausa aumenta a sensibilidade das vias neurais termorreguladoras levando à ativação inapropriada dos mecanismos de dissipação de calor (Dacks and Rance, 2010).Com isso, a reposição hormonal com estrógeno vem sendo utilizada como uma das medidas farmacológicas efetivas no tratamento desses sintomas (Mallhi et al., 2018; Santoro et al., 2015). A maioria dos estudos investigam a ação do estrógeno na prevenção das ondas de calor utilizando medidas de dissipação de calor. Porém, até o momento, não foi investigado o papel da produção de calor durante esse fenômeno. No presente estudo, observamos que a ovariectomia promove um aumento da dissipação de calor (temperatura da cauda) e que a reposição com estrógeno é capaz de diminuir essa dissipação sem alterar a temperatura interna que se mantém semelhante ao grupo castrado. Esses resultados sugerem queo estradiol é capaz de prevenir as ondas de calor e que a diminuição do estrógeno promovida pela ovariectomia leva a um aumento na produção de calor.

Além da análise da temperatura com termossensores, realizarmos termometria para avaliar a temperatura da superfície da cauda. Essa técnica é bastante sensível, permitindo analisar de forma não invasiva a temperatura da superfície corporal (Całkosiński et al, 2015). Durante a análise por termometria, observamos a diminuição dos picos de dissipação de calor através da temperatura da superfície da cauda no grupo E2, semelhante ao observado quando utilizado o sensor preso na cauda. Também foi observada variações maiores das medidas de temperatura tanto dos animais E2 quanto dos OVX. Essa variabilidade pode ter ocorrido devido ao fato dos animais estarem livres nas caixas. Mesmo assim, ao se analisar área sob a curva da temperatura da cauda, foi observado valores menores nos animais com reposição hormonal, semelhante ao registro obtido com o sensor de temperatura da cauda.

Estudos anteriores também demonstraram que o estradiol promove a diminuição da temperatura da superfície da cauda de ratas ovariectomizadas na fase clara do ciclo circadiano (Hosono et al., 2001; Kobayashi et al., 2000; Lee et al., 2016; Opas et al., 2004; Pan et al., 2001). No presente estudo, analisamos a temperatura dos animais na fase escura que é o período ativo do animal, quando o efeito da ovariectomia sobre o aumento da dissipação de

calor é maior de acordo com outros estudos(Berendsen et al., 2001; Bowe et al., 2006).Alguns trabalhos semelhantes ao nosso que fizeram a reposição hormonal de E2 com capsula subcutânea também observaram uma diminuição da temperatura da cauda sem alterações na temperatura interna (Dacks and Rance, 2010; Kobayashi et al., 2000; Mittelman-smith et al., 2015), corroborando nossa hipótese que, além do efeito vasomotor induzidopela diminuição do estrógeno após ovariectomia, a redução desse hormônio também interfira na termogênese contribuindo para ocorrência das ondas de calor.

Dando continuidade ao estudo sobre o balanço de calor dos animais castrados com e sem reposição hormonal, realizamos a calorimetria indireta para avaliarmos o metabolismo desses animais. Sabendo-se que o oxigênio é utilizado para oxidar os substratos energéticos e que o gás carbônico é eliminado pela respiração, é possível calcular a taxa metabólica, ou "produção de energia", que significa a conversão de energia química de substratos energéticos em energia química armazenada na forma de ATP e na energia dissipada na forma de calor(Diener, 1997). Não observamos diferença entre os animais com e sem reposição hormonal para nenhum dos parâmetros fornecidos pela calorimetria. É importante ressaltar que apesar dessa técnica fornecer dados precisos sobre a taxa metabólica dos animais, o consumo de O_2(VO_2) pode estar relacionada tanto à produção de ATP quanto à produção de calor, não sendo possível quantificar ambas produções separadamente por esse método(Simonson and Defronzo, 1990). Com isso, podemos inferir que a ausência de diferença na taxa metabólica entre ambos os grupos não descarta a possibilidade do aumento na produção de calor induzida pela ovariectomia. Nigro *et al* (2014) da mesma forma, não encontrou diferença entre consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas do TAM em animais castrados em relação ao seu grupo controle. Nesse mesmo estudo, no entanto, quando a atividade de *Ucp1* era inibida, foi observado um aumento na síntese de ATP no grupo OVX (quando comparado com o grupo Sham) com 12 semanas após a ovariectomia, sugerindoque a a ovariectomia pode levar a um aumento da termogênese nesse modelo estudado.

Diferentes estudos mostram que a ovariectomia pode promover diminuição da taxa metabólica basal acompanhada pelo aumento no ganho de peso, enquanto a reposição hormonal com estradiol previne esses efeitos (Giles et al., 2010; Laudenslager et al., 1980; Ryuk et al., 2017). Há estudos que mostraram que a ovariectomia promoveu aumento no ganho de peso não por alterações na taxa metabólica dos animais mas por um aumento da ingestão de energia metabolizável (Asarian and Geary, 2002; Dagnault et al., 1996; Richard, 1986; Witte et al., 2010).No presente estudo, não observamos alterações metabólicas nem diferença no peso corporal entre nossos grupos experimentais após duas semanas.

Corroborando nossos resultados, outros trabalhos também não observaram alterações no ganho de peso ou na taxa metabólica dos animais após ovariectomia (Bartness and Wade, 1984; Carlisle et al., 1979; Laudenslager et al., 1980; Nigro et al., 2014). Essas diferenças entre vários estudos podem refletir diferenças metodológicas tanto relacionadas à via de administração e duração do tratamento com estradiol, quanto ao início da reposição hormonal após a ovariectomia.

Ao avaliarmos o peso do tecido adiposo marrom (TAM) interescapular, verificamos que o mesmo estava reduzido no grupo E2, indicando a possível influência do estrógeno nesse tecido. Como o TAM é um tecido altamente termogênico devido a grande quantidade de mitocondrias e alta expressão de *Ucp1* (Shabalina et al., 2013), resolvemos avaliar as mitocôndrias desse tecido. Além disso, a região interescapular é o local onde está localizado o maior coxim de TAM em roedores, contribuindo significativamente para termogênese independente de tremores nesse modelo (Cannon and Nedergaard, 2004). Ao avaliarmos o conteúdo mitocondrial do TAM por microscopia eletrônica de transmissão, observamos que o conteúdo dessas organelas se encontrava aumentado nos adipócitos dos animais OVX, sugerindo a ocorrência de biogênese mitocondrial nesse grupo. Para confirmar se realmente estava ocorrendo biogênese mitocondrial, avaliamos a expressão do RNAm para o *Pgc1a*, principal regulador da biogênese mitocondrial (Ventura-Clapier et al., 2008). Foi constatado aumento da expressão de *Pgc1a* no grupo castrado, corroborando nossos resultados de microscopia.

Alguns trabalhos relatam que o estradiol pode levar a um aumento da expressão de *Pgc1a* mesmo sem alteração no conteúdo mitocondrial no TAM (Nadal-casellas et al., 2011; Nigro et al., 2014). Esses trabalhos inferiram a quantidade de mitocôndria através da atividade da citrato sintase (Nadal-casellas et al., 2011) e quantidade de DNA mitocondrial (Nadal-casellas et al., 2011; Nigro et al., 2014). Como revisado por Medeiros (2008), apesar dessas técnicas serem utilizadas para inferir de maneira indireta a quantidade de mitocôndria, é recomendado utilizar vários ensaios diferentes para que se possa concluir que está ocorrendo biogênese mitocondrial de fato, sendo a microscopia eletrônica o padrão ouro para esse tipo de avaliação (Medeiros, 2008). Além disso, estudo recente mostrou através de diferentes ensaios para quantificação de mitocôndriasque a microscopia é o método mais preciso nesse tipo de investigação(Dahl et al., 2015). Dessa forma, nosso estudo permite inferir que está ocorrendo mais biogênese mitocondrial no grupo castrado.

O aumento do conteúdo mitocondrial no grupo sem reposição hormonal também sugere maior atividade termogênica do TAM após ovariectomia. Com isso, avaliamos a

expressão da expressão *Ucp1*, principal proteína desacopladora da cadeia transportadora de elétrons no TAM (Cannon and Nedergaard, 2004). Já está estabelecido na literatura que baixas temperaturas e ação hormonal da norepinefrina(NE) controlam a expressão de *Ucp1* no TAM (Cannon and Nedergaard, 2004).A NE liberada através dos terminais simpáticos que inervam o TAM é responsável pela diferenciação desses adipócitos através do aumento da expressão de *Ucp1*(Herron et al., 1990), biogênese mitocondrial e proliferação celular (Bronnikov et al., 1992; Valladares et al., 2000).No presente estudo, observamos níveis aumentados do RNAm desse gene nos animais ovariectomizados além de forte correlação positiva entre a expressão gênica de *Pgc1a* e *Ucp1*. Barbato et al. (2015) também mostrou aumento da expressão do *Pgc1a* no TAM acompanhado por um aumento da expressão de *Ucp1* (Barbato et al., 2015). Apesar disso, o efeito da reposição hormonal com estradiol sobre a expressão da *Ucp1* no TAM apresenta resultados contraditórios na literatura. Há trabalhos que mostraram aumento da expressão do mRNA desse gene (Monjo et al., 2003; Morentin et al., 2014; Pedersen et al., 2001; Valle et al., 2008) ou ausência de efeito (Grefhorst et al., 2015; Nigro et al., 2014; Rodríguez et al., 2002). Também há estudos que corroboram nossos resultados onde foi mostrado que o estradiol inibe a termogênese do BAT (Puerta et al., 1993) através da diminuição da afinidade/densidade dos receptores adrenérgicos nos adipócitos (Malo and Puerta, 2001). Uma explicação plausível para essas diferenças pode estar no esquema e no tempo de tratamento. Outra possibilidade da diminuição do efeito estradiol em induzir a expressão do RNAm para *Ucp1* em nosso modelo pode ser devido à redução da expressão dos receptores de estrógeno pelo próprio estrógeno (Borrás et al., 1994). De qualquer maneira, estudos futuros são necessários para esclarecer os mecanismos de regulação temporal da expressão de *Ucp1* pelo estradiol no TAM.

Ao avaliarmos o tamanho das mitocôndrias, observamos que o grupo tratado com estradiol apresentava valores de área, perímetro e diâmetros aumentados. Esses resultados indicam que está ocorrendo predominância de fusão mitocondrial no grupo tratado com estradiol e/ou de fissão no grupo ovariectomizado. Já é conhecido que as mitocôndrias sofrem ciclos contínuos de fusão e fissão (Liesa and Shirihai, 2013) e que o TAM das fêmeas de roedores contém conteúdo e tamanho mitocondrial maiores (Rodrígues-Cuenca et al., 2002). Em situação de estresse bioenergético as mitocôndrias sofrem processo de fragmentação que pode culminar em apoptose (Molina et al., 2009). Entretanto, o processo de fissão parece não ser deletério para o TAM. De fato, a estimulação adrenérgica do tecido adiposo marrom de roedores induz mudanças substanciais na arquitetura mitocondrial com aumento da taxa de fragmentação que favorece o aumento da termogênese (Wikstrom et al., 2014). Nesse estudo

também é sugerido que a fragmentação mitocondrial pode ser uma estratégia adaptativa mais eficiente para a síntese de novas proteínas mitocondriais noTAM como a *Ucp1* e proteínas da cadeia transportadora de elétrons, potencializandoa capacidade termogênica desse tecido (Wikstrom et al., 2014).

Estudo recente também mostrou que a mitocôndria do TAM melhora sua capacidade oxidativa através do processo de fissão mitocondrial pela ação da proteína *Drp1* e que o aumento no gasto de energia está mais direcionado à produção de calor do que síntese de ATP (Pisani et al., 2018).Quando avaliamos a expressão dos genes responsáveis pelo processo de fusão mitocondrial, observamos maior expressão de *Mfn1* no grupo OVX e *Mfn2* no grupo E2, sugerindo que se a fusão mitocondrial for predominante no grupo com reposição hormonal, certamente esse processo está ocorrendo através da *Mfn2* (Bach et al., 2003). Nossos resultados também não descartam a possibilidade do predomínio de fissão mitocondrial no grupo OVX. No presente estudo não foi possível a investigação da expressão de genes envolvidos na fissão mitocondrial, sendo necessárias análises futuras da expressão desses genes para confirmar se a ovariectomia aumenta a fissão mitocondrial.

Quanto ao formato das mitocôndrias (elipsidade e espericidade), não encontramos diferenças significativas entre os grupos. Estudo de Pisani et al. (2018) mostrou que mitocôndrias *Upc1*-positivas apresentavam formato preferencialmente arredondado enquanto as *Upc1*-negativas tem formato preferencialmente alongados (Pisani et al., 2018). Já em relação à razão perímetro/área, encontramos um valor aumentado, indicando maior superfície de contato entre a mitocôndria e o citoplasma celular que poderia facilitar o processo de intercâmbio de moléculas. Estudo anterior com cultura de adipócitos marrons mostrou que as células tratadas com 17β-estradiol apresentam gotículas lipídicas maiores (Rodríguez et al., 2002). No nosso estudo também observamos maior densidade de gotículas lipídicas nos animais tratados com estradiol. Certamente o grupo sem reposição hormonal por apresentar conteúdo mitocondrial aumentado, maior expressão de *Pgc1a* e *Ucp1*, mitocôndrias menores (predomínio de fissão mitocondrial que aumenta a capacidade oxidativa), maior relação perímetro/área e menor densidade lipídica (sugestivo de mais lipólise), indicam um possível aumento da termogênese nos adipócitos desse grupo.

No presente estudo observamos que a ovariectomia e a reposição hormonal com estradiol influenciam a morfologiadas mitocôndrias do TAM e a expressão de alguns genes. Uma limitação do nosso estudo foi não ser possível distinguir se há uma ação direta do estradiol sobre os adipócitos, pois os mesmos apresentam receptores para estrógenos (Pedersen et al., 1991; Wade and Gray, 1978) ou efeito indireto através de modulação central

(Cannon and Nedergaard, 2004). O hipotálamo é conhecido como centro termorregulador e trabalhos recentes mostram que o estradiol pode modular a temperatura corporal através de sua ação sobre neurônios hipotalâmicos (Morentin et al., 2014). Evidências sugerem que os sintomas vasomotores durante as ondas de calor são coordenados por neurônios KNDy no núcleo arqueado do hipotálamo (Rance et al., 2013). Esses neurônios produzem três neuropeptídeos, sendo eles: kisspeptina (Kiss1), neuroquinina B (NKB) e dinorfina (dynorphyn). Eles são considerados como reguladores centrais da reprodução e sua atividade pulsátil é responsável pela secreção de GnRH (Irwig et al., 2004; Navarro et al., 2009). Esses neurônios KNDy detectam os níveis circulantes de hormônios sexuais e modulam a atividade dos neurônios GnRH, que por sua vez controla o *feedback* negativo das gonadotrofinas (LH e FSH) (Mittelman-smith et al., 2012). Na menopausa e na castração ocorre um aumento da expressão de neuronios KNDy (Rance, 2009). Quando os níveis circulantes dos hormônios sexuais declinam, os neurônios KNDy ficam mais ativos, aumentando a secreção de gonadotrofinas na tentativa de aumentar os níveis dos hormônios sexuais (Mittelman-smith et al., 2012). Apesar dessa limitação do nosso estudo em definir se a reposição hormonal com estradiol apresenta efeito direto ou indireto sobre as mitocôndrias do TAM, nossos resultados abrem novas perspectivas de investigação dos mecanismos envolvidos na produção de calor durante o fenômeno de ondas de calor na menopausa através da modulação da morfofisiologia mitocondrial.

Na Tabela 4 apresentamos uma síntese comparativa dos resultados obtidos no presente estudo.

TABELA 4: Síntese dos resultados obtidos

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS/SISTÊMICOS	
Peso Corporal	OVX = E2
Peso do útero	OVX < E2
Peso do TAM	OVX > E2
Temperatura da cauda	OVX > E2
Temperatura interna (retal)	OVX = E2
VO_2	OVX = E2
VCO_2	OVX = E2
RQ	OVX = E2
EE	OVX = E2

MICROSCOPIA	
Vv Micondrial	OVX > E2
Perímetro mitocondrial	OVX < E2
Área mitocondrial	OVX < E2
Comprimento	OVX > E2
Razão Perímetro/Área	OVX > E2
Elipsidade	OVX = E2
Esfericidade	OVX = E2
% Gotículas lipídicas	OVX < E2

EXPRESSÃO GÊNICA (mRNA)	
Pgc1a	OVX > E2
Ucp1	OVX > E2
Mfn1	OVX > E2
Mfn2	OVX < E2

7 CONCLUSÃO

A ovariectomia induz um aumento da dissipação de calor e a reposição hormonal com estrógeno previne os efeitos da ovariectomia sem alterações na temperatura interna. Nossos resultados sugerem que ovariectomia promove um aumento na termogênese através de alterações morfofuncionais das mitocondrias do tecido adiposo marrom.

8 REFERÊNCIAS

ABDI, Fatemeh; MOBEDI, Hamid; ROOZBEH, Nasibeh. Hops for menopausal vasomotor symptoms: Mechanisms of action. **Journal of menopausal medicine**, 2016.

AL-AZZAWI, Farook; PALACIOS, Santiago. Hormonal changes during menopause. **Maturitas**, v. 63, n. 2, p. 135-137, 2009.

AMENGUAL-CLADERA, Emilia et al. Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17β-estradiol replacement. **Steroids**, v. 77, n. 6, p. 659-665, 2012.

ARNOLD, Susanne; VICTOR, Marion Barbara; BEYER, Cordian. Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 131, n. 1-2, p. 2-9, 2012.

ASARIAN, Lori; GEARY, Nori. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Hormones and behavior**, v. 42, n. 4, p. 461-471, 2002.

AVIS, Nancy E. et al. Duration of menopausal vasomotor symptoms over the menopause transition. **JAMA internal medicine**, v. 175, n. 4, p. 531-539, 2015.

BACH, Daniel et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism A novel regulatory mechanism altered in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17190-17197, 2003.

BARBATO, Daniele Lettieri et al. Mitochondrial Hormesis links nutrient restriction to improved metabolism in fat cell. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 10, p. 869, 2015.

BARTNESS, Timothy J.; WADE, George N. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. **Behavioral neuroscience**, v. 98, n. 4, p. 674, 1984.

BCERUG, U. et al. Do combinations of 1 mg estradiol and low doses of NETA effectively control menopausal symptoms?. **Climacteric**, v. 1, n. 3, p. 219-228, 1998.

BERENDSEN, Hemmie HG; WEEKERS, Albert HJ; KLOOSTERBOER, Helenius J. Effect of tibolone and raloxifene on the tail temperature of oestrogen-deficient rats. **European journal of pharmacology**, v. 419, n. 1, p. 47-54, 2001.

BORRAS, M. et al. Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 48, n. 4, p. 325-336, 1994.

BOUTANT, Marie et al. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. **The EMBO journal**, v. 36, n. 11, p. 1543-1558, 2017.

BOWE, James et al. The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes. **Journal of endocrinology**, v. 191, n. 2, p. 399-405, 2006.

BRONNIKOV, G.; HOUSTĚK, J.; NEDERGAARD, J. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 2006-2013, 1992.

CAŁKOSIŃSKI, Ireneusz et al. The use of infrared thermography as a rapid, quantitative, and noninvasive method for evaluation of inflammation response in different anatomical regions of rats. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

CANNON, Barbara; NEDERGAARD, J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CARLISLE, H. J. et al. Diurnal variation of heat intake in ovariectomized, steroid-treated rats. **Hormones and behavior**, v. 12, n. 3, p. 232-242, 1979.

CHARKOUDIAN, Nisha. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. In: **Mayo clinic proceedings**. Elsevier, p. 603-612, 2003.

CHEN, Hsiuchen et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **The Journal of cell biology**, v. 160, n. 2, p. 189-200, 2003.

DACKS, Penny A.; RANCE, Naomi E. Effects of estradiol on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1187-1193, 2010.

DAGNAULT, A. N. N. E.; DESHAIES, Y. V. E. S.; RICHARD, DENIS. Involvement of type I corticosteroid receptor in the effects of ovariectomy on energy balance. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 270, n. 1, p. R199-R206, 1996.

DAHL, Rannvá et al. Three-dimensional reconstruction of the human skeletal muscle mitochondrial network as a tool to assess mitochondrial content and structural organization. **Acta physiologica**, v. 213, n. 1, p. 145-155, 2015.

DAVIS, S. R. et al. Menopause. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–19, 2015.

DE QUEIROZ, Karina Barbosa et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172103, 2017.

DEECHER, D. C.; DORRIES, K. Understanding the pathophysiology of vasomotor symptoms (hot flushes and night sweats) that occur in perimenopause, menopause, and postmenopause life stages. **Archives of women's mental health**, v. 10, n. 6, p. 247-257, 2007.

DEECHER, Darlene C. Physiology of thermoregulatory dysfunction and current approaches to the treatment of vasomotor symptoms. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14, n. 4, p. 435-448, 2005.

DIENER, J. R. C. Calorimetria indireta. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 245-253, 1997.

FELDMAN, Bernadine M.; VODA, Ann; GRONSETH, Evangeline. The prevalence of hot flash and associated variables among perimenopausal women. **Research in nursing & health**, v. 8, n. 3, p. 261-268, 1985.

FILARDO, Edward J.; THOMAS, Peter. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 2953-2962, 2012.

FONSECA, Cristina S; Envolvimento do sistema noradrenérgico e neurônios hipotalâmicos nos efeitos termorregulatórios do estrógeno em modelo animal de ondas de calor da menopausa. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 29. 2016.

FREEDMAN, Robert R.; KRELL, Willane. Reduced thermoregulatory null zone in postmenopausal women with hot flashes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 181, n. 1, p. 66-70, 1999.

FREEMAN, E. W.; SHERIF, K. Prevalence of hot flushes and night sweats around the world: a systematic review. **Climacteric**, v. 10, n. 3, p. 197-214, 2007.

FREZZA, Christian et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 177-189, 2006.

GANTNER, Marin L. et al. Complementary roles of estrogen-related receptors in brown adipocyte thermogenic function. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4770-4781, 2016.

GE, Chutian; YU, Minli; ZHANG, Caiqiao. G protein-coupled receptor 30 mediates estrogen-induced proliferation of primordial germ cells via EGFR/Akt/β-catenin signaling pathway. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 3504-3516, 2012.

GILES, Erin D. et al. Effect of the estrous cycle and surgical ovariectomy on energy balance, fuel utilization, and physical activity in lean and obese female rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2010.

GREFHORST, Aldo et al. Estrogens increase expression of bone morphogenetic protein 8b in brown adipose tissue of mice. **Biology of sex differences**, v. 6, n. 1, p. 7, 2015.

HALL, Janet E. Endocrinology of the menopause. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 44, n. 3, p. 485-496, 2015.

HEATON, Gillian M. et al. brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. **European Journal of Biochemistry**, v. 82, n. 2, p. 515-521, 1978.

HERRON, David et al. Norepinephrine-induced synthesis of the uncoupling protein thermogenin (UCP) and its mitochondrial targeting in brown adipocytes differentiated in culture. **FEBS letters**, v. 268, n. 1, p. 296-300, 1990.

HOPPINS, Suzanne; LACKNER, Laura; NUNNARI, Jodi. The machines that divide and fuse mitochondria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 751-780, 2007.

HOSONO, Takayoshi et al. Effects of estrogen on thermoregulatory tail vasomotion and heat-escape behavior in freely moving female rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 5, p. R1341-R1347, 2001.

IMAI, Atsushi et al. New generation nonhormonal management for hot flashes. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 63-66, 2013.

IRWIG, Michael S. et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 4, p. 264-272, 2004.

ISHIHARA, Naotada et al. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. **The EMBO journal**, v. 25, n. 13, p. 2966-2977, 2006.

KOBAYASHI, Tsunefumi et al. Elevation of tail skin temperature in ovariectomized rats in relation to menopausal hot flushes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 4, p. R863-R869, 2000.

LAUDENSLAGER, Mark L. et al. Energy balance in ovariectomized rats with and without estrogen replacement. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 238, n. 5, p. R400-R405, 1980.

LEE, Gyuok; CHOI, Chul-yung; JUN, Woojin. Effects of aqueous extracts of Cynanchum wilfordii in rat models for postmenopausal hot flush. **Preventive nutrition and food science**, v. 21, n. 4, p. 373, 2016.

LEE, Hsin-Chen; WEI, Yau-Huei. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 4, p. 822-834, 2005.

LEVIN, Ellis R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. **Molecular endocrinology**, v. 19, n. 8, p. 1951-1959, 2005.

LIESA, Marc; SHIRIHAI, Orian S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell metabolism**, v. 17, n. 4, p. 491-506, 2013.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAHDAVIANI, Kiana et al. Mfn2 deletion in brown adipose tissue protects from insulin resistance and impairs thermogenesis. **EMBO reports**, v. 18, n. 7, p. 1123-1138, 2017.

MALLHI, Tauqeer Hussain et al. Managing hot flushes in menopausal women: a review. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP**, v. 28, n. 6, p. 460-465, 2018.

MALO, Aurelio; PUERTA, Marisa. Oestradiol and progesterone change beta3-adrenergic receptor affinity and density in brown adipocytes. **European journal of endocrinology**, v.

145, n. 1, p. 87-91, 2001.

MATTINGLY, Kathleen A. et al. Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 3, p. 609-622, 2008.

MEDEIROS, Denis M. Assessing mitochondria biogenesis. **Methods**, v. 46, n. 4, p. 288-294, 2008.

MEEUSEN, Shelly et al. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 383-395, 2006.

MEINHARDT, Udo; MULLIS, Primus E. The essential role of the aromatase/p450arom. In: **Seminars in reproductive medicine**. Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, 2002. p. 277-284.

MELO, Dirceu S. et al. Severe calorie restriction reduces cardiometabolic risk factors and protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 106, 2016.

MITTELMAN-SMITH, Melinda A. et al. Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2800-2812, 2012.

MITTELMAN-SMITH, Melinda A. et al. Neurokinin 3 receptor-expressing neurons in the median preoptic nucleus modulate heat-dissipation effectors in the female rat. **Endocrinology**, v. 156, n. 7, p. 2552-2562, 2015.

MOLINA, Anthony JA et al. Mitochondrial networking protects β-cells from nutrient-induced apoptosis. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2303-2315, 2009.

MONJO, Marta et al. Direct effects of testosterone, 17β-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 4923-4930, 2003.

MORENTIN, Pablo B. Martínez et al. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. **Cell metabolism**, v. 20, n. 1, p. 41-53, 2014.

NADAL-CASELLAS, Antònia et al. Effects of ovariectomy and 17-β estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function. **Steroids**, v. 76, n. 10-11, p. 1051-1056, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Guide for the care and use of laboratory animals**. National Academies Press, 2010.

NAVARRO, Victor M. et al. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 38, p. 11859-11866, 2009.

NAZARI, Emad; SUJA, Fatihah. Effects of 17β-estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: a review. **Reviews on environmental health**, v. 31, n. 4, p. 465-491, 2016.

NIGRO, Mariana et al. A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2881-2891, 2014.

OPAS, Evan E. et al. Rat tail skin temperature regulation by estrogen, phytoestrogens and tamoxifen. **Maturitas**, v. 48, n. 4, p. 463-471, 2004.

OSTRONOFF, Luciana K. et al. Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. **Biochemical Journal**, v. 316, n. 1, p. 183-191, 1996.

PAN, Yuanlong et al. A comparison of oral micronized estradiol with soy phytoestrogen effects on tail skin temperatures of ovariectomized rats. **Menopause**, v. 8, n. 3, p. 171-174, 2001.

PEDERSEN, Steen B. et al. Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1093, n. 1, p. 80-86, 1991.

PEDERSEN, Steen B. et al. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 288, n. 1, p. 191-197, 2001.

PEDRO, Adriana Orcesi et al. Climacteric syndrome: a population-based study in Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 37, n. 6, p. 735-742, 2003.

PICARD, Martin; MCEWEN, Bruce S. Psychological stress and mitochondria: a conceptual framework. **Psychosomatic medicine**, v. 80, n. 2, p. 126-140, 2018.

PISANI, Didier F. et al. Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes. **Molecular metabolism**, v. 7, p. 35-44, 2018.

PUERTA, M. et al. Reduced noradrenaline responsiveness of brown adipocytes isolated from estradiol-treated rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 71, n. 10-11, p. 858-861, 1993.

PUIGSERVER, Pere; SPIEGELMAN, Bruce M. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α (PGC-1α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 1, p. 78-90, 2003.

QUARTA, Carmelo et al. Role of sex hormones in modulation of brown adipose tissue activity. **Journal of molecular endocrinology**, v. 49, n. 1, p. R1-R7, 2012.

RANCE, Naomi E. et al. Modulation of body temperature and LH secretion by hypothalamic KNDy (kisspeptin, neurokinin B and dynorphin) neurons: a novel hypothesis on the mechanism of hot flushes. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 34, n. 3, p. 211-227, 2013.

RANCE, Naomi E. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 111-122, 2009.

RICHARD, DENIS. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 250, n. 2, p. R245-R249, 1986.

RODRIGUEZ, A. M. et al. Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 10, p. 1714-1723, 2002.

RODRIGUEZ-CUENCA, Sergio et al. Sex steroid receptor expression profile in brown adipose tissue. Effects of hormonal status. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 877-886, 2007.

RODRÍGUEZ-CUENCA, Sergio et al. Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42958-42963, 2002.

RYUK, Jin Ah et al. Tetragonia tetragonioides (Pall.) Kuntze protects estrogen-deficient rats against disturbances of energy and glucose metabolism and decreases proinflammatory cytokines. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 6, p. 593-605, 2017.

SACKS, Jessica et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on liver mitochondrial dynamics in a rat model of obesity. **Physiological reports**, v. 6, n. 4, 2018.

SANTORO, Nanette; EPPERSON, C. Neill; MATHEWS, Sarah B. Menopausal symptoms and their management. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 44, n. 3, p. 497-515, 2015.

SASSARINI, J. et al. Hot flushes, vascular reactivity and the role of the α-adrenergic system. **Climacteric**, v. 15, n. 4, p. 332-338, 2012.

SCHOENAKER, Danielle AJM et al. Socioeconomic position, lifestyle factors and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. **International journal of epidemiology**, v. 43, n. 5, p. 1542-1562, 2014.

SCHREPFER, Emilie; SCORRANO, Luca. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. **Molecular cell**, v. 61, n. 5, p. 683-694, 2016.

SHABALINA, Irina G. et al. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. **Cell reports**, v. 5, n. 5, p. 1196-1203, 2013.

SIMONSON, Donald C.; DEFRONZO, RALPH A. Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 258, n. 3, p. E399-E412, 1990.

SULIMAN, Hagir B. et al. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41510-41518, 2003.

TAYLOR, W. Fred et al. Effect of high local temperature on reflex cutaneous vasodilation. **Journal of Applied Physiology**, v. 57, n. 1, p. 191-196, 1984.

TWIG, Gilad; SHIRIHAI, Orian S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 10, p. 1939-1951, 2011.

UTIAN, Wulf H. Menopause—a modern perspective from a controversial history. **Maturitas**, v. 26, n. 2, p. 73-82, 1997.

VALLADARES, Amparo et al. Noradrenaline induces brown adipocytes cell growth via β-receptors by a mechanism dependent on ERKs but independent of cAMP and PKA. **Journal of cellular physiology**, v. 185, n. 3, p. 324-330, 2000.

VALLE, Adamo et al. The serum levels of 17β-estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 1-4, p. 337-346, 2008.

VENTURA-CLAPIER, Renée; GARNIER, Anne; VEKSLER, Vladimir. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1α. **Cardiovascular research**, v. 79, n. 2, p. 208-217, 2008.

VUCETIC, Milica et al. Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1α and AMPKα. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1810, n. 12, p. 1252-1261, 2011.

WADE, GEORGE N.; GRAY, JANET M. Cytoplasmic 17β-[3H] estradiol binding in rat adipose tissues. **Endocrinology**, v. 103, n. 5, p. 1695-1701, 1978.

WEND, Korinna; WEND, Peter; KRUM, Susan A. Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, p. 19, 2012.

WIKSTROM, Jakob D. et al. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. **The EMBO journal**, v. 33, n. 5, p. 418-436, 2014.

WITTE, Michelina Messina et al. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. **General and comparative endocrinology**, v. 166, n. 3, p. 520-528, 2010.

ZHAI, Peiyong et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-α knockout and wild-type mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, n. 5, p. H1640-H1647, 2000.

ZORZANO, Antonio; LIESA, Marc; PALACÍN, Manuel. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 10, p. 1846-1854, 2009.