ISADORA CLIVATTI FURIGO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BROMOCRIPTINA
E DE ANTAGONISTAS DE PROLACTINA NO TRATAMENTO DO
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E DA OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

ISADORA CLIVATTI FURIGO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BROMOCRIPTINA
E DE ANTAGONISTAS DE PROLACTINA NO TRATAMENTO DO
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E DA OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Clivatti Furigo, Isadora

Estudo do mecanismo de ação da bromocriptina e de antagonistas de prolactina no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 e da Obesidade / Isadora Clivatti Furigo; orientador José Donato Júnior. -- São Paulo, 2016.

122 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. Prolactina. 3. Bromocriptina. 4. Antagonista de prolactina. 5. Hipotálamo. I. Donato Júnior, José , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Isadora Clivatti Furigo

Título da Tese: Estudo do mecanismo de ação da bromocriptina e de antagonistas de prolactina no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 e da Obesidade.

Orientador(a): Prof. Dr. José Donato Júnior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **012** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Donato Junior**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar*" do qual participam o(s) aluno(s), **Thais Tessari Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Laís Iatauro Cardinali, Vanessa Sayuri Nagaishi, Aline Coelho Macedo, Marina Silveira, Regina Silva** os pesquisadores **Martin Andreas Metzger, Sara Joyce Shammah Lagnado, Renata Frazão**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **19.03.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 20 de março de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

O DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
NOS TERMOS DO ARTIGO 74, PARÁGRAFO ÚNICO,
INCISO 5, ALÍNEA "B", DO
ESTATUTO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
CERTIFICA QUE

ISADORA CLIVATTI FURIGO

DE NACIONALIDADE BRASILEIRA,
PORTADORA DA CÉDULA DE IDENTIDADE
RG Nº 29.650.609-6 SP,
NASCIDA EM 28 DE OUTUBRO DE 1985
E NATURAL DO ESTADO DE SÃO PAULO,
CONCLUIU O

**CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA NA
MODALIDADE DE DIFUSÃO:
CURSO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA**

E, PARA QUE POSSA GOZAR DE TODOS OS
DIREITOS E PRERROGATIVAS LEGAIS,
OUTORGA-LHE O PRESENTE CERTIFICADO.

SÃO PAULO, 7 DE JANEIRO DE 2014.

PRESIDENTE DA COMISSÃO
DE CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

EDNA TERUKO KIMURA

DIRETOR
JACKSON CIONI BITTENCOURT

*Aos meus pais, Décio e Helena, aos meus irmãos, Isabella e Neto, e ao meu
noivo Lucas, por todo o apoio incondicional que me foi dado. Amo vocês!
Em memória do Nono Alfredo e Nona Maria, que estão olhando por nós!*

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, meus pais, irmãos, avós, tios e primos, por todo incentivo, educação e amor imensurável! Pelo cuidado, preocupação e conselhos. Em especial aos meus pais, que me ensinaram a importância dos estudos, e me proporcionaram uma educação para toda a vida! Eles são o meu alicerce, minhas inspirações!

Ao meu noivo Lucas por todo amor e carinho, por sempre me apoiar, me entender, dividir os momentos felizes e maçantes do desenvolvimento de uma tese. Por estar sempre ao meu lado, incentivando-me e dando-me força. Admiro-o muito!

Ao meu orientador José Donato Júnior por ter aberto as portas do seu laboratório e ter acreditado em meu trabalho. Por ser um exemplo de pessoa perseverante, que não desiste de realizar uma investigação científica por problemas adversos. A ele sou muito grata!

Aos meus amigos de laboratório, Angie, Pry, Dani e João, por toda a colaboração, a qual foi além do auxílio profissional. Vocês colocaram em prática, literalmente, o conceito de trabalho em equipe! Em especial às meninas por toda a amizade e apoio.

A Amanda, aluna de iniciação científica extremamente competente, a qual tive o prazer de co-orientar nos primeiros anos do meu doutorado. Também às colegas Thais, Vanessa e Laís, ex-companheiras de laboratório, que participaram da fase inicial do trabalho.

A Aninha por todo o suporte técnico e por ser sempre solícita e alegre! Aos professores, Dr. Martin e Dra. Sara, por gentilmente cederem espaço no laboratório e apoiarem nossos trabalhos.

Às minhas grandes amigas e comadres, Bia e Karina, por sempre dividirem as experiências, alegrias e angústias da vida.

Aos colaboradores do IPEN, Dr. Carlos, Dr. Paolo, Dra. Miriam e Dr. João, que foram fundamentais na parceria e no apoio.

À Profa. Dra. Renata Frazão e sua aluna, e minha grande amiga, Marina Silveira, pelas colaborações e por todo o apoio.

À Profa. Dra. Fernanda de Felice e às alunas da UFRJ, Natália e Helen, pelas colaborações.

À Profa. Dra. Patrícia Prada e à aluna Paula Quaresma pela colaboração nas cirurgias intracerebroventriculares dos camundongos ob/ob, e por outras colaborações.

Aos laboratórios da Profa. Dra. Andrea Torrão e do Prof. Dr. José Cipolla Neto por terem cedido equipamentos para análises de qPCR e Western Blot.

À Universidade de São Paulo por ter proporcionado minha formação profissional de graduação e pós-graduação.

A todos os funcionários do departamento de Fisiologia e Biofísica e da Pós-Graduação que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento do projeto. Em especial, aos funcionários do biotério, Vilson e Cleonice, pelo suporte semanal com a limpeza das caixas dos camundongos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro no período inicial do doutorado.

À FAPESP pelo expressivo apoio financeiro cedido, o qual foi primordial para o desenvolvimento da tese do meu doutorado.

E principalmente a Deus, sem ele nada disso existiria! A cada nova descoberta na ciência é possível ver que a vida é tão maravilhosa e rica em detalhes que nos fogem à compreensão que só ela pode ser obra de algo divino maior!

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva para toda a humanidade”*

Marie Curie

RESUMO

Furigo IC. Estudo do mecanismo de ação da bromocriptina e de antagonistas de prolactina no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 e da Obesidade. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Atualmente, é crescente o interesse em estudar o potencial do Sistema Nervoso Central (SNC) como alvo de medicamentos antidiabéticos, uma vez que ele possui receptores de insulina e desempenha papel crítico na regulação da homeostase glicêmica. Nesse sentido, o Cycloset® (mesilato de bromocriptina de liberação rápida), um medicamento de ação central aprovado nos Estados Unidos para o tratamento do DMT2, atende a essa tendência atual. Trabalhos prévios mostram efeitos benéficos da bromocriptina (Bromo) sobre a hiperglicemia e hiperlipidemia em modelos de animais obesos tratados com essa droga. Por ser um agonista dopaminérgico, um dos possíveis mecanismos de ação dessa droga pode ser bloqueando a liberação e produção de prolactina (Prl). Níveis elevados de prolactina na circulação sanguínea, observados tanto em indivíduos com prolactinomas como em pessoas tratadas com medicamentos que causam hiperprolactinemia, geram anormalidades no metabolismo de carboidratos e lipídeos, o que pode levar a um quadro de síndrome metabólica. Na presente tese, testamos a hipótese de que ao menos parte dos efeitos antidiabéticos da Bromo seja mediada pela inibição da secreção de prolactina. Avaliamos os efeitos do tratamento com Bromo em camundongos machos e fêmeas geneticamente obesos e resistentes à insulina (*ob/ob*), bem como testamos se os efeitos benéficos do medicamento seriam revertidos com a reposição de Prl. Machos tratados com Bromo apresentaram maior sensibilidade à insulina, enquanto que a reposição de Prl manteve os animais menos sensíveis, tais como os animais do grupo controle. As fêmeas tratadas com Bromo apresentaram tendência à melhora de sensibilidade à insulina, bem como foram mais tolerantes à glicose, sendo que a reposição de Prl em animais tratados com Bromo também reverteu o efeito benéfico do medicamento. Dessa forma, demonstramos que ao menos parte dos efeitos antidiabéticos da Bromo é mediada pela inibição da secreção basal de Prl. Em um segundo conjunto de experimentos, testamos se a administração de antagonistas de prolactina (G129R-hPrlR) em machos *ob/ob*, por vias centrais ou periféricas, produziria efeito antidiabético. Observamos que tanto o tratamento periférico como o central diminui a curva glicêmica dos animais em testes de tolerância à glicose e melhoram a sensibilidade à insulina, embora ainda não tenhamos obtido valores significativos devido a nossa amostragem. Por fim, investigamos se a ação da Prl sobre o metabolismo ocorre por meio da interação com o receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$). Verificamos que receptores de prolactina e de $ER\alpha$ são expressos em áreas comuns no SNC e que variações nos níveis circulantes de estrógeno causam mudanças na sensibilidade à prolactina. Portanto, no presente trabalho, identificamos o possível mecanismo pelo qual a Bromocriptina promove melhorias no controle glicêmico e, de forma inédita, produzimos evidências que o uso de antagonistas de prolactina pode ter potencial no tratamento do DMT2.

Palavras-chave: Bromocriptina. Diabetes Mellitus tipo 2. Prolactina. Antagonista de Prolactina. Hipotálamo.

ABSTRACT

Furigo IC. The study of the mechanisms of action of bromocriptine and prolactin antagonists to treat Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is a syndrome characterized by dysfunctions in the metabolism of glucose, amino acids and free fat acids. Although most of the drugs currently used to treat T2DM targets peripheral organs, a growing interest in studying the Central Nervous System (CNS) as a potential target of antidiabetic drugs is appearing. The CNS possesses insulin receptors and plays a critical role in regulating glucose homeostasis. In this sense, Cycloset® (quick release bromocriptine mesylate) a drug that acts on CNS, was recently approved in United States to treat T2DM. Previous studies have shown beneficial effects of bromocriptine (Bromo) on hyperglycemia and hyperlipidemia in obese animal models. As a dopaminergic agonist, a possible mechanism of action of this drug could be caused by a decreased prolactin (Prl) production and release. High serum prolactin levels, as observed in patients bearing prolactinomas or individuals using drugs that induce hyperprolactinemia, generate abnormalities in carbohydrate and lipid metabolism, which can lead to metabolic syndrome. In the current thesis, we tested the hypothesis that part of bromocriptine antidiabetic effects is due to an inhibition of prolactin secretion. We evaluated Bromo effects in genetically obese and insulin resistant male and female mouse (*ob/ob*), as well as we tested whether replacing Prl could reverse the beneficial effects of Bromo. Males treated with Bromo showed lower insulin resistance, whereas Prl replacement decreased insulin sensitivity. Females treated with Bromo showed tendency towards an improvement in their insulin sensitivity and glucose tolerance. Prl replacement also reversed the beneficial effects of Bromo in this group. Thus, we demonstrated that at least part of the antidiabetic effects of Bromo is due to inhibition of Prl secretion. In another set of experiments, we tested whether central or peripheral treatment with prolactin antagonists (G129R-hPrIR) causes antidiabetic effects in *ob/ob* male mice. Both peripheral and central treatment decreased the glycemic curve during glucose and insulin tolerance tests, although we still did not obtain statistically significant values with our sample size. Lastly, we investigated whether metabolic Prl action occurs due to a putative interaction with estrogen receptor alpha (ER α). We found a wide co-expression between Prl receptor and ER α in the CNS. Additionally, changes in estrogen levels decrease prolactin sensitivity. Therefore, in the present study we identified the possible mechanism by which bromocriptine promotes improvements in glycemic control, and for the first time, we obtained evidence that the use of prolactin antagonists can have a potential effect in the treatment of T2DM.

Keywords: Bromocriptine. Type 2 Diabetes Mellitus. Prolactin. Prolactin antagonists. Hypothalamus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Concentração plasmática de prolactina nos machos ob/ob dos grupos Controle (injeção de DMSO+Salina e mini-pump contendo PBS), Prl (injeção de DMSO+Salina e mini-pump contendo Prolactina com infusão de 18 ug/dia), Bromo (injeção de Bromocriptina na dose de 12 ug/g de peso e mini-pump contendo PBS) e Bromo+Prl (injeção de Bromocriptina na dose de 12 ug/g de peso e mini-pump contendo Prolactina com infusão de 18 ug/dia). Teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$55

Figura 2 - Médias do consumo diário de ração de machos ob/ob (A) e fêmeas ob/ob (B) dos grupos Controle, tratados com prolactina (Prl), tratados com bromocriptina (Bromo) e tratados com bromocriptina e prolactina (Bromo+Prl). Teste estatístico One Way Anova, com pós teste de Newman- Keuls. Símbolos a e b nos gráficos representam diferença estatística de $P < 0,05$56

Figura 3 - Médias do consumo diário em período basal e período de tratamento dos animais experimentais em machos (A) e fêmeas (B). Teste estatístico t-student pareado não paramétrico. * $P < 0,05$57

Figura 4 - Análise de peso corporal de machos e fêmeas ob/ob em tratamento. Em A e C estão os valores percentuais de ganho de peso em relação ao peso final do tratamento de machos e fêmeas, respectivamente. Em B e D estão representados os valores médios do peso dos animais após os tratamentos de machos e fêmeas, respectivamente. Teste estatístico One –Way Anova, com pós teste de Newman-Keuls. Símbolos a e b representam diferença estatística de $P < 0,05$57

Figura 5 - Médias das razões entre peso dos adipócitos e peso corporal dos animais. A e B representam a relação do território subcutâneo de machos e fêmeas. C e D representam os valores dos territórios perigonadal e periuterino, respectivamente. E e F simbolizam os valores dos adipócitos da porção retroperitonial de machos e fêmeas. Teste estatístico One-way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls.....59

Figura 6 - Teste de tolerância à glicose aplicado aos 4 grupos experimentais de animais ob/ob machos. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados ($P < 0,0001$). B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), Prl (prolactina), UA (unidade arbitrária)60

Figura 7 - Teste de tolerância à glicose aplicado aos 4 grupos experimentais de animais ob/ob fêmeas. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados ($P = 0,007$). B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), Prl (prolactina), UA (unidade arbitrária).61

Figura 8 - Teste de sensibilidade à insulina aplicado aos 4 grupos experimentais de animais ob/ob machos. A. Média das áreas sobre a curva dos animais analisados (a

e b representam as diferenças estatísticas entre os grupos $P=0,0007$). B. Média das curvas glicêmicas obtidas nos testes, adotando-se o valor de 100 para a glicemia basal.....61

Figura 9 - Teste de sensibilidade à insulina aplicado aos 4 grupos experimentais de animais ob/ob fêmeas. A. Média das áreas sobre a curva dos animais analisados (- representa tendência à diferença estatística do grupo Bromo em relação aos outros grupos $P=0,1955$). B. Média das curvas glicêmicas obtidas nos testes, adotando-se o valor de 100 para a glicemia basal.* $P<0,05$62

Figura 10 - Concentração plasmática de insulina dos grupos estudados, analisada pelo método Elisa. Teste estatístico One-Way ANOVA, com pós -teste Newman-Keuls $P=0,1542$62

Figura 11 - Análise da expressão gênica (qPCR) do hipotálamo de camundongos ob/ob fêmeas após 16 dias de tratamento. Letras diferentes representam a existência de diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais (ANOVA uma via, seguido de teste de Newman-Keuls). Esr-1(estrogen receptor 1), Mch (melanin-concentrating hormone), Agrp (agouti related neuropeptide), Abcc8 [ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8], Abcc9 [ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9], Kcnj8 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8), Kcnj11 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11), Hcrt (hypocretin), Pomc (pro-opiomelanocortin-alpha), Prkcd (protein kinase C, delta), Prkcg (protein kinase C, gama), Cartpt (CART prepropeptide), Npy (neuropeptide Y).....63

Figura 12 - Análise da expressão gênica (qPCR) do fígado de camundongos ob/ob machos após 16 dias de tratamento entre os grupos experimentais (* $P < 0,05$; ANOVA uma via, seguido de teste de Newman-Keuls). Pck-1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1), G6pc (glucose-6-phosphatase), Ppara (peroxisome proliferator activated receptor alpha), Srebf-1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1).64

Figura 13 - Análise da via de sinalização da insulina em tecidos de camundongos ob/ob machos, tratados com insulina (n=5) ou salina (n=4), 15 min antes da coleta dos tecidos. *, $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo tratado com salina; ~ $P < 0,1$ comparado ao respectivo grupo tratado com salina. Teste t-student em cada grupo.65

Figura 14 - Análise da via de sinalização da insulina em tecidos de camundongos ob/ob fêmeas, tratadas com insulina (n=3) ou salina (n=2), 15 min antes da coleta dos tecidos. *, $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo tratado com salina; ~ $P < 0,1$ comparado ao respectivo grupo tratado com salina. Teste t student em cada grupo.66

Figura 15 - Médias das áreas sob a curva dos testes de tolerância à glicose em machos ob/ob com tratamento periférico do antagonista de prolactina (A), controle n=5 e antagonista G129R-hPrI n= 5; e animais com tratamento no SNC (B), controle n=4 e antagonista G129R-hPrI n= 5. Curvas glicêmicas dos animais com tratamento periférico (C) e central (D). Teste estatístico t-student * $P<0,05$67

Figura 16 - Médias das áreas sob a curva dos testes de sensibilidade à insulina em machos ob/ob com tratamento periférico do antagonista de prolactina (A) e animais com tratamento no SNC (B). Curvas glicêmicas dos animais com tratamento periférico (C) e central (D). Teste estatístico t-student *P<0,05..... 68

Figura 17 - Fotomicrografias obtidas à partir de objetiva de microscópio de 20 x de cortes frontais de encéfalo de fêmeas de camundongo ovariectomizadas e injetadas intraperitonealmente com prolactina, que foram submetidas à Hibridização in situ para a marcação de RNAm para o ER α (pontos pretos- impregnação por grânulos de prata) e reação imunoistoquímica para a marcação do pSTAT-5 (esferas marrons). As fotos ilustram as escalas de marcação adotadas no experimento, sendo em A uma área de alta colocação, em B moderada, em C baixa colocação e em D muito baixa ou nenhuma colocação..... 69

Figura 18 - Distribuição de células responsivas à prolactina (células marrons) e expressão do RNAm do receptor de estrógeno alpha (pontos pretos) na área pré-óptica e hipotálamo anterior. Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais de encéfalo de camundongo reagidos para pSTAT5 e submetidos à hibridização in situ para sonda de RNAm de ER- α . Barra de escala: A, C e E = 200 μ m; B, D E, F e G= 25 μ m; H= 100 μ m,..... 72

Figura 19 - Distribuição de células responsivas à prolactina (células marrons) e expressão do RNAm do receptor de estrógeno alpha (pontos pretos) em nível hipotalâmico e do tronco encefálico. Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais de encéfalo de camundongo reagidos para pSTAT5 e submetidos à hibridização in situ para sonda de ER α . Barra de escala: A e G= 200 μ m; B-F e H= 25 μ m,..... 74

Figura 20 - Distribuição de neurônios imunorreativos ao pSTAT5 em fêmeas tratadas com prolactina. Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais de encéfalo de camundongas intactas tratadas com prolactina ovina (Intact+oPRL) e ovariectomizadas tratadas com prolactina ovina (OVX+oPRL) reagidos para pSTAT5 em diferentes áreas hipotalâmicas. Siglas: 3v (terceiro ventrículo), f (fórnice), oc (quiasma óptico) opt (nervo óptico), AVPV (núcleo antero-ventral periventricular), ARH (núcleo arqueado), DMH (núcleo dorso-medial hipotalâmico), MPA (área pré-mamilar), VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo), Mea (amígdala medial) e PMV (núcleo pré-mamilar ventral). Barra de escala: 200 μ m. 76

Figura 21 - Gráfico ilustrando o número de células responsivas à prolactina nos grupos de fêmeas intactas tratadas com PBS (barras pretas), intactas tratadas com prolactina ovina (barras brancas), e ovariectomizadas tratadas com prolactina ovina (barras cinzas), das áreas encefálicas analisadas: MPA (área pré-mamilar), AVPV (núcleo antero-ventral periventricular), VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo), ARHtub (núcleo arqueado tuberal), ARHcau(núcleo arqueado caudal), Mea (amígdala medial) e PMV (núcleo pré-mamilar ventral). *P<0,05. 77

Figura 22 - Fotomicrografias em campo escuro de cortes frontais de encéfalos de fêmeas ovariectomizadas, tratadas com PBS ou Prolactina, submetidas à hibridização in situ para marcação do RNAm de ER α . Os grânulos brancos representam o RNAm de ER α marcado com sonda radioativa e com impregnação

por prata nas porções rostral, intermediária e caudal do hipotálamo tuberal. ARH= núcleo arqueado do hipotálamo, VMH=núcleo ventromedial do hipotálamo 78

Figura 23 - Gráficos ilustrando a densidade de células com marcação para RNAm de ER- α nos níveis rostral, intermediário e caudal do VMHvl, nas fêmeas ovariectomizadas tratadas com PBS ou prolactina..... 78

Figura 24 - Gráficos ilustrando a média do peso corporal (A), do ganho de peso (B) e do peso do útero de fêmeas controle (Sham, n=18) e ovariectomizadas (OVX, n=22) 3 meses após as cirurgias. Os parâmetros de peso corporal foram medidos antes de realizarmos os tratamentos com bromocriptina, enquanto que o peso dos úteros foi realizado após o tratamento. Teste t student *P<0,05..... 79

Figura 25 - Gráficos ilustrando as médias de área sob a curva no teste de tolerância à glicose (A) e de sensibilidade à insulina (C). Das fêmeas com cirurgia controle (Sham) e fêmeas ovariectomizadas (OVX). Médias das curvas glicêmicas em teste de tolerância à glicose (B) e sensibilidade à insulina do peso corporal (D). Teste estatístico t-student. * P< 0,05. 80

Figura 26 - Teste de tolerância à glicose aplicado aos 4 grupos experimentais. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados, onde os dois grupos tratados com Bromo tiveram menor ASC em comparação com o grupo OVX controle (a e b representam as diferenças estatísticas de P<0,05) . B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), OVX (ovariectomizada), UA (unidade arbitrária). 81

Figura 27 - Teste de sensibilidade à insulina aplicado aos 4 grupos experimentais. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados (a e b representam as diferenças estatísticas de P<0,05) . B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), OVX (ovariectomizada), UA (unidade arbitrária). 81

Figura 28 - Gráficos da média do consumo diário durante o tratamento (A), do ganho de peso após todo o período de tratamento (B) e da adiposidade (tecido adiposo branco retroperitoneal, periuterino e subcutâneo) dos 4 grupos de fêmeas estudados. (*P<0,05). 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos primers utilizados para expressão gênica. * TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems®	45
Tabela 2 - Análise qualitativa dos núcleos encefálicos com células marcadas para pSTAT-5, ER α e da colocalização nessas áreas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abcc8 - *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8*

Abcc9 - *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9*

AgRP - neuropeptídeo relacionado ao agouti

AKT - proteína cinase B (PKB)

ARH - núcleo arqueado do hipotálamo

ASC - área sob a curva

AVPV - núcleo periventricular anteroventral

Bromo - bromocriptina

BSA - albumina sérica bovina

BST- núcleo intersticial da estria terminal

Cartpt - transcrito regulado por cocaína e anfetamina

DEPC- dietilpirocarboneto

DMH - núcleo dorso-medial do hipotálamo

DMT1- Diabetes Mellitus tipo 1

DMT2- Diabetes Mellitus tipo 2

DNA - ácido desoxirribonucleico

ER α - receptor de estrógeno alfa

Ers-1 - receptor de estrógeno 1

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GTT - teste de tolerância à glicose

G120K-hGH é um potente antagonista tanto de receptor de GH

G129R-hPRL - antagonista do receptor de prolactina com substituição de glicina da posição 129 por arginina

HbA1C - hemoglobina glicosilada

Hcrf - hipocretina

ip - intraperitoneal

ITT - teste de tolerância à insulina

JAK2 - Janus cinase 2

Kcnj8 - *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8*

Kcnj11 - *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11*

LepR - receptor da leptina

LHA - área hipotalâmica lateral

MC3/4R - receptores de melanocortina $\frac{3}{4}$
Mch - hormônio concentrador de melanina
MeApd - parte pósterio-dorsal do núcleo amigdalal medial
MODY- Maturity-onset of the Young
MPA - área pré-óptica medial
MPN - núcleo pré-óptico medial
Npy - neuropeptídeo Y
NTS - núcleo do trato solitário
OVX - ovariectomizada
pAKT - proteína cinase B fosforilada
PBS - tampão fosfato salino
PeN - núcleo periventricular
pIR - receptor de insulina fosforilado
Prkcd - proteína cinase C, delta
Prkcg - proteína cinase C, gama
PMV - núcleo pré-mamilar ventral
Pomc - pró-opiomelanocorticotropina
Ppia - ciclofilina A
Prl- prolactina
PrIR- receptor de prolactina
PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo
RCA - área retroquiasmática
RNA - ácido ribonucléico
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
rp - retroperitoneal
sc - subcutâneo
Sham - cirurgia controle
SNC - Sistema Nervoso Central
STAT5 - sinal de transdução e ativador de transcrição 5
SUR-1 - receptor de sulfoniluréia 1
SUR-2 - receptor de sulfoniluréia 2
S179D-hPRL - antagonista do receptor de prolactina com substituição da serina na posição 179 por ácido aspártico
TAB - tecido adiposo branco

UA - unidades arbitrárias

VMH - núcleo ventromedial do hipotálamo

VMHvl - parte ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo

α -MSH - hormônio estimulador de melanócitos

Δ 41-51-hPRL - antagonista do receptor de prolactina com deleções dos aminoácidos 41 a 51

Δ 1-9-G129R-hPRL - antagonista do receptor de prolactina com deleções de 9 resíduos N-terminais

Δ 1-14-G129R-hPRL - antagonista do receptor de prolactina com deleções de 14 resíduos N-terminais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 FARMACOTERAPIA NA OBESIDADE	25
2.2 DIABETES MELLITUS	26
2.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS NO DIABETES MELLITUS	28
2.4 PAPEL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NO CONTROLE GLICÊMICO	30
2.5 INVESTIGAÇÃO POR MEDICAMENTOS QUE ATUEM NO SNC PARA O TRATAMENTO DE SÍNDROMES METABÓLICAS	32
2.6 PROLACTINA E CONTROLE DO METABOLISMO	33
2.7 ESTRADIOL E REGULAÇÃO DO METABOLISMO: POSSÍVEL INTERAÇÃO COM A PRL	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3.2.1 <i>Objetivo 1</i>	37
3.2.2 <i>Objetivo 2</i>	37
3.2.3 <i>Objetivo 3</i>	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 EXPERIMENTO 1. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BROMOCRIPTINA: POSSÍVEL AÇÃO VIA PROLACTINA?	38
4.1.1 <i>Obtenção dos camundongos experimentais</i>	38
4.1.2 <i>Genotipagem</i>	38
4.1.3 <i>Distribuição dos animais em grupos: teste de tolerância à glicose</i>	40
4.1.4 <i>Delineamento experimental</i>	40
4.1.5 <i>Cirurgias de implante subcutâneo de bomba osmótica</i>	41
4.1.6 <i>Balço energético e controle glicêmico</i>	41
4.1.7 <i>Eutanásia</i>	42
4.1.8 <i>Ensaio enzimático</i>	42
4.1.9 <i>Quantificação gênica</i>	42
4.1.10 <i>Quantificação proteica</i>	45
4.1.11 <i>Adiposidade</i>	46
4.1.12 <i>Testes estatísticos</i>	46
4.2 EXPERIMENTO 2. ANÁLISE DOS POSSÍVEIS EFEITOS ANTIDIABÉTICOS E ANOREXÍGENOS DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE PROLACTINA (ANTI-PRLR) EM CAMUNDONGOS OB/OB	46
4.2.1 <i>Delineamento experimental- administração de antagonista intracerebroventricular (icv)</i>	47
4.2.2 <i>Cirurgias de implante icv de bomba osmótica</i>	47
4.2.3 <i>Testes de controle glicêmico</i>	47
4.2.4 <i>Eutanásia</i>	47
4.2.5 <i>Delineamento experimental- administração de antagonista periférico</i>	48
4.2.6 <i>Cirurgias de implante periférico de bomba osmótica</i>	48
4.2.7 <i>Testes de controle glicêmico</i>	48
4.2.8 <i>Eutanásia</i>	48
4.2.9 <i>Testes estatísticos</i>	48
4.3 EXPERIMENTO 3. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA PRL SOBRE O METABOLISMO VIA SNC: POSSÍVEL INTERAÇÃO COM O ERA	48
4.3.1 <i>Colocalização entre o PrlR e o ERA : hibridização in situ combinada à reação de imunoistoquímica</i>	49
4.3.2 <i>Influência da presença de estrógenos para a responsividade das células à Prl</i>	52

4.3.3 Influência dos níveis circulantes de <i>Prl</i> sobre a expressão de <i>ERα</i>	52
4.3.4 Influência da presença de estrógenos para os efeitos antidiabéticos da bromocriptina.	53
5 RESULTADOS	55
5.1 EXPERIMENTO 1. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BROMOCRIPTINA: POSSÍVEL AÇÃO VIA PROLACTINA?	55
5.1.1 Validação do tratamento.....	55
5.1.2 Balanço energético	56
5.1.4 Quantificação gênica por qPCR.....	62
5.1.5 Quantificação proteica por Western Blotting.....	64
5.2 EXPERIMENTO 2. ANÁLISE DOS POSSÍVEIS EFEITOS ANTIDIABÉTICOS E ANOREXÍGENOS DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE PROLACTINA (ANTI-PRLR) EM CAMUNDONGOS OB/OB	66
5.3.1 Colocalização entre o <i>PrlR</i> e o <i>ERα</i> : hibridização <i>in situ</i> combinada à reação de imunoistoquímica.....	69
5.3.2 Influência da presença de estrógeno para a sensibilidade à <i>Prl</i>	75
5.3.3 Influência dos níveis circulantes de <i>Prl</i> sobre a expressão de <i>ERα</i>	77
5.3.4 Efeito da presença de estrógenos para a ação antidiabética da bromocriptina.....	79
6 DISCUSSÃO.....	83
6.1 DISCUSSÃO METODOLÓGICA	83
6.1.1 Modelo experimental adotado	83
6.1.2 Reposição de prolactina	85
6.1.3. Dimorfismo sexual.....	86
6.1.4 Administração do Antagonista do receptor de Prolactina.....	86
6.2 BALANÇO ENERGÉTICO.....	87
6.3 HOMEOSTASE GLICÊMICA	90
6.4 ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE PROLACTINA	92
6.5 INTERAÇÃO ENTRE PROLACTINA E RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA	94
7 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICES.....	109
A - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS COMPLEMENTARES	109
B - FURIGO IC, KIM KW, NAGAISHI VS, RAMOS-LOBO AM, DE ALENCAR A, PEDROSO JA, METZGER M, DONATO J JR. PROLACTIN-SENSITIVE NEURONS EXPRESS ESTROGEN RECEPTOR- α AND DEPEND ON SEX HORMONES FOR NORMAL RESPONSIVENESS TO PROLACTIN. BRAIN RES.2014;1566:47-59.	110

1 INTRODUÇÃO

A obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) são doenças cada vez mais crescentes na população mundial e, portanto, existe uma preocupação dos órgãos de saúde em desenvolver medicamentos e instruir a população sobre como prevenir tais doenças. A relação entre elas é bastante íntima, embora não obrigatória, e o melhor tratamento é a prevenção, adotando hábitos de vida mais saudáveis com a prática de atividades físicas e uma dieta equilibrada. Mas, no cenário atual, onde as jornadas de trabalho são extensas e pouco tempo é dedicado às medidas preventivas, faz-se necessária a busca de novos tratamentos para essas doenças.

Fármacos seguros e efetivos para o tratamento da obesidade e do DMT2 ainda são elusivos e, embora muitos recursos sejam aplicados, principalmente na pesquisa de desenvolvimento de drogas antiobesidade, elas ainda apresentam eficácia limitada. Uma das razões para essa ineficiência pode ser devido a uma falta de compreensão completa sobre a patogênese dessas doenças. No caso do DMT2, o que se observa é que a forma de ação da maioria das drogas utilizadas é periférica, aumentando a secreção de insulina (quando atuam no pâncreas) ou melhorando a sinalização da insulina (quando atuam no músculo esquelético ou principalmente no fígado). No entanto, é crescente o número de estudos que mostram a importância do Sistema Nervoso Central (SNC) na regulação da homeostase glicêmica.

O cérebro apresenta receptores para a insulina, sendo portanto um tecido alvo desse hormônio (1,2) embora a captação de glicose por neurônios seja independente de insulina. Sugere-se que a insulina pode agir no SNC e influenciar sua secreção pelas células β -pancreáticas, ilustrando um mecanismo pelo qual o SNC tem papel importante no controle glicêmico.

Dessa forma, parece plausível pensarmos em um tratamento cujo medicamento atue no SNC para o tratamento do DMT2. Nesse sentido, foi recentemente aprovado nos Estados Unidos pela "Food and Drug Administration" (FDA) o primeiro medicamento com provável ação no SNC para o tratamento do DMT2. O mesilato de bromocriptina, em um formato de liberação rápida e com nome comercial de Cycloset®, é indicado para ser usado por pacientes com DMT2 em associação com outros medicamentos e dietas, embora o mecanismo de ação pelo qual o fármaco promove a redução da glicemia não seja esclarecido.

Por tratar-se de um fármaco que atua como agonista dopaminérgico de receptores D2, ele pode afetar vias dopaminérgicas que controlam outros comportamentos, o que seria um efeito colateral desse medicamento. Portanto, na presente tese, será apresentado um estudo do mecanismo de ação desse medicamento e a tentativa de desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da DMT2 e da obesidade. Foram realizados experimentos com antagonistas de receptores de prolactina (Anti-PrIR), os quais poderiam futuramente tornarem-se fármacos mais específicos e potentes no tratamento de doenças metabólicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Evolutivamente, dentre os processos mais críticos para a sobrevivência de espécies, estão as habilidades para evitar a morte pela falta de alimento e montar um sistema imunológico que responda a patógenos. No passado, quando o acesso ao alimento era intermitente, a economia de energia corporal e o armazenamento de calorias eram cruciais. Atualmente, o suprimento nutricional é regular, tornando o estado metabólico, originalmente vantajoso, um acumulador de adiposidade, o qual está associado a diversas comorbidades. O mesmo ocorreu para respostas imunes, as quais, esporadicamente, precisavam ser recrutadas de forma intensa em situações de infecções por doenças epidêmicas, e que na atualidade tornaram-se extremamente sensibilizadas. Essa teoria, juntamente com os hábitos alimentares inadequados e a prática de atividade física insuficiente das sociedades atuais, podem explicar o número crescente no mundo de pessoas com doenças associadas a distúrbios metabólicos, como diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (3). Essas doenças propiciam um aumento significativo da morbi-mortalidade e gera altos custos sociais.

O balanço energético positivo, em que o consumo de nutrientes é excessivo e ultrapassa o gasto metabólico do organismo, leva a um acúmulo de gordura, podendo incorrer em obesidade (4). A obesidade é uma doença caracterizada por excesso de adiposidade, diagnosticada pelo índice de massa corporal (relação entre o peso e a altura ao quadrado) maior ou igual a 30 Kg/m^2 . Ela está associada a comorbidades como dislipidemia, hipertensão, doenças coronarianas e diabetes mellitus tipo 2. Também existe uma relação íntima entre obesidade e processos inflamatórios, que agravam o quadro de síndrome metabólica. Essa relação pode ter uma explicação evolutiva. Mamíferos compartilham mecanismos de defesa e de controle do metabolismo de organismos mais simples, como as drosófilas, as quais apresentam um tecido adiposo capaz de desempenhar funções similares ao fígado, células hematopoiéticas e do sistema imune humano. Por isso, acredita-se que existam em humanos moléculas reguladoras “chave” comuns aos sistemas imune e metabólico, por meio do qual nutrientes, principalmente ácidos graxos, podem atuar em sistemas de reconhecimento de patógenos, possibilitando que nutrientes sejam capazes de gerar respostas inflamatórias (3). No entanto, o mecanismo fisiológico preciso de iniciação do processo inflamatório na obesidade ainda é desconhecido.

Outra teoria é de que a expansão do tecido adiposo leva a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, que podem prejudicar a perfusão de oxigênio local e estimular vias de estresse celular. Isso causaria liberação de citocinas e outros sinais pró-inflamatórios indutores do recrutamento de monócitos circulantes que, como macrófagos infiltrados no tecido adiposo, liberam mais citocinas, exacerbando o processo inflamatório e a resistência à insulina. A inflamação hepática, comum na obesidade, também pode ocorrer como resultado da esteatose e/ou do aumento das respostas ao estresse do hepatócito. Também os macrófagos hepáticos (células Kupffer) podem ser ativados induzindo resposta semelhante a que acontece no tecido adiposo (5). Pedersen e colaboradores (6) mostraram que existe uma correlação positiva entre a insulina circulante e fatores inflamatórios do tecido adiposo tanto de pacientes obesos, quanto de camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura.

2.1 Farmacoterapia na obesidade

Fármacos seguros e efetivos para o tratamento da obesidade ainda são elusivos e, embora muitos recursos sejam aplicados na pesquisa de desenvolvimento de drogas antiobesidade, os fármacos ainda apresentam resultados limitados. Uma das razões para essa ineficiência pode ser pelo fato de a patogênese da obesidade não ser completamente elucidada (4). Dessa forma, ainda não existem medicamentos que reduzam seletivamente os estoques de tecido adiposo sem causar prejuízos à saúde em longo prazo.

Como princípio, drogas usadas para induzir a perda de peso devem reduzir o apetite ou aumentar a saciedade; reduzir a absorção de nutrientes ou aumentar o gasto energético; e normalmente o tratamento deve ser associado a intervenções físicas, como exercícios e dieta (7).

Atualmente, o *Orlistat* é o único medicamento autorizado mundialmente para o tratamento da obesidade a longo-prazo. Trata-se de uma droga que promove menor absorção de gordura pelo intestino por inibir a lipase pancreática. No entanto, seus efeitos colaterais incluem esteatorreia, incontinência fecal, flatulência, e má absorção de vitaminas lipossolúveis. Outros medicamentos supressores do apetite são permitidos apenas em alguns países específicos e por períodos limitados de administração. Isso ocorre devido aos efeitos colaterais que tais medicamentos apresentam, sendo os mais agravantes a dependência química e efeitos prejudiciais

sobre o sistema cardiovascular. Fentermina (anfetamina, aumenta a liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina), topiramato (anticonvulsivante, mecanismo de ação sobre o apetite desconhecido) e lorcaserina (agonista de receptor de serotonina) são exemplos desses medicamentos. Outros medicamentos que já foram retirados do mercado devido aos efeitos colaterais graves como alucinações, suicídios, hipertensão pulmonar e ataques cardíacos foram: fenfluramina (aumenta liberação de serotonina e inibe a sua recaptação), sibutramina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina; ainda é permitido o uso no Brasil) e rimonabanto (antagonista de receptor de canabinóide 1) (4).

2.2 Diabetes Mellitus

É bastante próxima a relação entre obesidade e resistência à insulina, sendo que a obesidade é considerada o principal fator que predispõem o indivíduo ao diabetes mellitus tipo 2 e é uma importante causa do aumento indiscriminado dessa doença em todo o mundo (8). A incidência de indivíduos obesos que desenvolvem um quadro de diabetes mellitus tipo 2 aumentou consideravelmente. A inflamação do tecido adiposo é associada a resistência à insulina sistêmica e hiperinsulinemia, observada tanto em humanos quanto em camundongos obesos. A hiperinsulinemia presente no quadro de obesidade promove resistência à insulina não somente pela dessensibilização dos receptores de insulina, mas pelo aumento do processo inflamatório do tecido adiposo, prejudicando o mecanismo de geração de ácidos graxos a partir da glicose (lipogênese *de novo*), o qual seria capaz de melhorar o metabolismo desse nutriente e aumentar a sensibilidade à insulina (6).

O Diabetes Mellitus é uma síndrome que possui componentes metabólicos, vasculares e neuropáticos, que se correlacionam. A síndrome vascular, por exemplo, a qual consiste de anormalidades em pequenos e grandes vasos, aparecem em pacientes diabéticos mais precocemente e de forma mais severa, quando comparado a outros pacientes. As macro-angiopatias podem resultar em acidentes cerebrovasculares, infarto do miocárdio e doenças vasculares periféricas; enquanto as micro-angiopatias podem causar retinopatias e nefropatias. Também, muitas das alterações neuropáticas são devidas a alterações no metabolismo (9).

A caracterização do diabetes mellitus se dá por disfunções no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, secundárias à ausência ou diminuição marcante da secreção de insulina e/ou ineficiente ação da insulina. A hiperglicemia

é o biomarcador que caracteriza essa síndrome, e é o mais importante para o diagnóstico e o julgamento da terapia mais adequada (9).

Os critérios recomendados pela Organização Mundial da Saúde (1980) para o diagnóstico do diabetes são essencialmente sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso inexplicável, associados a uma concentração plasmática casual de glicose maior ou igual a 200 mg/dl, ou esse mesmo valor de glicemia após 2 horas de um teste de tolerância à glicose por via oral (75 g de glicose anidro) ou uma glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dl, além da concentração de hemoglobina glicosilada (Hb1AC $\geq 6,5$).

O Diabetes Mellitus apresenta diversas etiopatogêneses, como as resultantes de defeitos genéticos de função das células β das ilhotas pancreáticas (defeito no DNA mitocondrial, Síndrome de Wolfram, *Maturity-onset of the Young – MODY*); defeitos genéticos na ação da insulina (resistência à insulina tipo A, Leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, lipodistrofia); doenças do pâncreas exócrino (pancreatites, neoplasia, fibrose cística); endocrinopatias (Síndrome de Cushing, acromegalia, hipertireoidismo); indução por drogas (ácido nicotínico, glicocorticoides, hormônio tireoidiano); infecções (citomegalovírus, adenovírus e outros vírus); diabetes gestacional (9). Os tipos mais comuns são o Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2). O DMT1 é resultante de uma deficiência na secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, usualmente causada pela morte seletiva dessas células, devido a uma resposta autoimune agressiva. Já no DMT2, a patogênese é multifatorial, caracterizada por resistência à insulina e uma relativa, ou até mesmo absoluta, deficiência de secreção de insulina, devido a um prejuízo de função das células β , além de apresentar outras diversas anormalidades metabólicas. A resistência à insulina é definida como uma inabilidade da insulina em produzir o seu efeito biológico usual sob concentrações circulantes que são efetivas em um indivíduo normal. Essa resistência, no contexto do metabolismo da glicose, leva a um aumento da produção endógena de glicose, à redução de recaptção de glicose periférica e à inadequada liberação de insulina pelo pâncreas (10).

Noventa por cento de todos os casos de diabetes são do tipo 2, que afetam mais de 285 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo portanto uma questão preocupante no cenário mundial e que merece grande atenção (11).

Os riscos de desenvolvimento do DMT2 aumentam com a obesidade, a idade e o sedentarismo. Dentre os pacientes com DMT2, 80 a 90% são obesos, mostrando uma direta relação entre condições metabólicas desfavoráveis e uma desregulação do controle glicêmico dos indivíduos com altos índices de gordura corporal. Pacientes considerados não obesos por critérios tradicionais (índice de massa corpórea) que possuem DMT2 em geral apresentam uma porcentagem de gordura aumentada, principalmente em regiões abdominais (9).

O diagnóstico da DMT2 é frequentemente prejudicado, às vezes demorando-se anos para ser detectado, pois muitas vezes o aumento da glicemia não instala os sintomas clássicos de um quadro diabético descontrolado. É estimado que exista um período de 9 a 12 anos entre o início da doença e o seu diagnóstico, e por isso, infelizmente, esses pacientes apresentam altos riscos de complicações micro e macrovasculares, além de neuropatias (9). Embora esses pacientes tenham concentrações de insulina plasmática aparentemente normais ou até elevadas, a secreção de insulina ainda é insuficiente para compensar a resistência que eles apresentam a este hormônio. E em determinados casos, embora a redução do peso corporal e/ou da glicemia por uso de fármacos diminuam a resistência à insulina, seus componentes genéticos se mantêm.

2.3 Tratamentos farmacológicos no diabetes mellitus

Devido à complexidade da doença, é bastante comum a associação de diferentes terapias para o tratamento do DMT2. E o que se pode notar é que, dentre os fármacos mais utilizados, a lista de efeitos colaterais, principalmente sobre o sistema cardiovascular, renal e hepático, é bastante preocupante.

Os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento do DMT2 atuam periféricamente, sendo heterogêneos em sua forma de ação e tolerância, e podem ou não ser associados a uma terapia com insulina. As principais classes incluem drogas que: estimulam a secreção de insulina (sulfoniluréias), reduzem a produção hepática de glicose (biguanidas), atrasam a digestão e absorção intestinal de carboidratos (inibidores de alfa-glicosidase) e melhoram a sensibilidade à insulina (tiazolidinedionas e biguanidas) (12,13).

As drogas sensibilizadoras de insulina incluem as tiazolidinedionas e as biguanidas. As tiazolidinedionas, como as pioglitazonas e rosiglitazonas, são ligantes sintéticos de PPAR γ (*peroxisome proliferative-activated receptor gamma*)-

são potentes sensibilizadores de insulina no músculo, fígado e tecido adiposo- que por se ligarem ao PPAR γ modulam a transcrição de genes responsivos à ação da insulina, envolvidos no controle da glicemia e do metabolismo de lipídeos (14). Já as biguanidas, como a metformina e fenformina (já retirada do mercado), promovem redução da glicemia de jejum e diminuem os valores de Hb1AC (15). O principal mecanismo de ação dessa classe de medicamentos é por meio de uma inibição da produção hepática de glicose pela ação sobre enzimas-chave da gliconeogênese, bem como por um possível aumento de sensibilidade à insulina por atuação direta em receptores de insulina (13).

Os medicamentos que atuam como secretagogos de insulina são as sulfoniluréias e as meglitinidas. As sulfoniluréias estimulam a liberação de insulina ao se ligarem ao receptor de sulfoniluréia (SUR-1), um componente do canal de potássio dependente de ATP (K_{ATP} channel) expresso em células β pancreáticas, levando a um influxo de cálcio e um aumento da resposta das células β a estímulos como glicose ou outros. Mecanismo similar é encontrado nas meglitinidas, as quais também estimulam a liberação de insulina pela inibição dos canais de potássio dependentes de ATP, causando despolarização da membrana e aumentando a concentração intracelular de cálcio, o que leva à exocitose da insulina (13).

Outros medicamentos usados para o tratamento do DMT2 são os inibidores de α -glicosidase (como acarbose, moglitol e voglibose). Eles atuam competindo de forma inibitória com a α -amilase pancreática e α -glicosidase intestinal. Essas enzimas diminuem a absorção de glicose pós-prandial ao inibirem a hidrólise de polissacarídeos em monossacarídeos. Dessa forma, os inibidores de α -glicosidase promovem uma redução da Hb1AC (16).

No entanto, a maioria desses medicamentos frequentemente causa efeitos colaterais indesejáveis (13,17). A terapia com análogos de insulina ou secretagogos, como as sulfoniluréias, podem causar complicações no sistema cardiovascular (18,19), possível falência das células β (devido ao elevado estímulo à produção de insulina), insuficiência renal e hepática (13), além de episódios hipoglicêmicos (20), os quais também podem ser observados em pacientes tratados com meglitinidas (13). Biguanidas podem causar acidose láctica (21), além de hepatotoxicidade (22–24) e complicações no sistema gastro-intestinal, efeito esse que também é observado em pacientes tratados com inibidores de α -glicosidases (13). Tiazolidinedionas podem levar a falência cardíaca e complicações no sistema

vascular (25,26), além de perda óssea (27), ganho de peso e alto risco de câncer de bexiga (13).

Até mesmo fármacos promissores que vem sendo recentemente testados para o tratamento do DMT2, como SGLT2 e análogos de GLP-1, podem apresentar efeitos indesejáveis. SGLT2, por exemplo, são inibidores do co-transportador 2 de sódio e glicose nos rins e interferem, de maneira positiva, no processo de reabsorção da glicose no túbulo proximal, aumentando a diurese de glicose e água. (28). No entanto, este medicamento pode aumentar o risco de falência renal em pacientes com essa doença, além de aumentar o risco de infecções no trato urogenital (13). Análogos de GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon-1) possuem metabolização mais lenta que o GLP-1 endógeno e atuam também nos receptores de GLP-1 das células beta-pancreáticas, bem como de outras células, como as da mucosa gástrica e intestinal, miócitos cardíacos, alguns neurônios e no nervo vago. Eles atuam na regulação da homeostase glicêmica após a absorção de nutrientes (pós-prandial), melhorando a resposta à insulina e inibindo a liberação de glucagon pelas células α -pancreáticas, além de diminuir o esvaziamento gástrico, induzirem saciedade e diminuir a produção hepática de glicose (13). Apesar de pertecerem a uma classe de fármacos promissores, estão associados ao uso desses medicamentos efeitos indesejáveis como desconfortos gastrointestinais, náusea, dores de cabeça, além de irritações na pele nos locais em que são aplicadas as injeções do fármaco (29).

2.4 Papel do Sistema Nervoso Central no controle glicêmico

Diversos são os estudos desenvolvidos em busca de novos tratamentos para o DMT2. No entanto, ainda se faz necessário realizar novas pesquisas para se encontrar fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais. O que pode ser observado é que a forma de ação da maioria das drogas utilizadas para o tratamento dessa doença é periférica, aumentando a secreção de insulina (quando atuam no pâncreas) ou melhorando a sinalização da insulina (quando atuam principalmente no fígado). No entanto, é crescente o número de estudos que mostram a importância do Sistema Nervoso Central (SNC) na regulação da homeostase glicêmica (30). Claude Bernard foi o primeiro pesquisador a sugerir que o Sistema Nervoso Central regula diretamente os níveis de glicose no sangue (31,32). Atualmente sabe-se que neurônios do hipotálamo têm grande importância

na detecção de mudanças hormonais e de substratos circulantes, e processam essas informações para vias de projeções que mantêm a homeostase glicêmico-insulinêmica e o balanço energético (33–38).

O cérebro apresenta receptores para a insulina; sendo, portanto, um tecido alvo dela (1,2). Estudos clássicos de injeções intracerebroventriculares de insulina em cachorros observaram aumento da secreção de insulina induzida por glicose, sugerindo que as células β -pancreáticas estão sob a influência das células sensíveis à insulina do SNC (39). Além disso, conforme mostrou o trabalho de Sipols e colaboradores (40), a infusão de insulina no SNC de ratos diabéticos reduziu a hiperfagia e a superexpressão hipotalâmica de RNAm de NPY. Reforçando essa hipótese, animais com deleção do gene que expressa receptores de insulina especificamente no cérebro, tiveram aumento do consumo alimentar, aumento da gordura corporal e dos níveis plasmáticos de insulina, discreta resistência à insulina e hipertrigliceridemia (41). Além disso, a insulina no SNC parece regular o metabolismo de gordura e a glicose periférica (42).

Além dos efeitos da insulina no SNC, diversas evidências apontam que os efeitos da leptina na homeostase glicêmica são primariamente mediados pelo cérebro (30). A deleção seletiva de receptores de leptina em neurônios leva a obesidade e também à DMT2 (43). Em contrapartida, animais que não apresentam naturalmente receptor de leptina (db/db) e são geneticamente modificados para carregarem um transgene específico que induz a expressão de receptores de leptina exclusivamente no cérebro, apresentam níveis normais de glicemia e insulinemia (44,45). Também, a administração aguda icv de leptina causa o mesmo efeito que a infusão intravenosa de leptina no aumento da captação de glicose periférica (46), assim como a administração icv marcadamente inibe a produção de glicose em ratos submetidos à dieta rica em gordura, diminuindo a glicogenólise (36).

Além da ação da insulina e da leptina no SNC, é de grande importância a ação sobre o controle glicêmico do neurotransmissor α -MSH (hormônio estimulador de melanócito α) que se liga aos receptores MC3R e MC4R. Deficiência de MC4R resulta em síndrome metabólica em camundongos, gerando hiperinsulinemia e hiperglicemia (47). Já a infusão de α -MSH no terceiro ventrículo melhora os efeitos da insulina circulante sobre a regulação da captação de glicose (48), assim como administração central de agonista de melanocortina inibe a liberação basal de

insulina (49), indicando que a ativação central de receptores de melanocortina, especialmente MC4R, são alternativas promissoras para o tratamento do DMT2 (30).

2.5 Investigação por medicamentos que atuem no SNC para o tratamento de síndromes metabólicas

Parece evidente a importância do SNC para o controle glicêmico, e é plausível a busca por medicamentos que atuem centralmente para o tratamento de síndromes metabólicas. O primeiro medicamento com provável ação no SNC, recentemente aprovado nos Estados Unidos pela "Food and Drug Administration" (FDA) para o tratamento do DMT2, é o mesilato de bromocriptina, em um formato de liberação rápida (50), com nome comercial de Cycloset®. Essa droga é um agonista dopaminérgico de receptores D1 e D2, derivado do fungo *Claviceps purpurea*, que é um contaminante comum do centeio e outros cereais.

Diversos trabalhos da literatura mostram efeitos benéficos da bromocriptina sobre a hiperglicemia e hiperlipidemia em modelos de animais obesos tratados com essa droga. A bromocriptina, em associação com um agonista de receptores dopaminérgicos D1 (SKF-38393), melhorou a disfunção das ilhotas pancreáticas, diminuindo os níveis de insulina plasmática de animais *ob/ob* (51) e *db/db* (52) para valores próximos aos encontrados nos animais selvagens. Além dos benefícios sobre a hiperglicemia, a bromocriptina parece causar melhorias no metabolismo e balanço energético. Trabalhos mostram que essa droga pode reduzir a hiperfagia, o ganho de peso e a hiperlipidemia de animais obesos (53–55). Em humanos, o tratamento com a bromocriptina também melhora o controle glicêmico e o perfil lipídico sérico de pacientes com DMT2 (56), melhorando o controle plasmático da glicemia de jejum e pós-prandial (57). Além disso, um estudo epidemiológico recente mostrou que o tratamento com a bromocriptina, em sua forma de liberação rápida, reduziu a progressão da hiperglicemia e eventos cardiovasculares em pacientes com a glicemia controlada ($HbA1c \leq 7$) (58).

No entanto, o mecanismo pelo qual a bromocriptina atua para causar tais efeitos ainda não é compreendido. Existem algumas ideias esparsas na literatura que relacionam a ação dessa droga com o ritmo circadiano biológico e o sistema dopaminérgico de recompensa (59). No trabalho de Luo e colaboradores (60), é discutido que reduções de gordura corporal e melhorias na tolerância à glicose dos

animais tratados com bromocriptina podem ser resultantes, em parte, da habilidade dessa droga em diminuir a atividade da serotonina e da norepinefrina no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH). Em outro trabalho, é discutida a normalização do ganho de peso e da hiperglicemia concomitante com uma redução significativa de imunorreatividade ao neuropeptídeo Y (NPY) nos núcleos supraquiasmático, intergeniculado, paraventricular e arqueado dos animais obesos tratados com bromocriptina, em comparação com animais magros (61).

2.6 Prolactina e controle do metabolismo

A prolactina (Prl) é um hormônio polipeptídico multifuncional produzido pela hipófise anterior e por outras regiões, como por exemplo, células epiteliais mamárias (62). O principal e mais clássico efeito conhecido da Prl é o de regular o desenvolvimento das glândulas mamárias durante a gravidez e induzir a produção de leite. No entanto, a Prl vem sendo associada a diversas ações em vertebrados, incluindo efeitos sobre o balanço hidroeletrolítico, crescimento e desenvolvimento, metabolismo e sistema endócrino, cérebro e comportamento, reprodução e regulação do sistema imune (63).

A Prl não apresenta um tecido endócrino alvo e, portanto, não apresenta um sistema de retroalimentação normal. Sua produção é controlada, em contrapartida, por uma alça curta de retroalimentação em que a própria Prl estimula a secreção do seu fator inibitório, a dopamina (64). A dopamina é liberada pelos neurônios túbero-infundibulares do núcleo arqueado (TIDA) na eminência mediana e inibe, por meio de receptores D2 presentes em lactotrofos da glândula hipófise anterior, a expressão do gene da Prl e a exocitose deste hormônio (65).

O mesilato de bromocriptina é um agonista dopaminérgico, e como tal, apresenta papel similar ao da dopamina na regulação da secreção da Prl, inibindo a sua produção e liberação. A bromocriptina foi utilizada originalmente para o tratamento de doenças como Parkinson, hiperprolactinemia, acromegalia, galactorréia e hipogonadismo, por diminuir a liberação de Prl (50).

Indivíduos com hiperprolactinemia, causada principalmente por prolactinomas, apresentam anormalidades no metabolismo de carboidratos e lipídeos (66), além de hiperinsulinemia e reduzida tolerância à glicose (67–69). O excesso de Prl também é relacionado a um aumento da resistência à insulina (70) e à hipercolesterolemia (71). O tratamento desses indivíduos com agonistas

dopaminérgicos mostrou benefícios sobre o controle glicêmico (72). Alguns trabalhos supõem que a supressão das concentrações basais de Prl pela bromocriptina pode ser o principal fator que promove a melhoria da tolerância à glicose e normalização da liberação de insulina induzida por glicose (67,73,74), demonstrando a importância da Prl na homeostase glicêmica.

Além de efeitos sobre o controle glicêmico, a hiperprolactinemia sustentada é comumente associada ao ganho de peso e à obesidade em humanos (75,76), embora alguns achados sejam contraditórios (77,78). Diversas linhas de pesquisa indicam que a Prl atua no cérebro estimulando o consumo alimentar em mamíferos e aves (62). Em ratos, foi observado que a Prl pode estimular o consumo alimentar em fêmeas não grávidas (79–82), e também em fêmeas grávidas, nas quais além de aumentar o apetite, é responsável por aumentar os depósitos de gordura corporal e promover resistência à leptina e à insulina (64). Em pássaros, a injeção intracerebroventricular (icv) de Prl induz hiperfagia e ganho de peso em machos e fêmeas (83). Estudos de microinjeções unilaterais em vários núcleos hipotalâmicos de pombos mostraram o efeito hiperfágico desse hormônio, principalmente quando as injeções foram direcionadas ao VMH (84). Esses dados foram confirmados quando injeções de antisoro purificado contra receptores de Prl no VMH reduziram a hiperfagia causada pela Prl em 50% (85).

Outra situação que sugere que a Prl pode estar relacionada a efeitos sobre o controle glicêmico e do metabolismo é o que se observa na utilização de antipsicóticos. A utilização dessas drogas, das quais muitas atuam como antagonistas dopaminérgicos, promove expressivo aumento das concentrações de Prl na circulação. Como efeitos colaterais ao uso de antipsicóticos, pode-se observar um significativo ganho de peso e anormalidades nos metabolismos de lipídeos e glicose, o que aumenta os riscos de doenças cardiovasculares e diabetes (86–88).

Portanto, diversos são os indícios de que a Prl possa ter relação com doenças metabólicas. Também acreditamos que a redução de seus níveis, abaixo do nível basal, poderia amenizar disfunções metabólicas. Pensando nisso, uma possível forma de tratamento para o diabetes mellitus tipo 2 e para a obesidade seria a utilização de antagonistas de Prl. Existem no momento alguns tipos de antagonistas de Prl. O antagonista análogo de GH humano, G120K-hGH é um potente antagonista tanto de receptor de GH como de receptor de Prl, mas seu potencial clínico é limitado (89). Outros antagonistas já estudados são o G129R-

hPRL (apresenta substituição de glicina da posição 129 por arginina), S179D-hPRL (substitui a serina na posição 179 por ácido aspártico), Δ 41-51-hPRL (deleções dos aminoácidos 41 a 51), Δ 1-9-G129R-hPRL e Δ 1-14-G129R-hPRL (deleções de 9 e 14 resíduos N-terminais) (39,89–91). Considerando-se que o receptor de Prl é amplamente expresso em células epiteliais mamárias, e que geralmente sua expressão está elevada em tumores, Soares e colaboradores (89) desenvolveram técnicas de síntese em células humanas (CHO), purificação e caracterização da G129R-hPRL e S179D-hPRL, o que poderia ser de extrema importância terapêutica em tumores mamários. Da mesma forma, esses antagonistas podem ter potencial terapêutico em doenças metabólicas, tal como o diabetes e obesidade. Portanto, a hipótese do presente trabalho se baseia na possível via de atuação da bromocriptina sobre o controle glicêmico e o balanço energético por meio de sua influência sobre a produção e secreção de prolactina.

2.7 Estradiol e regulação do metabolismo: possível interação com a Prl

O estradiol é um dos maiores estimuladores da secreção de prolactina na glândula hipófise (64). Essa regulação se dá por uma via genômica clássica sobre a expressão do gene da prolactina (92), aumentando o número de lactotrofos (93–97) e modificando a responsividade dos lactotrofos a outros reguladores (98–100). Os neurônios TIDA expressam receptores de estrógeno α (ER α), e o estrógeno é capaz de inibir esses neurônios (101–104), diminuindo a liberação de dopamina, o que facilita a liberação de prolactina (64). Também, o estradiol pode regular a expressão de receptores de prolactina em neurônios (105) e muitas ações da prolactina são dependentes da presença de estrógeno (106).

Já é sabido que o estradiol influencia a expressão de receptor de prolactina em tecidos cerebrais como córtex, ponte, bulbo, plexo coroide e hipotálamo (107). O inverso também ocorre, uma vez que, periféricamente, sabe-se que a prolactina pode alterar a expressão dos ER α e ER β no corpo lúteo de ratas grávidas, por meio da via de sinalização intracelular JAK2/STAT5 (108). As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição 5 (STAT5a e STAT5b) são fatores de transcrição e, portanto podem regular a expressão de inúmeros genes, incluindo o ER α (109).

De um modo geral, estrógenos têm um papel fundamental na fisiologia reprodutiva, esquelética, cardiovascular e no sistema nervoso central. As ações dos estrógenos em núcleos hipotalâmicos controlam o consumo alimentar, o gasto

energético e a distribuição de tecido adiposo branco. No músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e células imunes, os estrógenos estão envolvidos na sensibilidade à insulina, bem como na prevenção do acúmulo de lipídios e na inflamação. Nas ilhotas pancreáticas, eles regulam a secreção de insulina e homeostase de nutrientes (110).

Baixos níveis de estrógenos em mulheres após a menopausa, ou em animais após ovariectomia, estão associados ao desenvolvimento de um quadro de obesidade e resistência à insulina (111,112). Os mecanismos pelos quais o estradiol, através de sua ligação ao seu receptor ER α , regulam o metabolismo energético e o controle glicêmico têm sido alvos de inúmeros estudos. Dados recentes têm apontado que a sinalização do ER α em populações neuronais específicas do hipotálamo tem papel-chave nos efeitos metabólicos do estradiol. Por exemplo, Musatov e colaboradores (113) demonstraram que o silenciamento do ER α , por meio de injeção de RNA de interferência no VMH causa marcante ganho de peso, resistência à insulina e intolerância à glicose. Esses efeitos são semelhantes aos observados após ovariectomia. Em outro estudo, em que foram utilizados camundongos com deleção tecido específica do ER α em células que expressam o Fator Esteroidogênico-1 (SF-1), o qual é um marcador de neurônios do VMH, os autores confirmaram que a expressão de ER α é essencial para manter o balanço energético e a homeostase glicêmica adequados (114).

Dada a importância do estradiol sobre o metabolismo energético e o controle glicêmico, e a interação hormonal que existe entre ele e a Prl em tecidos periféricos e no sistema nervoso central, temos como hipótese que a Prl pode alterar a expressão e/ou a sinalização do ER α em regiões hipotalâmicas, como, por exemplo, no VMH, que é uma região que apresenta a expressão de receptores de ambos os hormônios e alto percentual de co-localização (115). Essa interação hormonal pode levar a alterações no balanço energético e na homeostase glicêmica. Investigamos no presente trabalho de que maneira a diminuição de Prl sérica, provocada pela administração de bromocriptina, pode explicar a melhora no controle glicêmico e balanço energético induzido por essa droga. Também investigamos se esses efeitos são dependentes de estrógeno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é estudar o mecanismo de ação da bromocriptina (efeitos antidiabéticos) em animais geneticamente obesos e resistentes à insulina (*ob/ob*). Também propomos um ensaio pré-clínico em animais *ob/ob* para investigarmos a possível utilização de uma nova classe de medicamentos (antagonistas de prolactina) para o tratamento da obesidade e do DMT2.

3.2 Objetivos específicos

Para elucidar essas questões, o presente trabalho foi subdividido em 3 objetivos específicos:

3.2.1 Objetivo 1

Avaliarmos o mecanismo pelo qual a bromocriptina atua sobre o metabolismo de animais geneticamente obesos e resistentes à insulina (modelo *ob/ob*). Para isso, com base em evidências da literatura, temos como intuito estudarmos se a melhora do controle glicêmico dada por esse medicamento ocorre por meio da inibição sobre a secreção basal de Prl.

3.2.2 Objetivo 2

Investigarmos a possibilidade de um novo tratamento para o DMT2 e a obesidade, com base no princípio estudado no objetivo 1 do trabalho. Nessa etapa, verificaremos se a administração central ou periférica de antagonistas de Prl (Anti-PrlR) recapitula os efeitos benéficos observados com a administração da bromocriptina em camundongos *ob/ob*.

3.2.3 Objetivo 3

Compreendermos os possíveis mecanismos pelos quais a Prl pode atuar no SNC para influenciar o metabolismo. Também, pretendemos avaliar a possível interação desse hormônio com o estrógeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1. Estudo do mecanismo de ação da bromocriptina: possível ação via prolactina?

No primeiro experimento da tese foi estudado se a ação da bromocriptina sobre o controle glicêmico e o balanço energético ocorre por meio da diminuição dos níveis basais de prolactina. São descritos a seguir todos os procedimentos adotados para o desenvolvimento da pesquisa que responde a esse questionamento.

4.1.1 Obtenção dos camundongos experimentais

A procriação dos animais experimentais foi realizada em biotério próprio, o qual apresenta o ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, acendendo as luzes às 08h00min e apagando às 20 h. Foram seguidas as normas do Comitê de Ética no uso de animais em experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA), registrado sob nº 012 nas fls. 03 do livro 03.

Os animais utilizados nos experimentos foram os camundongos com fundo genético *C57BL6/J* da linhagem *ob/ob*, os quais são geneticamente obesos e resistentes à insulina devido mutação espontânea de troca de base nitrogenada no gene da leptina, o que leva à síntese de uma proteína não funcional. Progenitores com a mutação em heterozigose foram adquiridos da empresa The Jackson Laboratory (000632 B6.Cg-*Lep^{ob}/J*), e a procriação e manutenção da colônia foi realizada em biotério próprio. Efetuamos cruzamentos de camundongos heterozigotos para a mutação *ob*, obtendo-se a proporção de 1/4 da ninhada homozigota para *ob* (*ob/ob*). Utilizamos essa estratégia pois animais homozigotos para essa mutação são inférteis. Os filhotes foram desmamados com 3 a 4 semanas de vida e tiveram um pedaço do epitélio da cauda coletado para genotipagem.

4.1.2 Genotipagem

4.1.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA do material coletado foi feita usando-se um Kit comercialmente disponível (Sigma-Extract-N-AmpTM Tissue PCR kit #XNAT2O), e adotando-se os procedimentos conforme manual do fabricante. Resumidamente, para extração de DNA foram utilizados 100 µL de Extraction solution (Sigma –

E7526) e 12,5 µL de Tissue preparation solution (Sigma – T3073) por amostra, ambos fornecidos pelo kit de maneira pronta para o uso. Em seguida, foi realizada breve centrifugação (22 °C, 10000 rpm por 1 min) para garantir que o epitélio caudal fosse completamente imerso na solução anterior. Posteriormente, a amostra passou pela fase de digestão (22 °C por 20 min seguido por mais 12 min a 94 °C) e neutralização (50 µL de Neutralization solution B - Sigma – N3910). Antes de proceder com a amplificação por PCR, as amostras permaneceram no mínimo por 1h a 4 °C para estabilização.

4.1.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por reação em cadeia da polimerase para amplificação e assim possibilitar a identificação das regiões com mutação utilizando *primers* específicos. Os *primers* foram desenhados para parearem com a região do gene onde encontra-se a troca de base. As sequências dos *primers* foram (5'-TGTCCAAGATGGACCAGACTC-3' e 5'-ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA-3'). Para a PCR, foram utilizados 5 µL de Red Extract-N-Amp PCR Ready Mix (Sigma – R4775), 2µL da amostra de DNA, 1,25 nM do primer específico e H₂O ultra-pura previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para completar um volume final de 10 µL. O protocolo utilizado em termociclador (Eppendorf-Master cycler nexus gradient) para a PCR foi: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min; 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 seg), anelamento (62 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 1 min); desnaturação final de 72 °C por 4 min. Como a mutação do gene *ob* consiste apenas da troca de um nucleotídeo, o que não causa diferença no tamanho do fragmento de DNA, é necessário um segundo passo que consiste na digestão do DNA amplificado com endonucleases de restrição específica (HpyF3I, Fermentas). Essa enzima de restrição reconhece uma sequência gerada pela mutação, permitindo sua discriminação do gene selvagem.

4.1.2.3 Eletroforese

As amostras de PCR passaram então por eletroforese em gel de agarose (2% - Amresco, #RA N605), a 0,12 A por 1 h 30 min. O resultado do peso molecular das bandas de DNA geradas determinou se o animal carrega ou não a mutação. Dessa forma, visualizamos no gel de agarose 3 tipos de marcações de bandas: animal selvagem (uma banda de 155 pb); animal *ob/ob* homozigoto (uma banda em

100 pb e outra em 55 pb); e animal heterozigoto (uma banda em 155 pb, outra em 100 pb e outra em 55 pb). Através desse processo, identificamos os animais que possuem homozigose para a mutação do gene *ob*, e, portanto apresentavam o fenótipo desejado. Posteriormente, o resultado da genotipagem foi confirmado pela observação do fenótipo de obesidade mórbida.

Ao completarem 5 meses de vida, os camundongos *ob/ob* foram alojados em gaiolas individuais para aclimação durante 1 semana, quando iniciamos os experimentos.

4.1.3 Distribuição dos animais em grupos: teste de tolerância à glicose

Devido a grande oscilação de glicemia observada em animais *ob/ob*, antes de iniciarmos as análises, realizamos um teste de tolerância à glicose (GTT) para avaliarmos o desempenho dos animais e podermos distribuí-los de forma homogênea entre os grupos. O GTT consistiu em um teste em que os animais receberam injeção intraperitoneal de uma solução de glicose na concentração de 1 g de glicose/mL de salina, sendo que os animais receberam a solução na proporção de 1 g glicose/kg do animal. A glicemia foi medida com o uso de um glicosímetro portátil (One Touch Ultra® - Johnson & Johnson) nos tempos 0 (imediatamente antes da injeção de glicose), 20 min, 40 min, 60 min, 90 min e 120 min após a injeção, o que nos mostrou o perfil metabólico do animal quanto à captação de glicose com o passar do tempo. Os valores de glicemia obtidos foram analisados em programa GraphPad 5.0 visando o cálculo da área sob a curva de glicose sérica para a determinação da tolerância à glicose.

Além disso, também foi utilizado como critério para a distribuição dos animais em grupos homogêneos os valores de peso e consumo alimentar, os quais foram medidos em período basal do experimento, previamente aos tratamentos.

4.1.4 Delineamento experimental

Analizamos quatro grupos de camundongos geneticamente obesos e resistentes à insulina (camundongos deficientes de leptina, *ob/ob*, descrição da colônia no tópico 4.1.1), separados em grupos de machos e fêmeas, com aproximadamente 5 meses de vida ($n \geq 15$ por grupo), conforme os grupos a seguir:

- **Controle:** camundongos *ob/ob* que receberam um implante subcutâneo de cânula do tipo *micro osmotic-pump* (modelo 1002-Alzet) contendo PBS (veículo usado na

solução de prolactina) e receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de DMSO+salina (veículo utilizado na solução de mesilato de bromocriptina) entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro, durante os 16 dias do tratamento, nos mesmos volumes que os grupos Bromo e Bromo+Prl;

- **Prl:** camundongos *ob/ob* que receberam um implante subcutâneo de cânula contendo prolactina extraída da hipófise de ovelhas (Sigma, 18 µg/dia) e receberam injeção i.p. de DMSO+salina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro, como o grupo controle, durante os 16 dias do tratamento;
- **Bromo:** camundongos *ob/ob* que receberam o implante subcutâneo de cânula contendo PBS, e receberam injeção i.p. de mesilato de bromocriptina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro (Santa Cruz, 12 µg/g peso, diluído em salina/ DMSO, 50% de cada) durante os 16 dias do tratamento;
- **Bromo+Prl:** camundongos que receberam implante subcutâneo de cânula contendo solução com prolactina, e receberam injeções i.p. de mesilato de bromocriptina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro durante os 16 dias do tratamento.

4.1.5 Cirurgias de implante subcutâneo de bomba osmótica

Para o implante das cânulas, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico simples de duração inferior a 5 min por cada animal, sendo previamente anestesiados por via inalatória com isoflurano (Isoforine- Cristália). Uma pequena porção da pele da parte dorsal do corpo foi cortada para a implantação da cânula, o corte foi fechado com grampos e foi feita assepsia na área correspondente ao implante com álcool iodado.

O tratamento teve duração de 16 dias, respeitando-se a capacidade limitada das cânulas osmóticas. Porém, de acordo com a literatura, este período é suficiente para causar os efeitos benéficos da bromocriptina sobre o metabolismo dos camundongos *ob/ob*, conforme demonstrado em trabalhos anteriores (53,51,54,55).

4.1.6 Balanço energético e controle glicêmico

Previamente ao início dos tratamentos, após o período de aclimação, mensuramos o ganho de peso corporal e o consumo alimentar basal de cada animal. Esses mesmos parâmetros foram medidos durante o período de tratamento. Entre o 10º e o 12º dias de tratamento, realizamos GTT para analisarmos o perfil metabólico dos animais após o tratamento ao qual foram submetidos, conforme

descrito acima no tópico 4.1.3. Dois dias após o teste de tolerância à glicose, os animais foram submetidos a um teste de sensibilidade à insulina (ITT) da mesma maneira que o GTT, com a diferença que os camundongos receberam injeção i.p. de insulina regular humana (Novo Nordisk) na proporção de 3 IU /kg do animal.

4.1.7 Eutanásia

Após 2 dias de recuperação dos testes de ITT de cada rodada de experimento, no 16º de tratamento, foram realizadas as eutanásias dos animais por decaptação. Imediatamente após a decaptação, foram coletadas amostras de sangue, as quais foram posteriormente centrifugadas para separação da fase de soro. As amostras de hipotálamo foram coletadas utilizando-se as seguintes delimitações: rostro-caudal, 1 mm anterior ao quiasma óptico e imediatamente posterior aos corpos mamilares; latero-lateral, definida pelo trato óptico; e superior, o limite dorsal do terceiro ventrículo. Amostras de fígado foram coletadas sempre do mesmo lóbulo. Músculos sóleo e gastrocnêmio foram coletados apenas nas cohortes que receberam injeções de insulina 15 minutos antes da eutanásia, para análises de Western Blotting, conforme descrito no tópico 4.1.10. Todos tecidos coletados foram imediatamente imersos em gelo seco e posteriormente armazenados a -80°C, para posteriormente, em ocasião oportuna, serem submetidos à extração de RNA total ou de proteínas, dependendo da análise a ser seguida (quantificação gênica ou proteica).

4.1.8 Ensaio enzimático

Amostras de soro de animais machos foram utilizadas para a determinação da concentração circulante de insulina e prolactina com o uso de kits comercialmente disponíveis de ensaio enzimático de imunoabsorção (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit, #90080 e Crystal Chem Mouse Prolactin ELISA Kit, Cat N° RAB0408 – Sigma-Aldrich, protocolo de acordo com especificações do fabricante).

4.1.9 Quantificação gênica

Amostras de fígado e hipotálamo foram submetidas à extração de RNA total e reação em cadeia de polimerase para a avaliação de possíveis alterações gênicas desencadeadas pelos tratamentos. Foram analisados principalmente genes

envolvidos no controle da homeostase glicêmica e do metabolismo energético. Os passos estão descritos nos tópicos a seguir.

4.1.9.1 Extração de RNA total

Todas as amostras coletadas tiveram RNA total extraído utilizando o protocolo do TRIzol® Reagent seguindo o manual do fabricante. As amostras foram retiradas do freezer -80 °C somente no momento da extração sendo sempre mantidas em gelo. A homogeneização das amostras foi realizada utilizando-se 1 mL de TRIzol® Reagent com auxílio de homogeneizador de tecidos (Polytron). A mistura resultante foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e a seguir acrescidos 0,2 mL de clorofórmio (CHCl₃) para desproteinização (fase de separação). O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4 °C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (fase de precipitação), lavado com etanol 75% por duas vezes (fase de lavagem) e dissolvido com H₂O previamente tratada com DEPC (fase de diluição). O RNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek®) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.1.9.2 Transcrição Reversa

Inicialmente, 2 µg de cada amostra de RNA total foram tratadas com DNase I, RNase free (Roche, #776785). O uso da DNase teve por objetivo eliminar qualquer contaminação que as amostras pudessem ter com DNA genômico. Para a primeira etapa do tratamento com DNase foram acrescidos o volume predeterminado pela biofotometria de RNA total, 0,32 µL de DNase I previamente diluída (2 µL de DNase, 1µL de tampão e 7 µL de H₂O DEPC), 3,36 µL de MgCl₂ (Roche, #1699113) e foi completado com H₂O DEPC o volume final de 20 µL. Esta solução foi então levada ao termociclador: 37 °C por 30 min; 75 °C 10 min; 4 °C.

As amostras então foram submetidas à reação de transcrição reversa. Foram acrescidos à solução anterior: 20 µL de H₂O DEPC, 10 µL de DTT, 10 µL de primers randômicos (146 ng – pdN6 Roche, #1034731), 20 µL de dNTPmix (desoxirribonucleotídeos trifosfatados - No Cat. 10297-018, Invitrogen™), 1 µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript II RTase, GIBICO, #18064-022) e 20 µL do tampão da enzima. Estes primers randômicos são na maioria das vezes hexâmeros de oligodesoxirribonucleotídeos que se combinam à fita simples de RNA para que a enzima transcriptase reversa reconheça um sítio de início de transcrição.

Os desoxirribonucleotídeos fosfatados dNTPs são os quatro nucleotídeos do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina): dATP (desoxiAdenosina Trifosfatada), dCTP (desoxiCitidina Trifosfatada), dGTP (desoxiGuanosina Trifosfatada) e dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada). Novamente a solução foi levada ao termociclador: 25 °C por 10 min; 42 °C por 50 min; 72 °C por 10 min; 4 °C. Terminada a reação as amostras foram devidamente armazenadas a -20 °C.

4.1.9.3 Gene constitutivo

O gene endógeno, ou constitutivo, é um gene expresso continuamente e em todas as células do organismo. Os genes constitutivos utilizados foram o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), ciclofilina A (Ppia) e β -actina (Actb). Utilizamos a média geométrica dos resultados de Ct obtidos pela reação de PCR em tempo-real dos genes endógenos para os cálculos das demais expressões gênicas analisadas.

4.1.9.4 Expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão do RNAm foi estimada mediante PCR quantitativo em tempo real. A técnica de PCR em tempo real é sensível e permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em cada ciclo. Para tal, foi utilizada a técnica de coloração “SYBR Green” que segue o princípio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) que emite sinal de fluorescência quando ligadas ao DNA dupla fita, utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Além do SYBR Green foi utilizada a tecnologia TaqMan (TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems®), que permite maior especificidade da reação utilizando o mesmo princípio de FRET, porém o sinal de fluorescência é emitido quando a sonda específica do gene estudado é hidrolisada. Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante. Para TaqMan: 6,25 μ L MasterMix; 0,35 μ L primer; 4,4 μ L H₂O DEPC; 1,5 μ L amostras. Para SYBR: 6,25 μ L MasterMix; 1,5 μ L primer; 3,25 μ L H₂O DEPC; 1,5 μ L amostras.

No hipotálamo, analisamos genes de mediadores envolvidos com o controle do balanço energético, como *Esr1* que codifica a proteína ER- α , *Mch*, *Agrp*, *Hcrt*, que codifica para orexina, *Pomc*, *Prkcd*, que codifica para PKC delta, *Prkcg*, que codifica para PKC gama, *Cartpt*, que codifica para CART, *Npy*, além de genes de subunidades de canais de potássio dependentes de ATP: *Abcc-8* que codifica para

SUR-1, Abcc-9 que cofica para SUR-2, Kcnj8 que codifica para Kir6.1, Kcnj11 que codifica para Kir6.2. No fígado, analisamos os genes envolvidos na gliconeogênese: Pck-1, que codifica para a proteína PEPCK, G6pc que codifica para glicose-6-fosfatase, Ppara e Srebf-1 que codifica para SREBP-1C. Na tabela 1 estão listados os números de acesso e as sequências dos primers utilizados para cada gene.

Em todas as reações foram realizadas desnaturações iniciais a 95 °C por 5 min, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (60 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 30 s), e quando utilizado SYBR Green, seguindo para a curva de dissociação (95° por 15 segundos e 60 ° por 1 min). As reações foram realizadas em equipamento próprio para PCR em tempo real (7500™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems®). E a quantificação de expressão gênica foi realizada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (116).

Tabela 1 - Lista dos primers utilizados para expressão gênica. * TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems®

Gene de interesse	No. Acesso	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Abcc8	NM_011510.3	GTCTTCTGGAACAGCGCCT	GTCCTGAGGCAATACCTGGG
Abcc9	NM_021041.2	ATCGACATGGCCACGGA AAA	GAGACACGGTGAGCTATGGT
Agrp	NM_001271806.1	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC
β -actina*	Mm00607939_s1	-	-
Cart	NM_013732	CCGAGCCCTGGACATCTACT	CCGCCTTGGCAGCTCCTT
Ppia	NM_008907.1	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGT	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
Ers-1	NM_007956.4	GCAGATAGGGAGCTGGTTCA	TGGAGATTCAAGTCCCCAAA
G6pc	NM_008061.3	GCTGGAGTCTTGTCAGGCAT	CGGAGGCTGGCATTGTAGAT
Gapdh	GU21402.1	CTCCCACTCTTCCACCTTCG	CCACCACCTGTTGCTGTAG
Hcrt	(NM_010410.2)	GGCACCATGAACCTTCCTTC	GACAGCAGTCGGGCAGAG
kcnj11	NM_010602.3	GCTGTCCCGAAAGGCGATTA	CCTCCTCTCTCGAGTACGGT
KCNJ8	NM_008428.4	CATGGAGAAGAGTGGCCTGG	CGCAGACGTGAATGACCTGA
MCH	NM_008493.3	CCAGCTGAGAATGGAGTTCAGA	GTCGGTAGACTCTTCCCAGCAT
NPY*	Mm03048253_m1	-	-
PCK-1	NM_011044.2	TCGATCCTGGCCACATCTC	CGCAAGCTGAAGAAATATGACAA
POMC	NM_001278581.1	GAGGCCACTGAACATCTTTGTC	GCAGAGGCAAAACAAGATTGG
PPAR α *	Rn00566193_m1	-	-
PRKC δ	NM_011103.3	AACTGGTCCCTCCTGGAGAA	AGGGGATTTCACTTTGGGCT
PRKC θ	NM_008859.2	GTCAGGGAGAGGCAGTGAAC	TCTGCCCATTTTCTGATTCCAC
Srebf1c*	Rn01495769_m1	-	-

4.1.10 Quantificação proteica

4.1.10.1 Extração de proteínas

Parte dos animais foi sacrificada 15 min após receberem injeção i.p. de insulina (6 IU /kg do animal) para determinar a fosforilação de proteínas da via da insulina por meio de Western Blotting (extração de proteínas totais e eletroforese em gel de poliacrilamida)

As amostras de músculo e fígado destinadas a essa análise foram homogeneizadas em tampão RIPA (RIPA buffer, Sigma) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:1000, Sigma). Foi realizada centrifugação

(14000 RPM, 4 °C por 20 minutos) para coleta do material sobrenadante. Para determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado kit comercialmente disponível (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific).

4.1.10.2 Eletroforese e transferência

As amostras (50 µg de proteína total - 10% de SDS-PAGE) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Protein Gel Solutions). As amostras foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, #162-0115). As membranas passaram por bloqueio em 5% de albumina sérica bovina (BSA) e incubadas 12h a 4°C em anticorpos primários específicos (1:1000): pIR (receptor de insulina fosforilado, SC-25103, Santa Cruz), pAKT (*thymoma viral proto-oncogene 1* fosforilado, #3787S, Cell Signaling) e GAPDH (SC-25778, Santa Cruz).

Posteriormente, as membranas foram incubadas por 45 minutos em anticorpo secundário (1:10000, IRDye 800CW, Li-COR 926-32211). As proteínas foram detectadas por quimiluminescência e analisadas utilizando o equipamento Li-COR Odyssey system (Li-COR). A normalização para pIR e pAKT foi feita pelo GAPDH.

4.1.11 Adiposidade

Subsequente à decaptação e coleta de tecidos para análises gênicas e proteicas, territórios de tecido adiposo subcutâneos, perigonadais e retroperitoniais foram coletados, e as massas foram mensuradas para a avaliação da adiposidade dos animais.

4.1.12 Testes estatísticos

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5.0 e utilizando-se os testes One-way ANOVA e pós-teste de *Newman-Keuls*, sendo considerada diferença estatística sempre que $P < 0,05$.

4.2 Experimento 2. Análise dos possíveis efeitos antidiabéticos e anorexígenos de antagonistas do receptor de prolactina (Anti-PrIR) em camundongos ob/ob

Nesse experimento também foram utilizados camundongos *ob/ob*, machos, entre 3 e 5 meses de vida, os quais foram gerados conforme descrito no Tópico 4.1.2. Realizamos experimentos de administração do antagonista G129R-hPrl no SNC e periféricamente, em grupos diferentes de animais.

4.2.1 Delineamento experimental- administração de antagonista intracerebroventricular (icv)

Machos *ob/ob* foram divididos em 2 grupos experimentais:

- **Controle:** camundongos *ob/ob* que receberam implante intracerebroventricular (icv) de cânula micro-osmótica (*modelo 1004 -brain infusion kit 3- Alzet*) contendo PBS (veículo);
- **Antagonista:** camundongos *ob/ob* que receberam implante de cânula icv contendo o antagonista do receptor de prolactina G129R-hPrI (7,92 µg/dia, diluído em PBS), o qual foi produzido em colaboração com o IPEN, sob a supervisão do Dr. Carlos Soares.

4.2.2 Cirurgias de implante icv de bomba osmótica

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de implantação de cânula acoplada ao *mini-pump* de infusão intracerebrovetricular. Inicialmente receberam anestesia intraperitoneal de cetamina+xilazina nas proporções de 8% e 6%, respectivamente (Cetamin e Anasedan) e foram posicionados em um aparelho estereotáxico. Estabelecemos os valores de coordenadas ântero-posterior (0,5 mm em relação ao bregma), médio-lateral (1,3 mm em relação ao bregma) e dorso-ventral (2,2 mm, em relação à calota craniana) para o posicionamento da cânula no ventrículo lateral direito dos animais. Uma pequena perfuração foi feita na caixa craniana do animal utilizando-se uma broca, onde foi colada a cânula (com o uso de cola *Superbonder* e resina), a qual possui conexão com o *mini-pump* através de um catéter pelo qual percorre o conteúdo da bomba osmótica. A bomba foi posicionada na parte dorsal do animal, permitindo a sua movimentação normalmente. Essa bomba osmótica possui capacidade de armazenamento de 100 µl de solução e permanece liberando o líquido interno por 28 dias, a uma velocidade de 0,11 µl/hr.

4.2.3 Testes de controle glicêmico

Foram realizados testes de GTT e ITT nos dias 24 e 26 de tratamento, seguindo-se os mesmos protocolos descritos no Experimento 1.

4.2.4 Eutanásia

Ao final de 28 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por decaptação e foram coletados o sangue, hipotálamo, fígado, além de realizada a

composição corporal, seguindo os mesmos padrões das eutanásias do Experimento 1.

4.2.5 Delineamento experimental- administração de antagonista periférico

Machos *ob/ob* foram divididos em 2 grupos experimentais:

- **Controle:** camundongos *ob/ob* que receberam implante subcutâneo de cânula do tipo *micro osmotic-pump* (modelo 1002-Alzet) contendo PBS (veículo);
Antagonista: camundongos *ob/ob* que receberam implante subcutâneo de cânula contendo o antagonista do receptor de prolactina G129R-hPrI (7,92 µg/dia, diluído em PBS).

4.2.6 Cirurgias de implante periférico de bomba osmótica

Os procedimentos de implante das cânulas periféricas contendo antagonista de prolactina foram realizados aos mesmos moldes das cirurgias descritas no tópico 4.1.5.

4.2.7 Testes de controle glicêmico

Foram realizados testes de GTT e ITT nos dias 12 e 14 de tratamento, seguindo-se os mesmos protocolos descritos no Experimento 1.

4.2.8 Eutanásia

Ao final de 16 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por decaptação e foram coletados o sangue, hipotálamo, fígado, além de realizada a composição corporal, aos moldes do Experimento 1.

4.2.9 Testes estatísticos

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5.0 e utilizando-se o teste *t-student* para a comparação entre os grupos. Foram consideradas diferenças estatísticas para resultados de $P < 0,05$.

4.3 Experimento 3. Estudo do mecanismo de ação da PrI sobre o metabolismo via SNC: possível interação com o ER α

Avaliamos a hipótese de que a sinalização de prolactina influencia a expressão de ER α em áreas específicas do SNC, o que seria um possível mecanismo pelo qual a prolactina pode atuar sobre o controle do metabolismo, visto que a expressão central de ER α é essencial para tal ação (117,110). Para

tanto, primeiro determinamos quais áreas no SNC apresentam expressão concomitante de PrIR e ER α . Em seguida, estudamos se alterações nos níveis circulantes de prolactina alteram a expressão do ER α em núcleos hipotalâmicos específicos. Finalmente, determinamos se a presença de estrógenos é necessária para os efeitos antidiabéticos da bromocriptina.

4.3.1 Colocalização entre o PrIR e o ER α : hibridização *in situ* combinada à reação de imunoistoquímica

Para o estudo da co-expressão entre PrIR e ER α utilizamos a combinação de duas técnicas de marcação. Uma delas é a técnica de hibridização *in situ* com ^{35}S , a qual permite a localização e quantificação de RNA mensageiros do gene de interesse. Utilizamos protocolos estabelecidos em trabalhos prévios do grupo (118,119,115). Posteriormente à hibridização *in situ* para marcação do RNAm de ER α , os cortes foram incubados para imunodetecção da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição STAT5 em sua forma fosforilada (pSTAT5). A marcação do pSTAT5, após administração de prolactina, tem sido utilizada como marcador das células que expressam o receptor de prolactina (120,121).

4.3.1.1 Delineamento experimental

Em um primeiro experimento, foram utilizadas 10 fêmeas de camundongos C57BL6/J, as quais foram previamente submetidas à cirurgia de remoção dos ovários (ovariectomia) por uma pequena incisão na região lateral ao abdômen de cada lado, exposição dos ovários, remoção dos mesmos, sutura do músculo e fechamento da pele utilizando grampos.

O procedimento de remoção dos ovários foi adotado por promover um aumento da expressão de ER α no SNC, o que ocorre devido a ausência de estrógeno circulante como um efeito compensatório momentâneo, aumentando assim a visualização desses receptores. Além disso, a ovariectomia permitiu uma uniformidade no estado reprodutivo das fêmeas, independentemente do ciclo estral ou tratamento com PrI.

Após período de recuperação de 2 semanas, elas receberam injeção intraperitoneal de solução contendo prolactina ovina (Sigma- 10 $\mu\text{g/g}$ de peso do animal).

4.3.1.2 Preparação Histológica

Após 90 minutos de administração da injeção de prolactina, as fêmeas passaram por procedimento de perfusão transcardíaca. Nesse procedimento, os animais são previamente anestesiados com coquetel de xilazina e cetamina, e têm a cavidade ventral exposta para visualização do coração. Então é posicionado um cateter contendo uma agulha e conectado a um aparelho de bomba peristáltica, o qual permite a perfusão de líquidos pelo corpo do animal. Primeiramente administramos um volume aproximado de 50 ml de solução salina a 9% para retirada do sangue circulante. Depois administramos um volume aproximado de 200 ml de formalina (formaldeído 10%) para fixação dos tecidos.

Após esse procedimento, os encéfalos das fêmeas foram retirados da caixa craniana e permaneceram por 1 h em fixador. Depois, foram transferidos para solução contendo 20% de sacarose para crioproteção do tecido, onde permaneceram por período mínimo de 12 h, ou até que os encéfalos decantassem no frasco. Então, foram cortados em micrótomo de congelação, utilizando-se gelo seco para o congelamento, e a espessura dos cortes foi de 30 µm, sendo coletadas 4 séries e guardadas em solução anticongelante. Tivemos cuidado para que todos os procedimentos que precederam a técnica de hibridização *in situ* fossem livres de RNase, ou seja, as soluções utilizadas foram preparadas a partir de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e auto-clavadas.

4.3.1.3 Técnica de hibridização *in situ*

Na técnica de hibridização *in situ* utilizamos uma sonda de ERα produzida em nosso laboratório, utilizando-se cDNA obtido a partir do RNA extraído do hipotálamo de camundongo. A amplificação do fragmento de DNA foi feita por meio de PCR, e a sonda foi gerada a partir de transcrição *in vitro*, utilizando ³⁵S -UTP e uma T7 polimerase (Promega, Madison, EUA). Inicialmente, tratamos os cortes encefálicos em solução com 1% de boridetro de sódio, seguido de outra incubação com 0,25% de anidrido acético para aumentar a permeabilidade do tecido, seguida de incubação em solução contendo a sonda marcada com o ³⁵S -UTP a 56 °C por aproximadamente 16 h (solução contém Tampão de Hibridização 50%, Formamida 50%, SDS 10%, NaThio 10% e o *riboprobe* na concentração calculada previamente em um aparelho cintilador). Após esse processo, os cortes passaram por banhos

de estringência com tampão SSC a 60 °C (citrato de sódio dibásico- Sigma) em concentrações decrescentes do tampão.

4.3.1.4 Reação de imunistoquímica para detecção de pSTAT5

Logo após o término do procedimento de hibridização *in situ* iniciamos a reação de imunistoquímica para pSTAT5. Esse procedimento consistiu de um pré-tratamento dos cortes para permeabilização do tecido, o qual consistiu em lavagens em tampão de potássio PBS (0,02 M, pH 7,4 - KPBS); pré-tratamento em peróxido de hidrogênio (0,3%) e NaOH (1%) por 20 min; lavagens em KPBS; incubação de 10 min em glicina (0,3%) diluída em KPBS; lavagens em KPBS; incubação de 10 min em dodecil sulfato de sódio (0,3% - SDS) diluído em KPBS; bloqueio em soro (3% soro normal de burro) por 1 h. Então os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-pSTAT5 (phospho-Stat5 Tyr694 antibody- Cell Signaling, concentração de 1 µl de anticorpo em 1000 µl de solução) por 48 h.

Após o período de incubação, os cortes foram lavados em KPBS; incubados em anticorpo secundário conjugado a biotina anti-coelho IgG (1:1.000, Jackson Laboratories), por 1 h, seguido de incubação em kit ABC (complexo avidina-biotina, Vector Laboratories: concentrações de A: 1:500 e B: 1:500) por 1h e lavados em KPBS. Por fim, os tecidos foram submetidos à reação de imunoperoxidase por 3-5 min (5mg de diaminobenzidine tetrahydrochloride/DAB Sigma, peróxido de hidrogênio 0,03% em tampão acetado 0,1 M, pH 6,0).

Então os cortes foram montados em lâminas polarizadas e mergulhadas em emulsão autoradiográfica líquida (NTB2, Kodak) para a detecção do sinal do radioisótopo. Dessa forma, visualizamos em quais locais do SNC existem neurônios que respondem à ação da prolactina via marcação do pSTAT5, e que apresentam RNAm do ER α . As imagens foram capturadas em microscópio óptico Zeiss Axioimager A (Zeiss, Muencher, Alemanha) com câmera digital AxioCam HRc.

Analisamos diversas áreas encefálicas, principalmente regiões hipotalâmicas, em que foram detectadas marcações para o pSTAT5 e/ou para a sonda marcada de RNAm de ER α . Foi feita uma análise qualitativa das marcações que representaram a responsividade das células à Prl e ao ER α , bem como para a dupla marcação. O critério utilizado para estabelecer se as marcações/colocalizações foram altas, moderadas, baixas ou muito baixas está ilustrado nos resultados (figura 17).

4.3.2 Influência da presença de estrógenos para a responsividade das células à Prl

Para estudarmos se a presença de estrógenos circulantes altera a responsividade das células de núcleos hipotalâmicos à Prl, realizamos experimento de tratamento com prolactina ovina (injeção aguda i.p na dose de 10 µg/g do animal) em fêmeas previamente ovariectomizadas (n=9) ou intactas (n=5), além de injeções de PBS em fêmeas intactas para controle da reação (n=3).

Todos os animais foram perfundidos 90 minutos após as injeções (procedimento similar ao descrito no tópico 4.3.1.2) e seus encéfalos foram cortados em micrótomo de congelação. Os cortes foram pré-tratados e incubados para a marcação de pSTAT5 (1:1000, Cell Signalling). Os cortes foram fotografados utilizando-se a câmera Nikon e o *software* Axovision acoplados ao microscópio óptico (Zeiss). As fotomicrografias foram utilizadas para realizarmos a quantificação de células imunorreativas à Prl, utilizando-se o programa Image J 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os valores obtidos na quantificação foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0, onde foi feito um teste estatístico *One-way ANOVA*, com pós-teste de *Newman-Keuls*, considerando-se diferença estatística quando o $P < 0,05$.

4.3.3 Influência dos níveis circulantes de Prl sobre a expressão de ER α

Para analisarmos a influência da prolactina sobre a expressão de ER α , realizamos um protocolo de injeções intraperitoniais de prolactina ovina durante três dias consecutivos (com intervalo de 12 h entre cada injeção, na dose de 10 µg/g do animal) em 5 fêmeas previamente ovariectomizadas, conforme descrito anteriormente. Em outras 5 fêmeas ovariectomizadas, fizemos o mesmo padrão de injeções utilizando apenas o veículo (PBS). Perfundimos as fêmeas 90 min após a última administração desses tratamentos. As técnicas de perfusão e microtomia foram semelhantes às descritas anteriormente.

As séries de cortes encefálicos foram submetidas à hibridização *in situ* para a marcação do RNAm de ER α , conforme descrito anteriormente. A quantificação da marcação de RNAm de ER- α no VMHvl foi feita no programa ImageJ por densitometria, e foram analisadas as porções rostrais e caudais desse núcleo hipotalâmico. O teste estatístico foi realizado no programa Prisma 5.0, utilizando o teste *t student*, considerando-se estatisticamente significativo quando o $P < 0,05$.

4.3.4 Influência da presença de estrógenos para os efeitos antidiabéticos da bromocriptina.

Para investigarmos se parte dos efeitos antidiabéticos da bromocriptina depende da presença de estrógenos no organismo, realizamos experimentos em um grupo de fêmeas ovariectomizadas (OVX) e outro grupo de fêmeas submetidas à cirurgia controle (*Sham*). Parte dos animais de cada grupo recebeu tratamento com bromocriptina ou injeções controle (solução veículo). Os protocolos de cirurgia e de tratamento com a Bromo foram semelhantes aos apresentados anteriormente. Após o procedimento cirúrgico, as fêmeas ficaram em repouso por 2 meses, tempo no qual elas se recuperaram e puderam exibir os efeitos fenotípicos da ausência de estrógeno no organismo. Antes do início dos experimentos, foi realizado um teste de tolerância à glicose para verificação do controle glicêmico das fêmeas OVX e Sham.

4.3.4.1 Delineamento experimental

As fêmeas previamente submetidas às cirurgias sham ou ovariectomia foram separadas nos seguintes grupos:

- **Sham Controle**: fêmeas que passaram pelo procedimento cirúrgico sem a remoção dos ovários e receberam injeções i.p. diárias por 16 dias de DMSO+salina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro;
- **Sham Bromo**: fêmeas que passaram pelo procedimento cirúrgico sem a remoção dos ovários e receberam injeções i.p. diárias por 16 dias de mesilato de bromocriptina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro (Santa Cruz, 12 µg/g peso, diluído em salina/ DMSO, 50% de cada);
- **OVX Controle**: fêmeas que tiveram seus ovários removidos previamente e receberam injeções i.p. diárias por 16 dias de DMSO+salina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro;
- **OVX Bromo**: fêmeas que tiveram seus ovários removidos previamente e receberam injeções i.p. diárias por 16 dias de mesilato de bromocriptina entre 1 h e 2 h após o início do ciclo claro

4.3.4.2 Testes de controle glicêmico e balanço energético

As fêmeas foram acompanhadas diariamente durante o tratamento, sendo mensurados o peso corporal e o consumo alimentar. À semelhança do experimento 1, foram feitos testes de GTT e ITT nos dias 12 e 14 de tratamento,

respectivamente. No entanto, diferente dos testes feitos em animais *ob/ob*, as doses de glicose para o teste de GTT foram de 2 g glicose/kg, e para o teste de ITT as doses de insulina foram de 1 UI/kg. A eutanásia foi realizada no dia 16 de tratamento, quando foram coletados o hipotálamo e uma porção do fígado para análises de qPCR, e foram coletados o tecido adiposo branco e o útero para pesagem. O peso do útero foi utilizado para confirmação da eficiência da cirurgia de remoção dos ovários, visto que este procedimento causa marcante atrofia uterina.

4.3.4.3 Testes estatísticos

Os testes estatísticos dos experimentos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.0, sendo o teste *t student* para os acompanhamentos basais (grupo sham e grupo OVX) e o teste *One-way ANOVA* com pós-teste de *Newman-Keuls*, para os acompanhamentos durante os tratamentos. Foi considerada diferença estatística sempre que o $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1. Estudo do mecanismo de ação da bromocriptina: possível ação via prolactina?

Para esse experimento foram avaliados dez conjuntos independentes de camundongos *ob/ob*. Três desses foram compostos por fêmeas, para determinarmos possíveis dimorfismos sexuais referentes a ação da bromocriptina e/ou prolactina. Utilizamos 149 camundongos *ob/ob*, os quais foram divididos em grupos controle (n=23 machos e n=15 fêmeas), PRL (n= 21 machos e n=15 fêmeas), Bromo (n= 23 machos e n=15 fêmeas) e Bromo+PRL (n= 22 machos e n=15 fêmeas).

5.1.1 Validação do tratamento

Para determinarmos se o tratamento com bromocriptina foi eficaz em alterar os níveis séricos de prolactina, bem como para verificarmos se a reposição de prolactina em bombas micro-osmóticas recuperaram os níveis basais desse hormônio, realizamos ensaio enzimático para a prolactina de amostras de soro dos animais. Observamos, conforme ilustrado na Figura 1, que os tratamentos foram efetivos, uma vez que animais tratados apenas com Bromo reduziram significativamente seus níveis séricos de prolactina em comparação aos demais grupos, e animais com reposição de prolactina recuperaram níveis desse hormônio similares aos animais controle e Prl. Animais apenas tratados com prolactina mantiveram níveis que não se diferenciaram dos animais controle, o que mostra que o tratamento não causou hiperprolactinemia nos mesmos.

Figura 1 - Concentração plasmática de prolactina nos machos *ob/ob* dos grupos Controle (injeção de DMSO+Salina e mini-pump contendo PBS), Prl (injeção de DMSO+Salina e mini-pump contendo Prolactina com

infusão de 18 ug/dia), Bromo (injeção de Bromocriptina na dose de 12 ug/g de peso e mini-pump contendo PBS) e Bromo+PrI (injeção de Bromocriptina na dose de 12 ug/g de peso e mini-pump contendo Prolactina com infusão de 18 ug/dia). Teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$.

5.1.2 Balanço energético

Para avaliar os efeitos metabólicos induzidos pelos tratamentos de Bromo e/ou PrI, avaliamos inicialmente o consumo alimentar dos animais. O consumo diário de ração durante o período de tratamento foi semelhante entre os grupos de *ob/ob* machos (Figura 2A, $P = 0,3139$). Entre as fêmeas, observamos que o tratamento com Bromocriptina diminuiu o consumo alimentar. Todavia, a reposição de prolactina evitou parcialmente essa diminuição (Figura 2B, $P = 0,012$).

Figura 2 - Médias do consumo diário de ração de machos *ob/ob* (A) e fêmeas *ob/ob* (B) dos grupos Controle, tratados com prolactina (PrI), tratados com bromocriptina (Bromo) e tratados com bromocriptina e prolactina (Bromo+PrI). Teste estatístico One Way Anova, com pós teste de Newman- Keuls. Símbolos a e b nos gráficos representam diferença estatística de $P < 0,05$.

Em uma comparação pareada, antes do início (período basal) e durante o tratamento, o consumo alimentar de machos tratados com bromocriptina não se alterou, sendo que apenas machos controles tiveram aumento do consumo alimentar (Figura 3A). Em contrapartida, nas fêmeas, confirmamos que o tratamento com a Bromocriptina diminuiu o consumo alimentar diário e a reposição de prolactina no grupo Bromo+PrI não reverteu essa diminuição (Figura 3B).

Figura 3 - Médias do consumo diário em período basal e período de tratamento dos animais experimentais em machos (A) e fêmeas (B). Teste estatístico t-student pareado não paramétrico. * $P < 0,05$.

Na análise de peso corporal, observamos que a porcentagem de ganho de peso dos machos e fêmeas tratados com bromocriptina, com ou sem reposição de prolactina, foi menor que dos animais controle e Prl (Figuras 4A e 4C). No entanto, na comparação do peso corporal absoluto dos animais ao final do tratamento, não verificamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figuras 4B e 4D).

Figura 4 - Análise de peso corporal de machos e fêmeas ob/ob em tratamento. Em A e C estão os valores percentuais de ganho de peso em relação ao peso final do tratamento de machos e fêmeas, respectivamente. Em B e D estão representados os valores médios do peso dos animais após os tratamentos de machos e fêmeas.

fêmeas, respectivamente. Teste estatístico One –Way Anova, com pós teste de Newman-Keuls. Símbolos a e b representam diferença estatística de $P < 0,05$.

A composição corporal dos animais, avaliada por medida de peso de territórios adiposos relativos ao peso corporal, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos analisados em machos e fêmeas. Os três depósitos de tecido adiposo (subcutâneo, perigonadal/ou periuterino e retroperitonal) foram semelhantes entre os grupos (Figuras 5 A-F).

Figura 5 - Médias das razões entre peso dos adipócitos e peso corporal dos animais. A e B representam a relação do território subcutâneo de machos e fêmeas. C e D representam os valores dos territórios perigonadal e periuterino, respectivamente. E e F simbolizam os valores dos adipócitos da porção retroperitoneal de machos e fêmeas. Teste estatístico One-way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls.

5.1.3 Homeostase glicêmica

Os experimentos dos machos mostraram que tanto o grupo Bromo quanto o Bromo+Prl apresentaram melhor tolerância à glicose em teste de GTT, simbolizados por menor área sob a curva (ASC), em relação aos grupos Controle e Prl (Figuras 6A e 6B). Em uma comparação direta apenas entre os grupos Bromo e Bromo+Prl, os animais desse último grupo apresentaram ASC estatisticamente maior que dos animais Bromo, indicando que o a reposição de Prl reverteu, em parte, os efeitos da bromocriptina.

Figura 6 - Teste de tolerância à glicose aplicado aos 4 grupos experimentais de animais ob/ob machos. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados ($P < 0,0001$). B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), Prl (prolactina), UA (unidade arbitrária)

Os experimentos em fêmeas mostraram que o tratamento com bromocriptina melhorou a tolerância à glicose, enquanto as fêmeas tratadas com Bromo e com a reposição de Prl reverteram completamente o benefício do medicamento, apresentando valores de ASC semelhantes aos animais Controle e Prl (Figuras 7A e 7B).

Figura 7 - Teste de tolerância à glicose aplicado aos 4 grupos experimentais de animais *ob/ob* fêmeas. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados ($P = 0,007$). B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), Prl (prolactina), UA (unidade arbitrária).

Os testes de sensibilidade à insulina (ITT) realizados em machos mostraram que o tratamento com Bromo diminuiu a resistência à insulina dos animais *ob/ob*, observado pela menor ASC desse grupo em comparação aos demais, bem como pela característica da curva glicêmica desse grupo (Figuras 8A e 8B). Essa mesma melhora de sensibilidade à insulina não foi observada em machos tratados com Bromo+Prl, indicando que a reposição da prolactina reverteu o benefício do medicamento, sendo um indicativo de seu mecanismo de ação.

Figura 8 - Teste de sensibilidade à insulina aplicado aos 4 grupos experimentais de animais *ob/ob* machos. A. Média das áreas sobre a curva dos animais analisados (a e b representam as diferenças estatísticas entre os grupos $P=0,0007$). B. Média das curvas glicêmicas obtidas nos testes, adotando-se o valor de 100 para a glicemia basal.

Em fêmeas, o tratamento com Bromo mostrou tendência de melhora da sensibilidade à insulina, representada por menor ASC desse grupo, embora não tenha sido encontrada diferença estatística. Essa mesma melhora de sensibilidade

não foi observada no grupo Bromo+Prl, indicando uma possível reversão do efeito da droga (Figuras 9A e 9B).

Figura 9 - Teste de sensibilidade à insulina aplicado aos 4 grupos experimentais de animais ob/ob fêmeas. A. Média das áreas sobre a curva dos animais analisados (- representa tendência à diferença estatística do grupo Bromo em relação aos outros grupos $P=0,1955$). B. Média das curvas glicêmicas obtidas nos testes, adotando-se o valor de 100 para a glicemia basal. * $P<0,05$.

Machos tratados com Bromo tiveram tendência de diminuição da insulina sérica, analisada por kit Elisa do soro dos animais após eutanásia (Figura 10). Animais tratados com Bromo+Prl não tiveram redução de insulina, sendo mais um indicativo de que a reposição com prolactina reverte as alterações do controle glicêmico adquiridas pelo tratamento com bromocriptina.

Figura 10 - Concentração plasmática de insulina dos grupos estudados, analisada pelo método Elisa. Teste estatístico One-Way ANOVA, com pós -teste Newman-Keuls $P=0,1542$.

5.1.4 Quantificação gênica por qPCR

As análises gênicas realizadas com RNA extraído do hipotálamo das fêmeas (figura 11) mostraram diferenças nos genes *Mch*, *Abcc8* e *Pomc*, enquanto

os genes *Ers-1*, *Agrp*, *Abcc9*, *Kcnj8*, *Kcnj11*, *Hcrt*, *Prkcd*, *Prkcg*, *Cartpt* e *Npy* não apresentaram diferenças estatísticas.

O gene *Mch* ($P=0,0035$) foi mais expresso no grupo tratado com Bromo+Prl, quando comparado aos grupos controle e Bromo, mas não foi diferente do grupo Prl.

O gene *Abcc8*, o qual codifica a subunidade SUR-1 do canal de potássio sensível a ATP, foi menos expresso no grupo tratado com Bromo, diferentemente dos outros grupos ($P=0,051$). O pós-teste (Newman-Keuls) indicou diferença estatística entre os grupos Bromo e Bromo+Prl ($P<0,05$). As outras subunidades analisadas Kir 6.1 (gene *Kcnj8*), SUR-2 (gene *Abcc8*) e Kir 6.2 (gene *Kcnj11*) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos.

O gene *Pomc* foi menos expresso nos dois grupos tratados com bromocriptina ($P=0,029$), em comparação aos grupos controle e prolactina, não havendo diferença da reposição de prolactina no grupo Bromo+Prl.

Figura 11 - Análise da expressão gênica (qPCR) do hipotálamo de camundongos ob/ob fêmeas após 16 dias de tratamento. Letras diferentes representam a existência de diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais (ANOVA uma via, seguido de teste de Newman-Keuls). *Esr-1*(estrogen receptor 1), *Mch* (melanin-concentrating hormone), *Agrp* (agouti related neuropeptide), *Abcc8* [ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8], *Abcc9* [ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9], *Kcnj8* (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8), *Kcnj11* (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11), *Hcrt* (hypocretin), *Pomc* (pro-opiomelanocortin-alpha), *Prkcd* (protein kinase C, delta), *Prkcg* (protein kinase C, gama), *Cartpt* (CART prepropeptide), *Npy* (neuropeptide Y).

As análises gênicas do RNA extraído do fígado dos machos (Figura 12) apontaram para uma tendência a diferença estatística apenas para o gene *Srebf-1*, uma vez que seu teste estatístico apresentou um valor muito próximo à

significância ($P=0,051$). O pós-teste (Newman-Keuls) indicou diferença estatística entre os grupos Bromo e Bromo+Prl ($P<0,05$). Os outros genes analisados não foram diferentemente expressos entre os grupos estudados.

Figura 12 - Análise da expressão gênica (qPCR) do fígado de camundongos ob/ob machos após 16 dias de tratamento entre os grupos experimentais (* $P<0,05$; ANOVA uma via, seguido de teste de Newman-Keuls). Pck-1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1), G6pc (glucose-6-phosphatase), Ppara (peroxisome proliferator activated receptor alpha), Srebf-1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1).

5.1.5 Quantificação proteica por Western Blotting

Com o intuito de avaliar os efeitos dos tratamentos na homeostase glicêmica, os animais receberam uma injeção i.p. de insulina (6 UI/kg) ou salina, 15 min antes de serem eutanasiados. O objetivo desse tratamento foi verificar se a insulina é capaz de ativar sua via de sinalização intracelular no músculo esquelético (gastrocnêmio e sóleo) e no fígado, como um indicador de sensibilidade à insulina nesses tecidos. Para tanto, analisamos a fosforilação do receptor de insulina (IR) e da AKT nos tecidos de animais tratados com insulina ou solução salina em machos (Figura 13) e fêmeas (Figura 14).

Em machos, pudemos observar que o grupo Bromo que recebeu injeção de insulina apresentou aumento de AKT fosforilada no fígado e uma tendência de aumento de IR fosforilado no músculo em comparação aos animais Bromo que receberam injeção de PBS. O mesmo foi observado para os animais controle, onde a injeção de insulina aumentou significativamente a fosforilação do IR no músculo, em comparação aos animais controle que receberam PBS. Os grupos Prl e Bromo+Prl não apresentaram diferença de fosforilação das proteínas da via da insulina quando desafiados com injeções desse hormônio.

Figura 13 - Análise da via de sinalização da insulina em tecidos de camundongos ob/ob machos, tratados com insulina (n=5) ou salina (n=4), 15 min antes da coleta dos tecidos. *, P < 0,05 comparado ao respectivo grupo tratado com salina; ~ P < 0,1 comparado ao respectivo grupo tratado com salina. Teste t-student em cada grupo.

Em fêmeas, observamos alteração de proteínas da via da insulina no músculo de animais tratados, sendo que houve tendência a aumento do IR fosforilado nos grupos Bromo e Bromo +Prl, e aumento significativo do AKT fosforilado apenas nos animais do grupo Bromo.

Figura 14 - Análise da via de sinalização da insulina em tecidos de camundongos ob/ob fêmeas, tratadas com insulina (n=3) ou salina (n=2), 15 min antes da coleta dos tecidos. *, $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo tratado com salina; ~ $P < 0,1$ comparado ao respectivo grupo tratado com salina. Teste t student em cada grupo.

5.2 Experimento 2. Análise dos possíveis efeitos antidiabéticos e anorexígenos de antagonistas do receptor de prolactina (Anti-PrIR) em camundongos ob/ob

Nesse experimento, foram realizados protocolos de tratamentos com micro bombas para infundir antagonistas de prolactina periféricamente (implante subcutâneo) ou diretamente no SNC (implante no ventrículo lateral) em camundongos *ob/ob* machos. Os testes de tolerância à glicose mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa da área sob a curva entre os animais controle e tratados com o antagonista, tanto no SNC quanto periféricamente (Figura 15), embora periféricamente tenha havido tendência à maior tolerância dos animais tratados com antagonista (Figura 15A, $P=0,0883$). No entanto, nos pontos 60, 90 e 120 minutos da curva glicêmica os animais tratados periféricamente com antagonistas mostraram menor valor, comparados aos animais controle (Figura 15C).

Figura 15 - Médias das áreas sob a curva dos testes de tolerância à glicose em machos ob/ob com tratamento periférico do antagonista de prolactina (A), controle n=5 e antagonista G129R-hPrI n= 5; e animais com tratamento no SNC (B), controle n=4 e antagonista G129R-hPrI n= 5. Curvas glicêmicas dos animais com tratamento periférico (C) e central (D). Teste estatístico t-student *P<0,05.

Também, apesar dos tratamentos com o antagonista não causarem diferença das áreas sob a curva dos testes de sensibilidade à insulina (Figuras 16A e 16B), a curva glicêmica dos animais tratados foi menor, sugerindo menor resistência à insulina nesses animais. Especificamente no tratamento icv pode-se observar diferenças estatísticas nos pontos 20 min, 40 min e 120 min do teste (Figura 16D).

Figura 16 - Médias das áreas sob a curva dos testes de sensibilidade à insulina em machos ob/ob com tratamento periférico do antagonista de prolactina (A) e animais com tratamento no SNC (B). Curvas glicêmicas dos animais com tratamento periférico (C) e central (D). Teste estatístico t-student * $P < 0,05$.

5.3 Experimento 3. Ação da Prl sobre o metabolismo via SNC: interação com o ER α .

Inicialmente, demonstramos que parte dos efeitos antidiabéticos da bromocriptina ocorrem por diminuição dos níveis basais de Prl. Além disso, embora preliminares, obtivemos dados indicando que antagonistas de prolactina podem recapitular os efeitos antidiabéticos da Bromo. Para entendermos de que forma a Prl pode agir sobre o controle metabólico, investigamos a hipótese de que a sinalização da prolactina pode interagir com a do estrógeno, o qual está intimamente ligado ao controle do metabolismo. Assim, uma interação entre Prl e estrógeno no SNC poderia causar impacto sobre o controle glicêmico e energético. Primeiramente determinamos quais áreas no SNC apresentam co-expressão entre o PrlR e o ER α . Em seguida, estudamos se alterações nos níveis circulantes de prolactina alteram a expressão do ER α em núcleos hipotalâmicos específicos. Esses resultados foram agrupados em um manuscrito já publicado na revista Brain

Research, cuja cópia está presente no Apêndice B. Finalmente, estudamos se a presença de estrógenos é necessária para os efeitos antidiabéticos da bromocriptina.

5.3.1 Colocalização entre o *PrlR* e o *ER* α : hibridização *in situ* combinada à reação de imunoistoquímica

Primeiramente, analisamos a distribuição de células responsivas à prolactina que expressam o RNAm do *ER* α no encéfalo de fêmeas ovariectomizadas que receberam injeção única de prolactina e foram perfundidas 90 min após essa intervenção. Fizemos uma análise qualitativa de células com a marcação nuclear de pSTAT5 (indicador da presença do receptor de prolactina), células com a expressão do RNAm de *ER* α e a proporção de dupla marcação para pSTAT5 e *ER* α . A figura 17 ilustra fotomicrografias representativas de áreas encefálicas com diferentes níveis de marcação. Esses valores foram utilizados como critério para a análise qualitativa do grau de colocalização em cada núcleo encefálico.

Figura 17 - Fotomicrografias obtidas à partir de objetiva de microscópio de 20 x de cortes frontais de encéfalo de fêmeas de camundongo ovariectomizadas e injetadas intraperitonealmente com prolactina, que foram submetidas à Hibridização *in situ* para a marcação de RNAm para o *ER* α (pontos pretos- impregnação por grânulos de prata) e reação imunoistoquímica para a marcação do pSTAT-5 (esferas marrons). As fotos ilustram as escalas de marcação adotadas no experimento, sendo em A uma área de alta colocalização, em B moderada, em C baixa colocalização e em D muito baixa ou nenhuma colocalização.

Foram analisadas áreas na extensão do hipotálamo anterior até níveis do bulbo. Na Tabela 2, estão indicadas as proporções de marcações e colocalizações encontradas em cada região encefálica estudada.

Tabela 2 - Análise qualitativa dos núcleos encefálicos com células marcadas para pSTAT-5, ER α e da colocalização nessas áreas.

Núcleos	Densidade de células pStat5ir	Densidade de células ER α	Número de células duplamente marcadas
MPA	+++	+	+
AVPV	+++	+++	+++
MPN, medial	+++	+++	+++
MPN, lateral	++	++	++
BST	-	+++	-
PeN	++	+	+
RCA	++	+	+
PVH	+	+	-
ARH, rostral	+++	++	+++
ARH, tuberal	+++	+++	+++
ARH, caudal	+++	+++	+++
VMH, rostral	++	+	+
VMHvl, intermediário	+++	++	++
VMHvl, caudal	+++	+++	+++
VMHdm	+	+	-
DMH	++	+	+
LHA	++	+	+
PMV	++	+	+
MeApd	++	+++	++
NTS	+	+	++

MPA (área pré-óptica medial), AVPV (núcleo periventricular anteroventral), MPN (núcleo pré-óptico medial), BST (núcleo intersticial da estria terminal), PeN (núcleo periventricular), RCA (área retroquiasmática), PVH (núcleo paraventricular do hipotálamo), ARH (núcleo arqueado do hipotálamo), VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo), DMH (núcleo dorsomedial do hipotálamo), LHA (hipotálamo lateral), PMV (núcleo pré-mamilar ventral), MeApd (parte pósterio-dorsal do núcleo amigdalino medial), NTS (núcleo do trato solitário). +++ (alta marcação/colocalização); ++ (moderada marcação/colocalização); + (baixa marcação/colocalização); - (muito baixa ou nenhuma marcação/colocalização).

No hipotálamo anterior encontramos baixa colocalização de células imunorreativas ao pSTAT5 e marcadas com a sonda de ER α na área pré-óptica medial (MPA), embora haja grande quantidade de células responsivas à Prl, como pode ser visto na figura 18A, e em maior aumento em 18B. No núcleo periventricular anteroventral (AVPV, figuras 18C e 18D) e no núcleo pré-óptico medial (MPN, figuras 18E e 18F) observamos alta responsividade à Prl e marcação do ER α , assim como uma alta colocalização. Em contrapartida, no núcleo periventricular do hipotálamo (PeN, figura 18G) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH, figura 18H), as marcações são de moderadas a fracas, assim como a colocalização.

Figura 18 - Distribuição de células responsivas à prolactina (células marrons) e expressão do RNAm do receptor de estrógeno α (pontos pretos) na área pré-óptica e hipotálamo anterior. Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais de encéfalo de camundongo reagidos para pSTAT5 e submetidos à hibridização in situ para sonda de RNAm de ER- α . Barra de escala: A, C e E = 200 μ m; B, D, F e G = 25 μ m; H = 100 μ m,.

Na porção tuberal do hipotálamo, encontramos alta marcação para o pSTAT5 e para o RNAm do ER α , assim como alta colocalização entre ambos no núcleo arqueado (ARH, figura 19A e em maior aumento na figura 19B). Pudemos observar que todos os níveis do arqueado, do rostral ao caudal, apresentaram alta marcação de pSTAT-5, de alta a moderada marcação de ER α , e alta colocalização entre eles.

Na parte ventrolateral caudal do hipotálamo ventromedial (VMHvl, figura 19A e em maior aumento na figura 19D), também observamos alta marcação para o pSTAT5 e para o RNAm do ER α , assim como alta colocalização entre ambos. Diferentemente da porção dorsomedial do VMH (VMHdm, figura 19A e em maior aumento na figura 19D), a qual possui baixa responsividade à Prl e baixa marcação de RNAm do ER α . Nas porções intermediária e rostral do VMH, as colocalizações foram intermediárias e fracas, respectivamente.

Na área retroquiasmática (RCA, figura 19E) há marcação moderada de pSTAT5 e baixa de ER α , bem como baixa colocalização desses dois marcadores. No núcleo pré-mamilar ventral (PMV, figura 19F) observamos moderada marcação de pSTAT5 e ER α , e baixa colocalização entre eles, enquanto no núcleo do trato solitário (NTS, figura 19G e em maior aumento em 19H) observamos baixa marcação de pSTAT5 e ER α , embora a colocalização tenha sido moderada para ambos.

Em outras áreas não mostradas, observamos diversos padrões de marcação. No núcleo principal da estria terminal há uma marcação muito baixa de pSTAT5, embora seja alta para o ER α . Na porção pósterodorsal do núcleo medial da amígdala (MeAPd) observamos alta marcação do ER α , porém moderada de pSTAT5, e também moderado grau de colocalização.

Figura 19 - Distribuição de células responsivas à prolactina (células marrons) e expressão do RNAm do receptor de estrógeno α (pontos pretos) em nível hipotalâmico e do tronco encefálico. Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais de encéfalo de camundongo reagidos para pSTAT5 e submetidos à hibridização in situ para sonda de ER α . Barra de escala: A e G= 200 μ m; B-F e H= 25 μ m.

5.3.2 Influência da presença de estrógeno para a sensibilidade à Prl

Além das análises de colocalização, também analisamos a influência da presença ou ausência de estrógeno sobre a resposta à prolactina em fêmeas com as gônadas intactas e em fêmeas ovariectomizadas. Observamos diferença de resposta à Prl entre os dois grupos, indicada por marcação imunoistoquímica ao pSTAT5. Fêmeas intactas apresentaram maior marcação de pSTAT5 em áreas como MPA, AVPV, VMH, ARH e MeA, em comparação às fêmeas ovariectomizadas, conforme ilustrado nas figuras 20 e 21. Interessantemente, essas áreas foram as mesmas onde encontramos alta colocalização entre os dois hormônios, reforçando a possível relação entre a Prl e os estrógenos.

Figura 20 - Distribuição de neurônios imunorreativos ao pSTAT5 em fêmeas tratadas com prolactina. Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais de encéfalo de camundongas intactas tratadas com prolactina ovina (Intact+oPRL) e ovariectomizadas tratadas com prolactina ovina (OVX+oPRL) reagidos para pSTAT5 em diferentes áreas hipotalâmicas. Siglas: 3v (terceiro ventrículo), f (fórnice), oc (quiasma óptico) opt (nervo óptico), AVPV (núcleo antero-ventral periventricular), ARH (núcleo arqueado), DMH (núcleo dorso-medial hipotalâmico), MPA (área pré-mamilar), VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo), MeA (amígdala medial) e PMV (núcleo pré-mamilar ventral). Barra de escala: 200 μ m.

Resposta à Prl

Figura 21 - Gráfico ilustrando o número de células responsivas à prolactina nos grupos de fêmeas intactas tratadas com PBS (barras pretas), intactas tratadas com prolactina ovina (barras brancas), e ovariectomizadas tratadas com prolactina ovina (barras cinzas), das áreas encefálicas analisadas: MPA (área pré-mamilar), AVPV (núcleo antero-ventral periventricular), VMH (núcleo ventromedial do hipotálamo), ARHtub (núcleo arqueado tuberal), ARHcau (núcleo arqueado caudal), MeA (amígdala medial) e PMV (núcleo pré-mamilar ventral). *P<0,05.

5.3.3 Influência dos níveis circulantes de Prl sobre a expressão de ER α

Visto que há colocalização entre PrlR e ER α , principalmente em regiões hipotalâmicas, além de observada a influência do estrógeno para a resposta das células à Prl, realizamos experimentos para avaliar se níveis aumentados de Prl poderiam alterar a expressão do ER α em áreas hipotalâmicas envolvidas com o controle metabólico, especificamente no VMH. A figura 22 ilustra a marcação do RNAm de ER α por impregnação por prata, em fêmea que receberam PBS ou Prl. Foram analisados três níveis da extensão rostro-caudal do VMH. Contudo, análises da densidade óptica integrada indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa de marcação do RNAm do ER α no VMH de fêmeas tratadas com PBS ou Prl (Figura 23).

Figura 22 - Fotomicrografias em campo escuro de cortes frontais de encéfalos de fêmeas ovariectomizadas, tratadas com PBS ou Prolactina, submetidas à hibridização in situ para marcação do RNAm de ER α . Os grânulos brancos representam o RNAm de ER α marcado com sonda radioativa e com impregnação por prata nas porções rostral, intermediária e caudal do hipotálamo tuberal. ARH= núcleo arqueado do hipotálamo, VMH=núcleo ventromedial do hipotálamo.

Figura 23 - Gráficos ilustrando a densidade de células com marcação para RNAm de ER- α nos níveis rostral, intermediário e caudal do VMHvl, nas fêmeas ovariectomizadas tratadas com PBS ou prolactina

5.3.4 Efeito da presença de estrógenos para a ação antidiabética da bromocriptina

Uma vez confirmada a ampla colocalização entre o PrIR e o ER α , os efeitos do estrógeno sobre a resposta à prolactina e da possível ação prolactina sobre a expressão do RNAm de ER α , investigamos então se a presença de estrógeno é necessária para que a bromocriptina apresente seus efeitos antidiabéticos. Para tanto, realizamos tratamento com bromocriptina (dose de 12 μ g/g do animal) por 16 dias em fêmeas C57BL6/J ovariectomizadas ou que receberam cirurgia controle (fêmeas Sham).

Inicialmente, confirmamos se as cirurgias de ovariectomia foram bem sucedidas. A ausência de estrógenos provoca ganho de peso, além de perda de massa uterina e diminuição da sensibilidade à insulina. Observamos que, após um período de 3 meses pós-cirúrgico, fêmeas OVX apresentaram maior peso corporal (figura 24A), além de maior ganho de peso (figura 24B), e menor peso do útero (figura 24C), quando comparadas às fêmeas Sham. Além disso, fêmeas OVX foram intolerantes às glicose (ASC maior no GTT, figura 25A) e menos sensíveis à insulina (ASC maior no ITT, figura 25C).

Figura 24 - Gráficos ilustrando a média do peso corporal (A), do ganho de peso (B) e do peso do útero de fêmeas controle (Sham, n=18) e ovariectomizadas (OVX, n=22) 3 meses após as cirurgias. Os parâmetros de peso corporal foram medidos antes de realizarmos os tratamentos com bromocriptina, enquanto que o peso dos úteros foi realizado após o tratamento. Teste t student *P<0,05.

Figura 25 - Gráficos ilustrando as médias de área sob a curva no teste de tolerância à glicose (A) e de sensibilidade à insulina (C). Das fêmeas com cirurgia controle (Sham) e fêmeas ovariectomizadas (OVX). Médias das curvas glicêmicas em teste de tolerância à glicose (B) e sensibilidade à insulina do peso corporal (D). Teste estatístico t-student. * $P < 0,05$.

No teste de tolerância à glicose após o período de tratamento, fêmeas OVX tratadas com Bromo tiveram uma área sob a curva menor, assim como as fêmeas Sham tratadas com Bromo, quando comparadas às fêmeas OVX controle e Sham controle, indicando que a bromocriptina, mesmo na ausência de estrógeno, foi capaz de tornar o animal mais tolerante à glicose (Figura 26). No entanto, no teste de sensibilidade à insulina, observamos que as fêmeas OVX controle e tratadas com Bromo se comportaram da mesma maneira, indicando nesse sentido que a ausência de estrógenos evitou que a bromocriptina exercesse seu efeito sobre a sensibilidade à insulina (Figura 27).

Figura 26 - Teste de tolerância à glicose aplicado aos 4 grupos experimentais. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados, onde os dois grupos tratados com Bromo tiveram menor ASC em comparação com o grupo OVX controle (a e b representam as diferenças estatísticas de $P < 0,05$). B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), OVX (ovariectomizada), UA (unidade arbitrária).

Figura 27 - Teste de sensibilidade à insulina aplicado aos 4 grupos experimentais. A. Média das áreas sob a curva dos animais analisados (a e b representam as diferenças estatísticas de $P < 0,05$). B. Curva glicêmica das médias de glicemia dos animais. Siglas: ASC (área sob a curva), Bromo (bromocriptina), GTT (teste de tolerância à glicose), OVX (ovariectomizada), UA (unidade arbitrária).

O consumo alimentar das fêmeas OVX e Sham com ou sem tratamento não foi diferente, assim como o ganho de peso final após o período de tratamento, conforme ilustrado na figura 28 A e B. Já a adiposidade, obtida através da soma das massas de tecido adiposo branco retroperitoneal, subcutâneo e periuterino, foi maior

nas fêmeas OVX controle em comparação aos outros grupos, conforme ilustrado na figura 28C.

A Consumo diário tratamento

B Ganho de peso tratamento

C Adiposidade

Figura 28 - Gráficos da média do consumo diário durante o tratamento (A), do ganho de peso após todo o período de tratamento (B) e da adiposidade (tecido adiposo branco retroperitoneal, periuterino e subcutâneo) dos 4 grupos de fêmeas estudados. (* $P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O crescente aumento do número de pessoas obesas e com DMT2 indica que essas doenças metabólicas tornaram-se uma epidemia global, causando grande preocupação para os órgãos de saúde. Por isso, há grande interesse na busca por tratamentos mais eficazes para essas doenças. Na presente tese, propusemos a hipótese de que parte dos efeitos antidiabéticos do mesilato de bromocriptina, o qual foi recentemente aprovado nos EUA para o tratamento do DMT2, pode ocorrer por meio da redução dos níveis circulantes de prolactina, mesmo na ausência de hiperprolactinemia. Porém, fármacos que atuam no sistema dopaminérgico podem afetar outros sistemas fisiológicos como, por exemplo, eixos endócrinos, o sistema motor somático (via gânglios da base), o sistema mesolímbico (envolvido com recompensa, reforço e vício) e o ritmo circadiano.

Nesse sentido, propusemos a investigação da eficácia de um novo medicamento em potencial para o tratamento do DMT2, usando antagonistas do receptor de prolactina. Além disso, estudamos o possível mecanismo pelo qual a prolactina poderia agir no controle glicêmico e do metabolismo, possivelmente através da interação com o ER α . Como resultados, constatamos que a redução de prolactina causada pelo tratamento com bromocriptina pode ser em parte a responsável pelos efeitos antidiabéticos dessa droga. Também verificamos que o tratamento com antagonistas do receptor de prolactina apresenta propriedades antidiabéticas em camundongos *ob/ob*, confirmando nossa hipótese inicial. Finalmente, descrevemos uma abundante expressão do ER α em neurônios responsivos à prolactina, particularmente em áreas que regulam a homeostase glicêmica, sugerindo ampla interação central entre esses hormônios. Visto que a sinalização via ER α em núcleos hipotalâmicos regula diversos aspectos metabólicos, essa interação hormonal poderia explicar o mecanismo de ação da prolactina nesse contexto.

6.1 Discussão metodológica

6.1.1 Modelo experimental adotado

A escolha por um modelo animal ideal para o estudo do DMT2 não é trivial, uma vez que não existe um modelo único que recapitule todas as características e complicações dessa disfunção metabólica em humanos. Existem diversos modelos de camundongos, com características fenotípicas da doença, disponíveis em

empresas especializadas. Muitos são os trabalhos que adotam esses modelos para o estudo de síndromes metabólicas. Como exemplos, existem animais com alterações no receptor de leptina, sejam elas espontâneas (Lepr^{db} ou db/db) (122) ou induzidas (Ob-Rb Cre - receptor de leptina associado a sequência Cre, os quais podem gerar animais com deleções tecido-específicas do receptor) (119,123,124). Outro modelo bastante comum é o com mutação pontual no gene da leptina (Lep^{ob} ou ob/ob), os quais possuem fenótipo semelhante aos animais com alteração no receptor da leptina (125), o qual encontra-se em alguns fundos genéticos, como BTBR (126) e C57BL6/J, os quais podem apresentar algumas diferenças fenotípicas (127,128).

Além dos animais com alteração genética, outros modelos de camundongos comumente empregados para o estudo de diabetes e obesidade são os obesos por indução de dieta, seja ela de cafeteria ou dieta rica em gordura. Esses modelos, embora tentem mimetizar o ganho de peso de maneira semelhante ao que ocorre com humanos, eles possuem algumas limitações. Protocolos curtos de dieta rica em gordura não promovem alterações plasmáticas de glicose e insulina em camundongos (129). Mesmo em protocolos mais longos, existe uma porcentagem de animais que são resistentes à obesidade induzida por dieta (130,131), os quais não apresentam o quadro de síndrome metabólica. Além disso, a hiperglicemia é moderada e o quadro de hiperinsulinemia é leve (132). Dessa maneira, esse protocolo torna-se pouco vantajoso devido ao elevado investimento temporal e financeiro para um resultado final não garantido de indução de obesidade e resistência à insulina.

Outro modelo também empregado para estudo do DMT2 é pela indução com streptozotocina, em doses reduzidas em comparação aos modelos de T1DM (133–136), que causam lesões moderadas das células beta-pancreáticas e induzem morte semelhante à causada pela falência de células beta no DMT2. Em alguns estudos, adota-se esse protocolo em associação com dieta rica em gordura e sacarose (136).

Nessa tese, utilizamos camundongos ob/ob com fundo genético C57BL6/J para estudarmos o mecanismo de ação da bromocriptina. Esses animais são geneticamente obesos e resistentes à insulina pois apresentam uma mutação *nonsense* no códon 105 do gene da leptina, resultando em uma troca pontual de Citosina por Timina e na ausência de produção da proteína funcional desse

hormônio (132). Eles exibem hiperfagia, obesidade, intolerância à glicose, resistência à insulina, infertilidade, prejuízos na recuperação tecidual após trauma, aumento da secreção de glicocorticóides, além de redução do gasto energético e da temperatura corporal (132,137,138). Portanto, ele parece atender a diversos aspectos da doença metabólica em humanos, o que os torna um modelo interessante para o estudo de tratamentos para o DMT2.

No entanto, os camundongos *ob/ob* também possuem limitações. O quadro de hiperinsulinemia é severa, diferente dos humanos, nos quais ela é moderada. Já a hiperglicemia assemelha-se a dos humanos, de severa a moderada, embora comporte-se de maneira transiente (132). Uma dificuldade encontrada no uso desse modelo de camundongos foi a grande variação de glicemia apresentada entre os animais, ou até no mesmo animal em diferentes momentos. Para tentarmos sanar essa questão, realizamos teste de tolerância à glicose antes de iniciarmos os tratamentos, e a partir desses dados e dos valores de peso corporal, buscamos distribuir os animais de forma homogênea, para que os grupos apresentassem o mesmo grau de severidade no fenótipo de obesidade e resistência à insulina. No entanto, a questão da variação de glicemia que ocorre ao longo do dia nesses animais não pôde ser evitada. Em uma tentativa de amenizar esse problema, realizamos testes em diversos grupos de animais, sempre respeitando os mesmos horários, para mantermos o mesmo padrão circadiano.

Outra questão interessante dos animais *ob/ob* é o fato deles desenvolverem ganho de peso e depósito de gordura mesmo quando restritos a uma dieta suficiente para a manutenção do peso corporal de camundongos magros (132). Nesse sentido, talvez a falta da ação da leptina nesse modelo não apenas esteja relacionada ao desencadeamento de hiperfagia, como pode causar alterações metabólicas que vão além do comportamento alimentar. De qualquer maneira, diversos são os trabalhos da literatura que utilizam esse modelo como forma fidedigna para o estudo de tratamentos de doenças metabólicas (53,139) e, nesse sentido, nos parece plausível a escolha desse modelo para o desenvolvimento da presente tese.

6.1.2 Reposição de prolactina

Para testarmos a hipótese de que o efeito antidiabético da bromocriptina pode ser por meio da redução dos níveis de prolactina, desenvolvemos um

protocolo de reposição de prolactina, utilizando bombas osmóticas de infusão contínua. Essa forma de administração foi escolhida para diminuirmos o estresse ao qual os animais seriam submetidos, caso empregássemos injeções diárias para a administração do hormônio. Assim, as injeções ficaram restritas apenas ao tratamento com bromocriptina. Outra preocupação foi em utilizarmos doses de prolactina que fossem suficientes para repor os níveis de prolactina que seriam reduzidos pela bromocriptina, mas que não causassem hiperprolactinemia nos animais. Sabe-se que a hiperprolactinemia pode causar anormalidades no metabolismo de carboidratos e lipídeos (66), assim como hiperinsulinemia e intolerância à glicose (67–70). Dessa maneira, poderíamos mascarar os resultados desse grupo com níveis suprafisiológicos de prolactina. Todavia, nossas análises demonstraram que os níveis séricos de prolactina dos animais que receberam bombas osmóticas se mantiveram em níveis basais, indicando que a reposição foi bem sucedida.

6.1.3. Dimorfismo sexual

Resultados diferentes foram encontrados em machos e fêmeas submetidos aos protocolos de tratamento do experimento 1. Uma vez que as áreas no SNC que expressam o PrIR fazem parte do circuito de núcleos sexualmente dimórficos, não causa surpresa que os efeitos da bromocriptina podem ser diferentes de acordo com o sexo. Essas áreas incluem o núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo arqueado, núcleo pré-mamilar ventral e a área pré-óptica medial (115,120). De fato, alguns trabalhos apontam que os efeitos da prolactina devem ser mais evidentes em fêmeas do que em machos (140,141). Por exemplo, receptores do tipo D2 da hipófise e do cérebro parecem atuar de maneira diferente entre os sexos, uma vez que foi demonstrado que eles regulam a expressão de genes sexualmente dimórficos no fígado (142). Em outro estudo, foi observado que a hiperprolactinemia promove ganho de peso apenas em fêmeas (141).

6.1.4 Administração do Antagonista do receptor de Prolactina

A administração do antagonista de prolactina foi testada de duas formas, com o uso de bombas osmóticas de infusão intracerebroventricular ou infusão periférica. A administração via SNC foi realizada com o intuito de testarmos a hipótese de que a ação do antagonista de prolactina sobre o controle do metabolismo era realizada centralmente. Por exemplo, trabalhos da literatura mostram que a administração

intracerebroventricular de bromocriptina melhora a resistência à insulina e intolerância à glicose em *hamsters* (143). Da mesma maneira, quisemos testar a ação central dos antagonistas do receptor de prolactina sobre o controle glicêmico. Além disso, a administração central deve causar efeitos mais exacerbados, uma vez que a droga é liberada na proximidade da região onde deve atuar, além de serem necessárias menores doses. Trabalhos que utilizam-se de administrações centrais ou sistêmicas de substâncias que atuam primordialmente no SNC adotam menores doses para a administração icv (144). No entanto, o método de administração via SNC com cânulas conectadas à bomba osmótica possuem algumas complicações como, por exemplo, desencadeamento de processos inflamatórios, influenciando no fenótipo dos animais. Esse aspecto é crítico principalmente quando trata-se de cirurgia aplicada a camundongos *ob/ob*. Esses animais são imunodeficientes e pouco tolerantes a cirurgias e anestesia, além de possuírem um quadro inflamatório basal devido à obesidade. Dessa maneira, não tivemos como garantir que as cânulas permaneceram infundindo antagonista durante os 28 dias de tratamento, ou se não foram obstruídas pelo processo inflamatório.

Devido aos possíveis contratempos do método icv, realizamos também experimentos de administração periférica do antagonista de prolactina. Esse composto, assim como a própria prolactina, deve conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e, dessa forma, exercer sua função no SNC.

6.2 Balanço Energético

Roedores e humanos com mutações no gene da leptina (*ob/ob*) ou no receptor da leptina (*db/db*) são hiperfágicos e severamente obesos (145,146). Observamos que o consumo alimentar dos camundongos *ob/ob* machos foi semelhante entre os grupos, assim como o peso final dos animais após o período de tratamento não se alterou. Nesse sentido, nossos resultados corroboram estudos que mostraram que a utilização de bromocriptina em sujeitos obesos com DMT2 melhoram o controle glicêmico e a tolerância à glicose, sem causar alterações de peso ou da composição corporal (57). De certa forma, esse resultado confirma que a melhora do controle glicêmico não é um efeito secundário de alterações no peso corporal e adiposidade.

No entanto, apesar de não ter reduzido o peso final dos machos *ob/ob*, quando analisamos a média de ganho de peso diário em relação ao peso corporal

final, verificamos que animais tratados com Bromo, bem como os que tiveram a reposição de Prl, apresentaram menor ganho de peso, quando comparados aos animais Controle e Prl. Entretanto, isso não foi suficiente para alterar significativamente o peso final dos animais, uma vez que eles possuem obesidade mórbida.

Nas fêmeas, observamos, à semelhança dos machos, que o peso final foi semelhante entre os grupos. No entanto, contrariamente aos machos, foi observada redução do consumo alimentar no tratamento com bromocriptina e; na comparação pareada antes e após o tratamento, verificou-se que também o grupo com reposição de prolactina reduziu significativamente o seu consumo alimentar diário. Nesse sentido, a reposição com Prl não foi capaz de reverter esse quadro, e dados da literatura corroboram que a bromocriptina é capaz de reduzir a hiperfagia em animais obesos (147), e que esse efeito anorexígeno parece ser devido a sua ação sobre receptores D2 em níveis que não causam efeitos adversos no SNC (148). Dessa maneira, inferimos que o mecanismo pelo qual a Bromo deve causar alterações no consumo alimentar em fêmeas deve-se a efeitos diretos no receptor de dopamina, não sendo um efeito mediado pela prolactina.

Além disso, na análise da média do ganho de peso diário, as fêmeas de ambos os grupos tratados com Bromo apresentaram redução estatisticamente significativa em comparação aos grupos Controle e Prl. No entanto, vale ressaltar que o critério aceito pelo FDA para a aprovação de uma droga para tratamento da obesidade é de reduzir em pelo menos 5% o peso corporal (4), e nas fêmeas a redução de peso foi em média 2%, tornando esse tratamento pouco interessante para esse fim.

Outra questão importante a ser ressaltada no modelo experimental adotado é que a leptina é um hormônio que exerce papel fundamental no controle do comportamento alimentar, ao influenciar a atividade neuronal de vias efectoras centrais que controlam o balanço energético (32,138). Apesar de termos adotado o modelo *ob/ob* devido a seu fenótipo de resistência à insulina (138), a ausência da leptina funcional causa aumento exacerbado do consumo alimentar, que não é capaz de ser suficientemente amenizado pelo tratamento com Bromo. A falta de leptina não somente causa alteração no comportamento alimentar dos animais *ob/ob*, mas também causa outras alterações metabólicas, uma vez que mesmo quando restritos a uma dieta suficiente para manutenção do peso normal de

camundongos magros, eles desenvolvem obesidade (132). Poderíamos inferir que a bromocriptina não deve causar alterações em vias diretamente controladas pela leptina, o que explicaria ainda a falta de resposta em machos e a reduzida resposta no comportamento alimentar de fêmeas. E, mesmo existindo indícios de uma possível interação entre a prolactina e a leptina em fêmeas grávidas (121), como a Bromo diminui os níveis de prolactina, alterando a possível relação com a leptina, os animais *ob/ob* estariam ausentes de tal influência.

Na análise da expressão gênica do hipotálamo dos animais, constatamos que não houve alterações em diversos genes controladores do balanço energético, como receptor de estrógeno alfa (Ers-1), Agrp, Orexina (Hcrt), Cart e Npy. Esses dados condizem com o que foi observado no consumo alimentar, o qual não foi diferente entre os grupos.

No entanto, encontramos diferenças estatísticas nos genes *Mch* e *Pomc*, os quais regulam o controle alimentar, sendo o primeiro orexígeno e o segundo anorexígeno. O *Mch* foi mais expresso no grupo Bromo+Prl, embora não haja nenhuma evidência na literatura de relação entre a prolactina e a expressão desses genes. Sabe-se que a deleção desse gene em camundongos causa hipofagia e magreza (149). No entanto, a análise desse gene pode ter sido comprometida pelo modelo adotado, visto que ele é super-expresso em animais *ob/ob*, e o hormônio sintetizado por esse gene está envolvido com a homeostase glicêmica e o balanço energético (150). Uma vez que os neurônios MCH não expressam o receptor de leptina, essas são consideradas células de segunda-ordem influenciadas pela leptina. Já o *Pomc* foi menos expresso nos grupos tratados com bromocriptina, contrariamente ao que seria esperado, visto que os neuropeptídeos produzidos por esse pró-hormônio são críticos no controle glicêmico. Maior expressão de gene *Pomc* melhora a hiperfagia, diabetes e obesidade, via a qual está prejudicada em animais deficientes de leptina (151). Tratamento de ratos neonatais com bromocriptina geram padrões diferentes de expressão de *Pomc* no arqueado dependendo do período de injeção da droga, sendo que entre 11 e 20 dias de nascimento ela promoveu diminuição da expressão de *Pomc* (152). Em trabalho que analisou a ação da prolactina sobre a expressão gênica de *Pomc* no arqueado, ratas lactantes tratadas com bromocriptina não apresentaram alteração da expressão desse gene (153). Em cultura de células da hipófise de ratos, o tratamento com bromocriptina diminui significativamente a expressão gênica de

Pomc (154). Outro trabalho mostrou diferenças de padrão da expressão gênica de Pomc no arqueado e na hipófise quando animais eram submetidos ao tratamento com bromocriptina, sendo que no núcleo arqueado o tratamento aumentou a expressão gênica, e na hipófise a expressão foi diminuída (155).

6.3 Homeostase Glicêmica

A literatura tem mostrado que a bromocriptina apresenta efeitos benéficos sobre a hiperglicemia em modelos de animais obesos tratados com essa droga (53,51,54,55). Nossos dados mostraram que a bromocriptina melhora o desempenho glicêmico dos animais diabéticos, e que a reposição com prolactina reverte em parte esse quadro. Observamos, nos testes de tolerância à glicose, que as fêmeas tratadas com bromocriptina são mais tolerantes à glicose, e as que tiveram a reposição com prolactina tornaram-se tão intolerantes quanto as fêmeas Controle ou as Prl, mostrando uma reversão do efeito antidiabético da Bromo. Em machos, a reposição de prolactina em animais tratados com Bromo não reverteu a condição de maior tolerância à glicose causada pela droga.

Dessa maneira, é possível inferir que em fêmeas, a bromocriptina melhorou a ação da insulina endógena no sentido de torná-las mais tolerantes a altos níveis de glicose, e possivelmente o mecanismo pelo qual a droga agiu foi através da diminuição da liberação de prolactina, uma vez que, com a reposição desse hormônio, o efeito benéfico da droga foi anulado. Nesse sentido, nosso trabalho é corroborado por alguns trabalhos da literatura que sugeriram que a supressão das concentrações basais de Prl pela bromocriptina, em pacientes hiperprolactinêmicos, pode ter sido o principal fator que promoveu a melhoria da tolerância à glicose e normalização da liberação de insulina induzida por glicose (67,73,74). Podemos inferir que o medicamento melhorou a ação da insulina sem aumentar sua secreção, uma vez que observamos diminuição da insulina plasmática foi observada apenas em animais tratados com Bromo. Esse dado é corroborado pela literatura que mostra que a bromocriptina inibe a secreção de insulina induzida por glicose, prevenindo uma hipersecreção do hormônio a longo prazo, o que evita a falência das células beta-pancreáticas (156). Embora alguns trabalhos sugiram que parte dos efeitos metabólicos da bromocriptina sejam por ação direta da droga em receptores dopaminérgicos D2 presentes em células beta pancreáticas (157), propusemos que o efeito da droga pode ser também devido à

diminuição da liberação de prolactina. Nesse sentido, a diminuição da produção de insulina poderia condizer com a redução dos níveis de prolactina, uma vez que essa apresenta efeito hiperplásico das células beta, em condição de gravidez, por exemplo (158,159), bem como induz a expressão do gene da insulina, dependente ou não da glicose (160).

Nos testes de resistência à insulina, observamos que os machos tratados com bromocriptina foram mais sensíveis à ação do hormônio exógeno, e que a reposição com prolactina reverteu essa condição. Nas fêmeas, o tratamento com a Bromo apresentou uma tendência de melhora da resistência à insulina, situação que foi revertida no grupo com reposição de prolactina. Parece plausível interpretar que o medicamento deve agir sobre a via da insulina, favorecendo a sensibilidade da mesma, o que leva aos efeitos antidiabéticos da droga. Nesse sentido, a reposição com prolactina, ao reverter essa condição, mostra que a prolactina pode ter um efeito prejudicial sobre a via da insulina. E de fato, quando em níveis elevados, a prolactina está associada a uma redução da ligação da insulina ao seu receptor, seja por diminuição do número de receptores, seja pela redução da afinidade (69). Esses dados corroboram nossa hipótese inicial, indicando que parte dos efeitos antidiabéticos da bromocriptina é dependente da diminuição dos níveis de prolactina circulantes.

A análise da expressão gênica do hipotálamo não revelou possíveis mecanismos pelos quais a bromocriptina deve atuar sobre o controle glicêmico. Analisamos subunidades dos canais dependentes de ATP, os quais, quando ativados em neurônios do hipotálamo mediobasal, diminuem a glicemia através da inibição da gliconeogênese (36). Dentre os genes relacionados às subunidades, como SUR-1, SUR-2, Kir 6.1 e Kir 6.2, apenas encontramos diferença de expressão do gene que codifica a subunidade SUR-1, sendo essa menos expressa no grupo tratado com bromocriptina. No entanto, não analisamos qualquer tipo de atividade elétrica desses canais, e uma das maneiras pelas quais o hipotálamo deve controlar a glicemia periféricamente pode ser por meio de ativação ou inibição aguda dos canais, por ação de hormônios. A leptina, por exemplo, é capaz de inibir esses canais (161), enquanto a insulina os ativa, o que inibe a gliconeogênese (162). No entanto, classicamente é sugerido outro mecanismo pelo qual o SNC deve regular o controle glicêmico periféricamente, através de conexões diretas do núcleo

paraventricular do hipotálamo com o complexo dorso-vagal, que inervam as ilhotas pancreáticas (163). Esse tipo de análise foge do escopo do presente trabalho.

A análise de Western Blotting, embora diferente em machos e em fêmeas, sugeriu que animais tratados com Bromocriptina apresentam maior sensibilidade à insulina, uma vez que algumas proteínas da via da insulina apresentam-se fosforiladas em maior quantidade em comparação aos animais do mesmo grupo sem o desafio com a esse hormônio. Em machos, a maior sensibilidade foi apresentada pela fosforilação da AKT no fígado, e nas fêmeas houve maior fosforilação da AKT no músculo, além de tendência à maior fosforilação do receptor de insulina no músculo, não somente em fêmeas tratadas com bromocriptina, mas também nas que receberam reposição de prolactina.

No entanto, esses dados não são uma comprovação final de que o tratamento com Bromo aumentou a sensibilidade à insulina, e a reposição com prolactina reverteu essa condição. Acreditamos que o pequeno número de animais que foram submetidos às quantificações proteicas tenha contribuído para esses dados inconclusivos.

6.4 Antagonista do Receptor de Prolactina

A ação da Bromocriptina em diminuir a produção e liberação de prolactina abre a possibilidade do desenvolvimento de um novo tratamento para o DMT2, com antagonistas do receptor de prolactina. Esses, supostamente, poderiam ser mais específicos sobre o controle glicêmico, comparados à Bromocriptina, por afetarem menos sistemas fisiológicos, e consequentemente minimizariam os efeitos colaterais.

A Bromo, por ser um agonista do receptor de dopamina D2, pode agir sobre uma variedade de sistemas no SNC, uma vez que ela atua tal como a dopamina na locomoção, cognição, comportamento alimentar, homeostase energética, motivação comportamental, recompensa, memória, humor, aprendizado e secreção hormonal (164). Dessa maneira, os antagonistas do receptor de prolactina seriam interessantes alternativas para o tratamento da DMT2, por agirem mais especificamente sobre o controle glicêmico, evitando efeitos sobre outros sistemas.

Antagonistas do receptor de prolactina são uma nova classe de moléculas com potencial terapêutico para patologias como câncer de mama, prolactinomas resistentes a tratamento com dopamina, câncer de próstata, dentre outros (165). As

estruturas dos antagonistas compreendem a própria molécula de prolactina, mas com mutações específicas que as tornam agonistas inversos do receptor endógeno. Assim, é necessário o uso do antagonista em excesso molar em comparação à prolactina endógena para serem observados efeitos significativos (165). No entanto, uma dificuldade apresentada pelos antagonistas do receptor de prolactina é que, dependendo da dose, podem possuir atividade agonista residual (166). Dessa forma, deve-se ter em mente que é necessário o desenvolvimento de antagonistas específicos, que mesmo em alta dose, não atuem como agonistas.

Outro ponto a ser ressaltado é que alguns antagonistas não são exclusivos do receptor de prolactina, podendo também antagonizar, por exemplo, o receptor de GH. Por exemplo, o G120K-hGH é um potente antagonista tanto de receptor de GH como de receptor de Prl, mas seu potencial clínico é limitado (89), uma vez que ele pode causar outros efeitos na via do GH. Outros antagonistas já estudados são o G129R-hPRL (apresenta substituição de glicina da posição 129 por arginina), S179D-hPRL (substitui a serina na posição 179 por ácido aspártico), Δ 41-51-hPRL (deleções dos aminoácidos 41 a 51), Δ 1-9-G129R-hPRL e Δ 1-14-G129R-hPRL (deleções de 9 e 14 resíduos N-terminais) bem como substituição do resíduo 129 (39,89,91,90).

Adotamos, na presente tese, o antagonista G129R-hPrl para estudarmos seus efeitos sobre o controle glicêmico, por se tratar de um antagonista primordialmente do receptor de prolactina. Alguns testes também foram feitos com o antagonista G120K-hGH, mas os resultados foram inconclusivos (dados não foram mostrados na presente tese).

A administração do antagonista G129R-hPrl, tanto central quanto periféricamente, não alterou significativamente a tolerância à glicose e à insulina, quando analisada a área sob a curva da glicemia. Contudo, pudemos observar uma evidente tendência de maior tolerância à glicose dos animais com tratamento periférico do antagonista, em comparação aos seus controles. Também, ao analisarmos as curvas, ponto a ponto, pudemos ver que a partir de 60 minutos após a administração de glicose, os animais tratados com antagonista periférico apresentam redução da glicemia em comparação aos camundongos controles. No teste de tolerância à insulina, observamos que, embora a curva glicêmica dos animais tratados com o antagonista tenha ficado ligeiramente menor em relação aos controles, eles não apresentaram diferença estatística. Na administração central, o

GTT apenas apontou para uma curva ligeiramente reduzida de glicemia dos animais tratados com antagonista, mas no ITT esses animais apresentaram valores glicêmicos menores e significativos em comparação aos controles.

O que interpretamos desses dados é que os tratamentos, tanto periféricos quanto centrais, possuem uma potencial melhora do controle glicêmico dos animais *ob/ob*. No entanto, alguns dados não foram comprovados em testes estatísticos possivelmente por motivos como: número insuficiente de animais por grupo, característica de grande variabilidade glicêmica entre os animais *ob/ob*, dificuldade de comprovação da eficácia do tratamento no SNC e dificuldade de ajuste da dose de antagonista a ser administrada. Todos esses fatores foram complicadores que podem ter contribuído para a falta de comprovação estatística dos testes. No entanto, acreditamos que os antagonistas de prolactina podem ter efeitos antidiabéticos e futuros experimentos devem ser conduzidos em busca de comprovações do uso deles como medicamentos em potencial.

6.5 Interação entre Prolactina e Receptor de Estrógeno alfa

Para investigarmos de que maneira a redução da prolactinemia pode causar os efeitos antidiabéticos do tratamento com Bromocriptina, estudamos uma possível interação da Prl com o ER α . Baixos níveis de estrógeno em mulheres na menopausa ou fêmeas ovariectomizadas desencadeiam obesidade e resistência à insulina (111,112), bem como o silenciamento do ER α no VMH de camundongos causa ganho de peso e resistência à insulina (113). Fenotipicamente, esse quadro assemelha-se ao que é observado em indivíduos com hiperprolactinemia, os quais apresentam ganho de peso, resistência à insulina e reduzida tolerância à glicose (67,70). Portanto, estudar a interação entre esses hormônios e as regiões cerebrais nas quais elas provavelmente ocorrem pode dar indícios das possíveis funções biológicas reguladas por eles. Além disso, podemos inferir se os efeitos causados pela prolactina no metabolismo são através da interação com o ER α .

Por exemplo, as interações entre prolactina e estrógenos são importantes para diversos comportamentos sociais. Estrógenos controlam o comportamento maternal ao estimularem centralmente a liberação de prolactina via receptores dependentes de estrógeno (167–169). Sabe-se que a região pré-óptica é essencial para a interação entre esses hormônios nesse comportamento. (167,169–173).

Primeiramente buscamos por evidências anatômicas da interação entre a prolactina e o ER α , analisando a presença de RNAm do ER α em neurônios que são responsivos à prolactina (expressão de pSTAT5 induzida pela prolactina). Encontramos duplas marcações principalmente em regiões como AVPV, MPN, ARH, VMHvl, MeApd e NTS. VMHvl e MeApd são regiões sabidamente importantes para comportamentos inatos (174). AVPV e ARH são núcleos hipotalâmicos que regulam os eixos reprodutivos e neuroendócrinos e são as mesmas áreas que possuem os neurônios Kisspeptina que possuem imunorreatividade ao ER α (119) e expressam RNAm de PrIR (175,176). Além disso, VMHvl e ARH são regiões classicamente relacionadas ao controle do metabolismo e da homeostase glicêmica. Portanto, demonstramos que existe a possibilidade de interação entre prolactina e ER α em regiões importantes para o controle metabólico que podem indicar possível forma pela qual a Prl atua sobre o controle do metabolismo.

Em seguida, analisamos se a interação entre os hormônios é funcional, e detectamos que a presença de estrógeno é importante para a responsividade das células à Prl, uma vez que as fêmeas ovariectomizadas apresentaram menor marcação para o pSTAT5 induzido por estímulo agudo de prolactina. Esses dados corroboram estudos prévios, os quais mostraram que camundongos ovariectomizados tratados com estrógeno são significativamente mais responsivos à prolactina comparados aos camundongos ovariectomizados sem tratamento (106). Isso pode indicar que de fato, além da presença do ER α nas células responsivas à Prl, existe uma relação de causa e efeito entre esses dois hormônios.

Na tentativa de estudarmos o efeito da prolactina sobre a expressão do ER α , realizamos experimentos com administração de Prolactina e análise do grau de expressão do RNAm do ER α no VMH, através da técnica de hibridização *in situ*. Nesse experimento, no entanto, para padronizarmos o sistema reprodutivo das fêmeas, realizamos previamente ovariectomia, e posteriormente fizemos o tratamento com a Prl. Esperávamos que a prolactina diminuísse a expressão do ER α no VMH, e dessa maneira prejudicasse o controle glicêmico hipotalâmico. No entanto, não obtivemos resultados significativamente diferentes entre os grupos. Possivelmente a ovariectomia diminuiu a sensibilidade das células à ação a prolactina, e esse fator prejudicou a análise de marcação do RNAm do ER α . Esse problema poderia ter sido evitado utilizando cânulas de reposição de estrógeno, de

forma a manter os níveis padronizados entre as fêmeas (177). Outra questão foi a pequena amostragem experimental utilizada ($n=5$), a qual não deve ter sido suficiente para detectarmos diferença significativa entre os grupos. Também, para a realização da técnica de hibridização *in situ*, escolhemos um número limitado de séries para simbolizar os níveis rostrais e caudais do VMHvl. Por se tratar de uma técnica complexa, utilizamos poucos cortes encefálicos de cada animal, o que pode ter prejudicado a detecção de diferenças entre os grupos analisados. Dessa maneira, os resultados foram inconclusivos, e ficamos sem responder se foi um problema metodológico que impediu que observássemos efeitos do tratamento com Prl na expressão de ER α .

Por fim, para investigarmos se a presença de estrógeno é necessária para que a Bromo apresente seus efeitos antidiabéticos, realizamos tratamentos em fêmeas Sham e OVX. As fêmeas OVX, antes dos tratamentos, apresentaram maior área sob a curva nos testes de GTT e ITT, indicando prejuízo no controle glicêmico. No entanto, após o tratamento, os resultados foram diferentes para o teste de tolerância à glicose e de resistência à insulina. Enquanto no GTT as fêmeas tratadas com Bromo mostraram-se tolerantes à glicose, tal como fêmeas Sham Bromo, no ITT o tratamento com a bromocriptina não diminuiu a resistência à insulina dessas fêmeas, as quais mantiveram ASC semelhante às OVX Controle. Nesse sentido, a presença de estrógeno parece ser necessária para que a bromocriptina possa aumentar a sensibilidade à insulina, quando essa é aumentada, mas não é necessária para o aumento de eficiência na captação de glicose pelo animal quando esse utiliza-se da própria insulina endógena. Vale ressaltar aqui que, estranhamente, as fêmeas OVX não mantiveram o padrão de intolerância à glicose que apresentavam no momento basal, visto que OVX Controles não tiveram diferença de ASC em relação às Sham Controle. Nesse sentido, a análise desse teste torna-se menos sensível do que havíamos inicialmente previsto. Outra questão metodológica é o fato das fêmeas Sham não apresentarem resistência à insulina, como apresentam as fêmeas OVX, dificultando a interpretação do tratamento com a Bromo, uma vez que essa droga não causa efeitos hipoglicemiantes em animais com condições normais.

7 CONCLUSÃO

Podemos inferir, por meio dos dados aqui apresentados, que parte dos efeitos antidiabéticos da Bromocriptina é devido à diminuição dos níveis basais de prolactina sérica. A Bromo não mostrou-se satisfatória para ser utilizada como tratamento contra a obesidade em nosso protocolo, uma vez que não promoveu perda de peso maior que 5%. Os efeitos dos antagonistas de prolactina em melhorar o controle glicêmico são promissores, mas ainda é necessário avaliar a viabilidade da produção destes para uso comercial, e estudar os possíveis efeitos colaterais de um tratamento com essa droga, bem como aumentar a amostragem experimental ou mesmo avaliar seus efeitos em outros modelos experimentais (por exemplo, em animais consumindo dieta hiperlipídica). Sugere-se que a ação da prolactina sobre o controle glicêmico tenha alguma relação com o receptor de estrógeno alfa, embora não tenhamos conseguido elaborar um modelo experimental que pudesse comprovar que o efeito da bromocriptina é dependente do ER α . Em geral, nossos dados avançaram no estudo de novas terapiaais em potencial que poderão ser utilizadas no futuro para o tratamento do DMT2.

REFERÊNCIAS¹

1. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 27 de abril de 1978;272(5656):827–9.
2. Marks JL, Porte D, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. dezembro de 1990;127(6):3234–6.
3. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 14 de dezembro de 2006;444(7121):860–7.
4. Dietrich MO, Horvath TL. Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. *Nat Rev Drug Discov*. setembro de 2012;11(9):675–91.
5. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 9 de janeiro de 2008;582(1):97–105.
6. Pedersen DJ, Guilherme A, Danai LV, Heyda L, Matevossian A, Cohen J, et al. A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation. *Mol Metab*. julho de 2015;4(7):507–18.
7. Powell AG, Apovian CM, Aronne LJ. New drug targets for the treatment of obesity. *Clin Pharmacol Ther*. julho de 2011;90(1):40–51.
8. Friedman JM. A war on obesity, not the obese. *Science*. 7 de fevereiro de 2003;299(5608):856–8.
9. Davidson MB. *Diabetes Mellitus. Diagnosis and Treatment*. 4th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. 449 p.
10. Shivaprasad C, Kalra S. Bromocriptine in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*. julho de 2011;15(Suppl 1):S17-S24.
11. Tattersall, RB. The History of Diabetes Mellitus. In: Holt, R.I.G., Cockram, C.S., Flyvbjerg, A., Goldstein, BJ. *Textbook of diabetes*. 4th edition. Oxford: Wiley- Blackwell, 2010. 1132 p.
12. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2005;65(3):385–411.
13. Corathers SD, Peavie S, Salehi M. Complications of diabetes therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. dezembro de 2013;42(4):947–70.
14. Wong AKF, Struthers AD, Choy AMJ, Lang CC. Insulin sensitization therapy and the heart: focus on metformin and thiazolidinediones. *Heart Fail Clin*. outubro de 2012;8(4):539–50.
15. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med*. 31 de agosto de 1995;333(9):541–9.
16. Chiasson JL, Josse RG, Hunt JA, Palmason C, Rodger NW, Ross SA, et al. The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial. *Ann Intern Med*. 15 de dezembro de 1994;121(12):928–35.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from : <http://www.icmje.org>

17. Gionfriddo MR, Morey-Vargas OL, Brito JP, Leppin AL, Murad MH, Montori VM. Systematic reviews to ascertain the safety of diabetes medications. *Curr Diab Rep.* abril de 2014;14(4):478.
18. Li Y, Hu Y, Ley SH, Rajpathak S, Hu FB. Sulfonylurea use and incident cardiovascular disease among patients with type 2 diabetes: prospective cohort study among women. *Diabetes Care.* novembro de 2014;37(11):3106–13.
19. Varas-Lorenzo C, Margulis AV, Pladevall M, Riera-Guardia N, Calingaert B, Hazell L, et al. The risk of heart failure associated with the use of noninsulin blood glucose-lowering drugs: systematic review and meta-analysis of published observational studies. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:129.
20. Oyer DS. The science of hypoglycemia in patients with diabetes. *Curr Diabetes Rev.* maio de 2013;9(3):195–208.
21. Strugaru A-M, Botnariu G, Agoroaei L, Grigoriu I-C, Butnaru E. Metformin induced lactic acidosis--particularities and course. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* dezembro de 2013;117(4):1035–42.
22. Cone CJ, Bachyrycz AM, Murata GH. Hepatotoxicity associated with metformin therapy in treatment of type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Pharmacother.* outubro de 2010;44(10):1655–9.
23. Hashmi T. Probable hepatotoxicity associated with the use of metformin in type 2 diabetes. *BMJ Case Rep.* 2011;2011.
24. Zheng L. Metformin as a Rare Cause of Drug-Induced Liver Injury, a Case Report and Literature Review. *Am J Ther.* fevereiro de 2016;23(1):e315-e17.
25. Hernandez AV, Usmani A, Rajamanickam A, Moheet A. Thiazolidinediones and risk of heart failure in patients with or at high risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis and meta-regression analysis of placebo-controlled randomized clinical trials. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2011;11(2):115–28.
26. Breunig IM, Shaya FT, McPherson ML, Snitker S. Development of heart failure in Medicaid patients with type 2 diabetes treated with pioglitazone, rosiglitazone, or metformin. *J Manag Care Spec Pharm.* setembro de 2014;20(9):895–903.
27. Lecka-Czernik B. Safety of Anti-Diabetic Therapies on Bone. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 1º de março de 2013;11(1):49–58.
28. Dagan A, Dagan B, Segal G. [SGLT2 inhibitors: a new therapeutic class for the treatment of type 2 diabetes mellitus]. *Harefuah.* março de 2015;154(3):200–3.
29. Filippatos TD, Panagiotopoulou TV, Elisaf MS. Adverse Effects of GLP-1 Receptor Agonists. *Rev Diabet Stud.* Fall-Winter de 2014;11(3–4):202–30.
30. Donato J. The central nervous system as a promising target to treat diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(19):2070–81.
31. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci.* outubro de 2012;15(10):1350–5.
32. Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr.* abril de 1999;69(4):584–96.
33. Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* janeiro de 2005;1(1):63–72.

34. Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, et al. Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab.* 7 de abril de 2010;11(4):286–97.
35. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang C-Y, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature.* 13 de setembro de 2007;449(7159):228–32.
36. Pocai A, Lam TKT, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature.* 21 de abril de 2005;434(7036):1026–31.
37. Ramadori G, Fujikawa T, Fukuda M, Anderson J, Morgan DA, Mostoslavsky R, et al. SIRT1 deacetylase in POMC neurons is required for homeostatic defenses against diet-induced obesity. *Cell Metab.* 7 de julho de 2010;12(1):78–87.
38. Vianna CR, Coppari R. A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology.* janeiro de 2011;152(1):11–8.
39. Chen TJ, Kuo CB, Tsai KF, Liu JW, Chen DY, Walker AM. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology.* fevereiro de 1998;139(2):609–16.
40. Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes.* fevereiro de 1995;44(2):147–51.
41. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 22 de setembro de 2000;289(5487):2122–5.
42. Koch L, Wunderlich FT, Seibler J, Könnert AC, Hampel B, Irlenbusch S, et al. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *J Clin Invest.* junho de 2008;118(6):2132–47.
43. Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest.* outubro de 2001;108(8):1113–21.
44. de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, Elmquist JK, Lee C, Kilimann MW, et al. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest.* dezembro de 2005;115(12):3484–93.
45. Kowalski TJ, Liu SM, Leibel RL, Chua SC. Transgenic complementation of leptin-receptor deficiency. I. Rescue of the obesity/diabetes phenotype of LEPR-null mice expressing a LEPR-B transgene. *Diabetes.* fevereiro de 2001;50(2):425–35.
46. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* 25 de setembro de 1997;389(6649):374–7.
47. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 10 de janeiro de 1997;88(1):131–41.
48. Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L. Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest.* outubro de 2001;108(7):1079–85.
49. Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, Zhou J, Marks DL, Cone RD. The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology.* setembro de 2000;141(9):3072–9.

50. Valiquette G. Bromocriptine for diabetes mellitus type II. *Cardiol Rev.* dezembro de 2011;19(6):272–5.
51. Liang Y, Lubkin M, Sheng H, Scislowski PW, Cincotta AH. Dopamine agonist treatment ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia, and the elevated basal insulin release from islets of ob/ob mice. *Biochim Biophys Acta.* 21 de outubro de 1998;1405(1–3):1–13.
52. Liang Y, Jetton TL, Lubkin M, Meier AH, Cincotta AH. Bromocriptine/SKF38393 ameliorates islet dysfunction in the diabetic (db/db) mouse. *Cell Mol Life Sci.* julho de 1998;54(7):703–11.
53. Cincotta AH, Tozzo E, Scislowski PW. Bromocriptine/SKF38393 treatment ameliorates obesity and associated metabolic dysfunctions in obese (ob/ob) mice. *Life Sci.* 1997;61(10):951–6.
54. Scislowski PW, Tozzo E, Zhang Y, Phaneuf S, Prevelige R, Cincotta AH. Biochemical mechanisms responsible for the attenuation of diabetic and obese conditions in ob/ob mice treated with dopaminergic agonists. *Int J Obes Relat Metab Disord.* abril de 1999;23(4):425–31.
55. Zhang Y, Scislowski PW, Prevelige R, Phaneuf S, Cincotta AH. Bromocriptine/SKF38393 treatment ameliorates dyslipidemia in ob/ob mice. *Metab Clin Exp.* agosto de 1999;48(8):1033–40.
56. Cincotta null, Meier null, Cincotta Jr null. Bromocriptine improves glycaemic control and serum lipid profile in obese Type 2 diabetic subjects: a new approach in the treatment of diabetes. *Expert Opin Investig Drugs.* outubro de 1999;8(10):1683–707.
57. Pijl H, Ohashi S, Matsuda M, Miyazaki Y, Mahankali A, Kumar V, et al. Bromocriptine: a novel approach to the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* agosto de 2000;23(8):1154–61.
58. Chamarthi B, Gaziano JM, Blonde L, Vinik A, Scranton RE, Ezrokhi M, et al. Timed Bromocriptine-QR Therapy Reduces Progression of Cardiovascular Disease and Dysglycemia in Subjects with Well-Controlled Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res.* 2015;2015:157698.
59. Holt RIG, Barnett AH, Bailey CJ. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. *Diabetes Obes Metab.* dezembro de 2010;12(12):1048–57.
60. Luo S, Meier AH, Cincotta AH. Bromocriptine reduces obesity, glucose intolerance and extracellular monoamine metabolite levels in the ventromedial hypothalamus of Syrian hamsters. *Neuroendocrinology.* julho de 1998;68(1):1–10.
61. Bina KG, Cincotta AH. Dopaminergic agonists normalize elevated hypothalamic neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone, body weight gain, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Neuroendocrinology.* janeiro de 2000;71(1):68–78.
62. Pffaf DW. *Hormones, brain and Behavior.* 2nd edition. New York: Academic Press; 1996. 4393 p.
63. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* junho de 1998;19(3):225–68.
64. Grattan DR. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol.* agosto de 2015;226(2):T101–122.
65. Fitzgerald P, Dinan TG. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol (Oxford).* março de 2008;22(2 Suppl):12–9.
66. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab.* abril de 2006;17(3):110–6.
67. Landgraf R, Landraf-Leurs MM, Weissmann A, Hörl R, von Werder K, Scriba PC. Prolactin: a diabetogenic hormone. *Diabetologia.* abril de 1977;13(2):99–104.

68. Johnston DG, Alberti KG, Nattrass M, Burrin JM, Blesa-Malpica G, Hall K, et al. Hyperinsulinaemia in hyperprolactinaemic women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. outubro de 1980;13(4):361–8.
69. Schernthaner G, Prager R, Punzengruber C, Luger A. Severe hyperprolactinaemia is associated with decreased insulin binding in vitro and insulin resistance in vivo. *Diabetologia*. março de 1985;28(3):138–42.
70. Tuzcu A, Yalaki S, Arikan S, Gokalp D, Bahcec M, Tuzcu S. Evaluation of insulin sensitivity in hyperprolactinemic subjects by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique. *Pituitary*. 2009;12(4):330–4.
71. Pelkonen R, Nikkilä EA, Grahne B. Serum lipids, postheparin plasma lipase activities and glucose tolerance in patients with prolactinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. abril de 1982;16(4):383–90.
72. Berinder K, Nyström T, Höybye C, Hall K, Hulting A-L. Insulin sensitivity and lipid profile in prolactinoma patients before and after normalization of prolactin by dopamine agonist therapy. *Pituitary*. setembro de 2011;14(3):199–207.
73. Gnudi A, Lugari R, Cavazzini MG. Variation of blood glucose and serum growth hormone, prolactin and insulin in subjects with insulin-dependent diabetes, after OGTT and pretreatment with 2-Br-alpha-ergocryptine. *Acta Diabetol Lat*. agosto de 1977;14(3–4):119–28.
74. Barnett AH, Chapman C, Gailer K, Hayter CJ. Effect of bromocriptine on maturity onset diabetes. *Postgrad Med J*. janeiro de 1980;56(651):11–4.
75. Greenman Y, Tordjman K, Stern N. Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. maio de 1998;48(5):547–53.
76. Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Dieguez C, Casanueva F, et al. Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *Eur J Endocrinol*. julho de 2002;147(1):77–84.
77. Serri O, Li L, Mamputu J-C, Beauchamp M-C, Maingrette F, Renier G. The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. abril de 2006;64(4):366–70.
78. Delgrange E, Donckier J, Maiter D. Hyperprolactinaemia as a reversible cause of weight gain in male patients? *Clin Endocrinol (Oxf)*. fevereiro de 1999;50(2):271.
79. Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS, Horwitz BA. Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am J Physiol*. janeiro de 1989;256(1 Pt 2):R276–R80.
80. Sauv D, Woodside B. The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding regimen. *Brain Res*. 5 de agosto de 1996;729(1):75–81.
81. Sauv D, Woodside B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res*. 23 de junho de 2000;868(2):306–14.
82. Naef L, Woodside B. Prolactin/Leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology*. dezembro de 2007;148(12):5977–83.
83. Buntin JD, Figge GR. Prolactin and growth hormone stimulate food intake in ring doves. *Pharmacol Biochem Behav*. novembro de 1988;31(3):533–40.
84. Hnasko RM, Buntin JD. Functional mapping of neural sites mediating prolactin-induced hyperphagia in doves. *Brain Res*. 1 de outubro de 1993;623(2):257–66.

85. Li C, Kelly PA, Buntin JD. Inhibitory effects of anti-prolactin receptor antibodies on prolactin binding in brain and prolactin-induced feeding behavior in ring doves. *Neuroendocrinology*. fevereiro de 1995;61(2):125–35.
86. Henderson DC. Schizophrenia and comorbid metabolic disorders. *J Clin Psychiatry*. 2005;66 Suppl 6:11–20.
87. Henderson DC, Doraiswamy PM. Prolactin-related and metabolic adverse effects of atypical antipsychotic agents. *J Clin Psychiatry*. 2008;69 Suppl 1:32–44.
88. Amiel JM, Mangurian CV, Ganguli R, Newcomer JW. Addressing cardiometabolic risk during treatment with antipsychotic medications. *Curr Opin Psychiatry*. novembro de 2008;21(6):613–8.
89. Soares CRJ, Glezer A, Okazaki K, Ueda EKM, Heller SR, Walker AM, et al. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif*. agosto de 2006;48(2):182–94.
90. DePalatis L, Almgren CM, Patmastan J, Troyer M, Woodrich T, Brooks CL. Structure and function of a new class of human prolactin antagonists. *Protein Expr Purif*. agosto de 2009;66(2):121–30.
91. Goffin V, Bernichtein S, Kayser C, Kelly PA. Development of new prolactin analogs acting as pure prolactin receptor antagonists. *Pituitary*. setembro de 2003;6(2):89–95.
92. Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Wiklund J, Wertz N, Gorski J. Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Adv Exp Med Biol*. 1981;138:151–63.
93. Takahashi S, Okazaki K, Kawashima S. Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell Tissue Res*. 1984;235(3):497–502.
94. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. Role of estrogen receptor- α in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol*. junho de 1997;11(6):674–81.
95. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N. Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol*. 15 de julho de 2005;239(1–2):27–36.
96. Kansra S, Chen S, Bangaru MLY, Sneade L, Dunckley JA, Ben-Jonathan N. Selective estrogen receptor down-regulator and selective estrogen receptor modulators differentially regulate lactotroph proliferation. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10060.
97. Nolan LA, Levy A. The trophic effects of oestrogen on male rat anterior pituitary lactotrophs. *J Neuroendocrinol*. maio de 2009;21(5):457–64.
98. De Lean A, Labrie F. Sensitizing effect of treatment with estrogens on TSH response to TRH in male rats. *Am J Physiol*. setembro de 1977;233(3):E235–E39.
99. Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science*. 9 de junho de 1978;200(4346):1173–5.
100. West B, Dannies PS. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. *Endocrinology*. abril de 1980;106(4):1108–13.
101. Demarest KT, Riegle GD, Moore KE. Long-term treatment with estradiol induces reversible alterations in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: a decreased responsiveness to prolactin. *Neuroendocrinology*. setembro de 1984;39(3):193–200.

102. Arita J, Kimura F. Direct inhibitory effect of long term estradiol treatment on dopamine synthesis in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: in vitro studies using hypothalamic slices. *Endocrinology*. agosto de 1987;121(2):692–8.
103. DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME. Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res*. 6 de outubro de 2000;879(1–2):139–47.
104. Morel GR, Carón RW, Cónsole GM, Soaje M, Sosa YE, Rodríguez SS, et al. Estrogen inhibits tuberoinfundibular dopaminergic neurons but does not cause irreversible damage. *Brain Res Bull*. 16 de dezembro de 2009;80(6):347–52.
105. Lerant A, Freeman ME. Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res*. 17 de agosto de 1998;802(1–2):141–54.
106. Anderson GM, Kieser DC, Steyn FJ, Grattan DR. Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology*. abril de 2008;149(4):1562–70.
107. Pi X, Zhang B, Li J, Voogt JL. Promoter usage and estrogen regulation of prolactin receptor gene in the brain of the female rat. *Neuroendocrinology*. março de 2003;77(3):187–97.
108. Frasor J, Park K, Byers M, Telleria C, Kitamura T, Yu-Lee LY, et al. Differential roles for signal transducers and activators of transcription 5a and 5b in PRL stimulation of ERalpha and ERbeta transcription. *Mol Endocrinol*. dezembro de 2001;15(12):2172–81.
109. Frasor J, Gibori G. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol Metab*. abril de 2003;14(3):118–23.
110. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev*. junho de 2013;34(3):309–38.
111. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. junho de 2003;88(6):2404–11.
112. Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. maio de 2009;150(5):2161–8.
113. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang X-J, Clegg DJ, et al. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13 de fevereiro de 2007;104(7):2501–6.
114. Xu Y, Nedungadi TP, Zhu L, Sobhani N, Irani BG, Davis KE, et al. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab*. 5 de outubro de 2011;14(4):453–65.
115. Furigo IC, Kim KW, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, de Alencar A, Pedroso JAB, et al. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. *Brain Res*. 30 de maio de 2014;1566:47–59.
116. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. dezembro de 2001;25(4):402–8.
117. Santollo J, Wiley MD, Eckel LA. Acute activation of ER alpha decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. dezembro de 2007;293(6):R2194–R201.

118. Donato J, Frazão R, Fukuda M, Vianna CR, Elias CF. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. *Endocrinology*. novembro de 2010;151(11):5415–27.
119. Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J, Atkin S, Bookout AL, et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*. 26 de janeiro de 2011;173:37–56.
120. Brown RSE, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR. Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol*. 1º de janeiro de 2010;518(1):92–102.
121. Nagaishi VS, Cardinali LI, Zampieri TT, Furigo IC, Metzger M, Donato J. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience*. 14 de fevereiro de 2014;259:71–83.
122. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 9 de fevereiro de 1996;84(3):491–5.
123. DeFalco J, Tomishima M, Liu H, Zhao C, Cai X, Marth JD, et al. Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science*. 30 de março de 2001;291(5513):2608–13.
124. Borges B de C, Rorato RC, Uchoa ET, Marangon PB, Elias CF, Antunes-Rodrigues J, et al. Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1º de janeiro de 2015;308(1):E40–E50.
125. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. março de 1978;14(3):141–8.
126. Stoehr JP, Byers JE, Clee SM, Lan H, Boronenkov IV, Schueler KL, et al. Identification of major quantitative trait loci controlling body weight variation in ob/ob mice. *Diabetes*. janeiro de 2004;53(1):245–9.
127. Coleman DL, Hummel KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia*. agosto de 1973;9(4):287–93.
128. Ewart-Toland A, Mounzih K, Qiu J, Chehab FF. Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology*. fevereiro de 1999;140(2):732–8.
129. Herberg L, Kley HK. Adrenal function and the effect of a high-fat diet on C57BL/6J and C57BL/6J-ob/ob mice. *Horm Metab Res*. setembro de 1975;7(5):410–5.
130. Ding C, Guo J, Su Z. The status of research into resistance to diet-induced obesity. *Horm Metab Res*. junho de 2015;47(6):404–10.
131. Choi J-Y, McGregor RA, Kwon E-Y, Kim YJ, Han Y, Park JHY, et al. The metabolic response to a high-fat diet reveals obesity-prone and -resistant phenotypes in mice with distinct mRNA-seq transcriptome profiles. *Int J Obes (Lond)*. 28 de junho de 2016 [In press].
132. [Internet]. The Jackson Laboratory. [citado 6 de agosto de 2016]. Disponível em: <https://www.jax.org/search>
133. Trask AJ, Delbin MA, Katz PS, Zanesco A, Lucchesi PA. Differential coronary resistance microvessel remodeling between type 1 and type 2 diabetic mice: impact of exercise training. *Vascul Pharmacol*. dezembro de 2012;57(5–6):187–93.
134. Sun J, Fu X, Liu Y, Wang Y, Huo B, Guo Y, et al. Hypoglycemic effect and mechanism of honokiol on type 2 diabetic mice. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:6327–42.

135. Liu R, Wang H, Xu B, Chen W, Turlova E, Dong N, et al. Cerebrovascular safety of sulfonylureas: the role of KATP channels in neuroprotection and the risk of stroke in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 13 de maio de 2016; [In press].
136. Du J-Y, Yuan F, Zhao L-Y, Zhu J, Huang Y-Y, Zhang G-S, et al. Suppression of Kv1.5 protects against endothelial apoptosis induced by palmitate and in type 2 diabetes mice. *Life Sci*. 4 de janeiro de 2016; [In press].
137. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*. julho de 1979;59(3):719–809.
138. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1º de dezembro de 1994;372(6505):425–32.
139. Ku SK, Sung SH, Choung JJ, Choi J-S, Shin YK, Kim JW. Anti-obesity and anti-diabetic effects of a standardized potato extract in ob/ob mice. *Exp Ther Med*. julho de 2016;12(1):354–64.
140. Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N, Kelly P. Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology*. fevereiro de 2001;142(2):532–7.
141. Perez Millan MI, Luque GM, Ramirez MC, Noain D, Ornstein AM, Rubinstein M, et al. Selective disruption of dopamine D2 receptors in pituitary lactotrobes increases body weight and adiposity in female mice. *Endocrinology*. março de 2014;155(3):829–39.
142. Ramirez MC, Ornstein AM, Luque GM, Perez Millan MI, Garcia-Tornadu I, Rubinstein M, et al. Pituitary and brain dopamine D2 receptors regulate liver gene sexual dimorphism. *Endocrinology*. março de 2015;156(3):1040–51.
143. Luo S, Liang Y, Cincotta AH. Intracerebroventricular administration of bromocriptine ameliorates the insulin-resistant/glucose-intolerant state in hamsters. *Neuroendocrinology*. março de 1999;69(3):160–6.
144. Huang BS, Ahmad M, Tan J, Leenen FHH. Chronic central versus systemic blockade of AT(1) receptors and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. setembro de 2009;297(3):H968–H75.
145. Coleman DL, Hummel KP. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol*. novembro de 1969;217(5):1298–304.
146. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. agosto de 1973;9(4):294–8.
147. Davis LM, Michaelides M, Cheskin LJ, Moran TH, Aja S, Watkins PA, et al. Bromocriptine administration reduces hyperphagia and adiposity and differentially affects dopamine D2 receptor and transporter binding in leptin-receptor-deficient Zucker rats and rats with diet-induced obesity. *Neuroendocrinology*. 2009;89(2):152–62.
148. Carruba MO, Ricciardi S, Müller EE, Mantegazza P. Anorectic effect of lisuride and other ergot derivatives in the rat. *Eur J Pharmacol*. 13 de junho de 1980;64(2–3):133–41.
149. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 17 de dezembro de 1998;396(6712):670–4.
150. Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X, et al. Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 19 de agosto de 2003;100(17):10085–90.

151. Nakata M, Yamamoto S, Okada T, Gantulga D, Okano H, Ozawa K, et al. IL-10 gene transfer upregulates arcuate POMC and ameliorates hyperphagia, obesity and diabetes by substituting for leptin. *Int J Obes (Lond)*. março de 2016;40(3):425–33.
152. Carvalho JC, Lisboa PC, de Oliveira E, Peixoto-Silva N, Pinheiro CR, Fraga MC, et al. Effects of early and late neonatal bromocriptine treatment on hypothalamic neuropeptides, dopaminergic reward system and behavior of adult rats. *Neuroscience*. 14 de junho de 2016;325:175–87.
153. Nahi F, Arbogast LA. Prolactin modulates hypothalamic preproenkephalin, but not proopiomelanocortin, gene expression during lactation. *Endocrine*. março de 2003;20(1–2):115–22.
154. Beatty DM, Morris SJ, Chronwall BM. Heterogeneity in POMC expression among explanted melanotropes decreases with time in culture and bromocriptine treatment. *Peptides*. 1998;19(4):659–65.
155. Pelletier G. Regulation of proopiomelanocortin gene expression in rat brain and pituitary as studied by in situ hybridization. *Ann N Y Acad Sci*. 31 de maio de 1993;680:246–59.
156. de Leeuw van Weenen JE, Parlevliet ET, Maechler P, Havekes LM, Romijn JA, Ouwens DM, et al. The dopamine receptor D2 agonist bromocriptine inhibits glucose-stimulated insulin secretion by direct activation of the α 2-adrenergic receptors in beta cells. *Biochem Pharmacol*. 15 de junho de 2010;79(12):1827–36.
157. Rubí B, Ljubicic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C, et al. Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem*. 4 de novembro de 2005;280(44):36824–32.
158. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology*. abril de 2009;150(4):1618–26.
159. Sorenson RL, Brelje TC. Prolactin receptors are critical to the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. abril de 2009;150(4):1566–9.
160. Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *J Endocrinol*. março de 2000;164(3):277–86.
161. Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*. 4 de dezembro de 1997;390(6659):521–5.
162. Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci*. agosto de 2000;3(8):757–8.
163. Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*. dezembro de 1980;31(6):410–7.
164. Lopez Vicchi F, Luque GM, Brie B, Nogueira JP, Garcia Tornadu I, Becu-Villalobos D. Dopaminergic drugs in type 2 diabetes and glucose homeostasis. *Pharmacological Research*. julho de 2016;109:74–80.
165. Jomain J-B, Tallet E, Broutin I, Hoos S, van Agthoven J, Ducruix A, et al. Structural and thermodynamic bases for the design of pure prolactin receptor antagonists: X-ray structure of Del1-9-G129R-hPRL. *J Biol Chem*. 9 de novembro de 2007;282(45):33118–31.
166. Bernichtein S, Kayser C, Dillner K, Moulin S, Kopchick JJ, Martial JA, et al. Development of pure prolactin receptor antagonists. *J Biol Chem*. 19 de setembro de 2003;278(38):35988–99.

167. Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. outubro de 1990;87(20):8003–7.
168. Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Roles of estrogen receptor- α gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology*. dezembro de 1998;139(12):5070–81.
169. Ribeiro AC, Musatov S, Shteyler A, Simanduyev S, Arrieta-Cruz I, Ogawa S, et al. siRNA silencing of estrogen receptor- α expression specifically in medial preoptic area neurons abolishes maternal care in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2 de outubro de 2012;109(40):16324–9.
170. Fahrbach SE, Pfaff DW. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Horm Behav*. setembro de 1986;20(3):354–63.
171. Kuroda KO, Tachikawa K, Yoshida S, Tsuneoka Y, Numan M. Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: with special emphasis on technical issues of using mouse genetics. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1º de julho de 2011;35(5):1205–31.
172. Lee AW, Brown RE. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behav Neurosci*. dezembro de 2002;116(6):968–75.
173. Tsuneoka Y, Maruyama T, Yoshida S, Nishimori K, Kato T, Numan M, et al. Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J Comp Neurol*. 1º de maio de 2013;521(7):1633–63.
174. Gross CT, Canteras NS. The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci*. setembro de 2012;13(9):651–8.
175. Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology*. fevereiro de 2011;152(2):526–35.
176. Li Q, Rao A, Pereira A, Clarke IJ, Smith JT. Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J Neuroendocrinol*. outubro de 2011;23(10):871–82.
177. Frazão R, Cravo RM, Donato J, Ratra DV, Clegg DJ, Elmquist JK, et al. Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor α . *J Neurosci*. 13 de fevereiro de 2013;33(7):2807–20.

APÊNDICES

A - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS COMPLEMENTARES

Concomitante à execução da tese, foram realizados e publicados os seguintes trabalhos:

- 1) **Furigo IC**, Ramos-Lobo AM, Frazão R, Donato J Jr. Brain STAT5 signaling and behavioral control. ***Molecular and Cellular Endocrinology*** no prelo, 2016.
- 2) **Furigo IC**, Metzger M, Teixeira PDS, Soares CRJ, Donato J Jr. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. ***Brain Structure & Function*** no prelo, 2016.
- 3) Pedroso JAB, Silveira MA, Lima LB, **Furigo IC**, Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Buonfiglio DC, Teixeira PDS, Frazão R, Donato J Jr. Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice. ***Endocrinology*** no prelo, 2016.
- 4) Lima LB, Metzger M, **Furigo IC**, Donato J Jr. Leptin receptor-positive and leptin receptor-negative proopiomelanocortin neurons innervate an identical set of brain structures. ***Brain Research*** 1646:366-376, 2016
- 5) Buonfiglio DC, Ramos-Lobo AM, Silveira MA, Furigo IC, Hennighausen L, Frazão R, **Donato J Jr.** Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. ***Hormones & Behavior***. 71:60-68, 2015.
- 6) Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, **Furigo IC**, Pedroso JAB, Buonfiglio DC, Donato J Jr. SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. ***Molecular Metabolism*** 4:237-245, 2015.
- 7) **Furigo IC**, Kim KW, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, Alencar A, Pedroso JAB, Metzger M, Donato J Jr. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. ***Brain Research*** 1566:47-59, 2014.
- 8) Pedroso JAB, Buonfiglio DC, Cardinali LI, **Furigo IC**, Ramos-Lobo AM, Tirapegui J, Elias CF, Donato J Jr. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. ***Molecular Metabolism*** 3:608-618, 2014.
- 9) Silva RP, Zampieri TT, Pedroso JAB, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, **Furigo IC**, Câmara NO, Frazão R, Donato J Jr. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. ***Endocrinology*** 155:4226-4236, 2014.
- 10) Nagaishi VS, Cardinali LI, Zampieri TT, **Furigo IC**, Metzger M, Donato J Jr. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. ***Neuroscience*** 259:71-83, 2014.
- 11) Sego C, Gonçalves L, Lima L, **Furigo IC**, Donato J Jr, Metzger M. Lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. ***Journal of Comparative Neurology*** 522:1454-1484, 2014.
- 12) Zampieri TT, Pedroso JAB, **Furigo IC**, Tirapegui J, Donato J Jr. Oral Leucine Supplementation Is Sensed by the Brain but neither Reduces Food Intake nor Induces an Anorectic Pattern of Gene Expression in the Hypothalamus. ***Plos One*** 8(12):e84094, 2013.

B - Furigo IC, Kim KW, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, de Alencar A, Pedrosa JA, Metzger M, Donato J Jr. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. *Brain Res.* 2014;1566:47-59.

BRAIN RESEARCH 1566 (2014) 47–59

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Research Report

Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin

Isadora C. Furigo^a, Ki Woo Kim^b, Vanessa S. Nagaishi^a,
Angela M. Ramos-Lobo^a, Amanda de Alencar^a, João A.B. Pedrosa^a,
Martin Metzger^a, Jose Donato Jr.^{a,*}

^aDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^bDepartment of Pharmacology, Institute of Lifestyle Medicine, and Nuclear Receptor Research Consortium, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju 220-701, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 12 April 2014

Available online 19 April 2014

Keywords:

Estradiol

Behavior

STAT5

Hypothalamus

Intracellular signaling

ABSTRACT

Estrogens and prolactin share important target tissues, including the gonads, brain, liver, kidneys and some types of cancer cells. Herein, we sought anatomical and functional evidence of possible crosstalk between prolactin and estrogens in the mouse brain. First, we determined the distribution of prolactin-responsive neurons that express the estrogen receptor α (ER α). A large number of prolactin-induced pSTAT5-immunoreactive neurons expressing ER α mRNA were observed in several brain areas, including the anteroventral periventricular nucleus, medial preoptic nucleus, arcuate nucleus of the hypothalamus, ventrolateral subdivision of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), medial nucleus of the amygdala and nucleus of the solitary tract. However, although the medial preoptic area, periventricular nucleus of the hypothalamus, paraventricular nucleus of the hypothalamus, retrochiasmatic area, dorsomedial subdivision of the VMH, lateral hypothalamic area, dorsomedial nucleus of the hypothalamus and ventral premammillary nucleus contained significant numbers of prolactin-responsive neurons, these areas showed very few pSTAT5-immunoreactive cells

Abbreviations: 3v, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; ARH tub, tuberal ARH; ARH cau, caudal ARH; AVPV, anteroventral periventricular nucleus; BST, bed nucleus of the stria terminalis; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DEPC, diethylpyrocarbonate; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; ER α , estrogen receptor α ; ERE, estrogen response element; f, fornix; KPBS, 0.02 M potassium PBS; LH, luteinizing hormone; LHA, lateral hypothalamic area; MCH, melanin-concentrating hormone; MeA, medial nucleus of the amygdala; MeApd, posterodorsal subdivision of the MeA; MPA, medial preoptic area; MPN, medial preoptic nucleus; NTS, nucleus of the solitary tract; PBS, phosphate-buffered saline; PeN, periventricular nucleus of the hypothalamus; PMV, ventral premammillary nucleus; PrLR, prolactin receptor; PVH, paraventricular nucleus of the hypothalamus; pSTAT5, phosphorylated form of signal transducer and activator of transcription-5; RCA, retrochiasmatic area; SOCS, suppressor of cytokine signaling; SSC, sodium chloride/sodium citrate; STAT5, signal transducer and activator of transcription-5; pSTAT5-ir, pSTAT5 immunoreactivity; oc, optic chiasm; OVLT, organum vasculosum of lamina terminalis; OVX, ovariectomized; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus; VMHdm, dorsomedial subdivision of the VMH; VMHvl, ventrolateral subdivision of the VMH

*Correspondence to: Av. Lineu Prestes, 1524, Room 234, São Paulo 05508-000, SP, Brazil. Fax: +55 11 3091 7285.

E-mail address: jdonato@icb.usp.br (J. Donato Jr.).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.04.018>

0006-8993/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

expressing ER α mRNA. Second, we evaluated prolactin sensitivity in ovariectomized mice and observed that sex hormones are required for a normal responsiveness to prolactin as ovariectomized mice showed a lower number of prolactin-induced pSTAT5 immunoreactive neurons in all analyzed brain nuclei compared to gonad-intact females. In addition, we performed hypothalamic gene expression analyses to determine possible post-ovariectomy changes in components of prolactin signaling. We observed no significant changes in the mRNA expression of prolactin receptor, STAT5a or STAT5b. In summary, sex hormones exert a permissive role in maintaining the brain's prolactin sensitivity, most likely through post-transcriptional mechanisms.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estrogens and prolactin share important target tissues. For example, a critical crosstalk occurs between prolactin and estrogens in the murine corpus luteum, where prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)

signaling is required for the appropriate expression of estrogen and luteinizing hormone (LH) receptors (Frasor and Gibori, 2003). Consequently, the null mutation of the prolactin receptor (PrlR) results in infertility (Ormandy et al., 1997a). The interaction between estrogens and prolactin is likely widespread in several physiological systems because knockout mice for *Esr1*, *Prlr* and

Fig. 1 – Classification of the proportion of prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA. (A)–(D). Brightfield photomicrographs of coronal sections of the mouse brain showing representative areas that exhibited high (+++), moderate (++) , low (+) and very low to virtually absent (–) proportion of prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA. The inset shows an example of a double-labeled neuron exhibiting nuclear staining indicative of pSTAT5-ir, surrounded by a cluster of silver grains representing the cytoplasmic expression of ER α mRNA. The white arrow in (A) indicates the position of the neuron shown enlarged in the inset and the black arrows in (C) examples of pSTAT5-negative neurons. Arrowheads point to examples of neurons considered pSTAT5-negative. Scale bar: (A)–(D)=20 μ m; Inset=5 μ m.

Stat5a/Stat5b genes share numerous phenotypes. Among their similarities, these mice have defects in mammary gland development and function and impaired bone mineral density and adipogenesis (Bole-Feysot et al., 1998; Cui et al., 2004; Frasor and Gibori, 2003; Kelly et al., 2001; Liu et al., 1997; Teglund et al., 1998; Udy et al., 1997). Estrogens and prolactin interact even in some types of cancer cells (Gutzman et al., 2004; Ormandy et al., 1997b). Estrogen receptors and PrlR are coexpressed and cross-regulated in T-47D and MCF-7 breast cancer cells (Ormandy et al., 1997b).

Another important interaction between estrogens and prolactin most likely occurs in the central nervous system as well. Knockout mice for *Esr1* or *Prlr* exhibit increased anxiety and impairments in maternal behaviors (Lucas et al., 1998; Ogawa et al., 1998). In addition, estradiol regulates PrlR expression and signaling in specific brain areas (Anderson et al., 2008). A similar expression pattern has been described for PrlR and the estrogen receptor α (ER α) in some brain nuclei (Brown et al., 2010; Simerly et al., 1990). However, despite the potential importance of this hormone interaction for several brain functions, information about the precise distribution of neurons coexpressing PrlR and ER α is scarce. Therefore, the objective of the present study was to determine the distribution of prolactin-induced pSTAT5-immunoreactive cells expressing ER α mRNA in the mouse brain. In addition, we assessed whether sex hormones are required for normal responsiveness to prolactin in the brain. We also performed hypothalamic gene expression analyses to determine possible changes in components of the PrlR signaling pathway after ovariectomy.

2. Results

2.1. Experiment 1: distribution of prolactin-responsive cells that express ER α mRNA in the mouse brain

Prolactin-responsive neurons were identified by immunostaining for the phosphorylated form of STAT5 (pSTAT5) after an acute administration of prolactin, as previously described (Anderson et al., 2008; Brown et al., 2010; Nagaishi et al., 2014). To visualize ER α -positive cells, we performed *in situ* hybridization to label ER α mRNA. Therefore, double-labeled cells contain nuclear staining indicating pSTAT5 immunoreactivity (pSTAT5-ir) and a cluster of silver grains around the nucleus representing the cytoplasmic expression of ER α mRNA (inset in Fig. 1). We performed qualitative analyses and classified the expression of pSTAT5-ir, ER α mRNA and the proportion of double-labeled cells as high, moderate, low and very low to virtually absent (Fig. 1). We analyzed all areas of the mouse brain that exhibited prolactin-responsive cells (Table 1). The medial preoptic area (MPA) exhibited a large number of prolactin-responsive cells but low expression of ER α mRNA (Fig. 2(A) and (B)). Thus, we observed a relatively low incidence of double-labeled cells in the MPA (Table 1). The anteroventral periventricular nucleus (AVPV, Fig. 2(C) and (D)) and the medial preoptic nucleus (MPN, Fig. 2(E) and (F)) showed very high expression of pSTAT5-ir and ER α mRNA, and the majority of prolactin-responsive cells also expressed ER α mRNA (Table 1). Interestingly, a notably higher proportion of prolactin-responsive cells expressed ER α mRNA

Table 1 – Qualitative description of neurons expressing pSTAT5-ir and/or ER α mRNA in the mouse brain.

Nuclei	Number of pSTAT5-ir cells	Expression levels of ER α mRNA	Proportion of double-labeled cells
MPA	+++	+	+
AVPV	+++	+++	+++
MPN, medial	+++	+++	+++
MPN, lateral	++	++	++
BST	–	+++	–
PeN	++	+	+
PVH	+	+	–
RCA	++	+	+
ARH, rostral	+++	++	+++
ARH, tuberal	+++	+++	+++
ARH, caudal	+++	+++	+++
VMH, rostral	++	+	+
VMHvl, intermediate	+++	++	++
VMHvl, caudal	+++	+++	+++
VMHdm	+	+	–
DMH	++	+	+
LHA	++	+	+
PMV	++	+	+
MeApd	++	+++	++
NTS	+	+	++

+++ , high; ++ , moderate; + , low; – , very low to virtually absent.

in the medial subdivision of MPN than its lateral subdivision (Fig. 2(E) and (F)). High expression of ER α mRNA was found in the bed nucleus of the stria terminalis (BST), but virtually no prolactin-responsive cells were observed in this structure (Table 1). Prolactin-responsive cells were found in the periventricular zone of the anterior hypothalamus. However, the expression of ER α mRNA was relatively low in these areas. As a result, the majority of prolactin-responsive cells in the periventricular nucleus of the hypothalamus (PeN, Fig. 2(G)) and in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH, Fig. 2(H)) did not express ER α mRNA (Table 1). The retrochiasmatic area (RCA) contained a moderate number of prolactin-responsive cells and a low expression of ER α mRNA, resulting in a low proportion of double-labeled neurons (Fig. 3(E)). On the other hand, the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) showed a very high rate of expression of ER α mRNA in prolactin-responsive cells (Fig. 3(A) and (B)). This large number of double-labeled cells was observed in the anterior, tuberal and caudal ARH (Table 1). The ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) contained one of the largest populations of prolactin-responsive neurons as well as high expression of ER α mRNA (Fig. 3(A)–(D)). The prolactin-responsive neurons inside the VMH were widespread (Brown et al., 2010; Nagaishi et al., 2014), but there was a higher density in the ventrolateral subdivision of the VMH (VMHvl), which is the portion of the VMH in which the ER α was confined (Donato et al., 2013; Simerly et al., 1990). Consequently, we observed a high coexpression of pSTAT5-ir and ER α mRNA in the VMHvl (Fig. 3(A), and (D)), whereas prolactin-responsive cells located in the dorsomedial subdivision of the

Fig. 2 – Distribution of prolactin-responsive cells expressing $ER\alpha$ mRNA in the anterior hypothalamus. (A)–(H). Brightfield photomicrographs of coronal sections of mouse brains, showing prolactin-induced pSTAT5-ir and silver grain clusters ($ER\alpha$ mRNA) in the MPA (A) and (B), AVPV (C) and (D), MPN (E) and (F), PeN (G) and PVH (H). (B), (D) and (F) are higher magnification photomicrographs of the boxes drawn in (A), (C) and (E), respectively. Abbreviations: 3v, third ventricle; oc, optic chiasm; OVLT, organum vasculosum of the lamina terminalis. Scale bars: (A), (C), and (E) = 200 μ m; (B), (D), (F), and (G) = 25 μ m; (H) = 100 μ m.

VMH (VMHdm) showed very low coexpression of $ER\alpha$ mRNA (Fig. 3(A), (C), and Table 1). In the tuberal hypothalamus, we also observed a low to moderate number of prolactin-responsive cells in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH,

Fig. 3(A)) and in the lateral hypothalamic area (LHA), including the perifornical area. The expression of $ER\alpha$ mRNA was relatively low in these areas, resulting in a low proportion of double-labeled cells in the DMH and LHA (Table 1). The ventral

Fig. 3 – Distribution of prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA in the mouse brain. (A)–(H). Brightfield photomicrographs of coronal sections of mouse brains, showing prolactin-induced pSTAT5-ir and silver grain clusters (ER α mRNA) in the ARH (A), and (B), VMH (A), (C), and (D), RCA (E), PMV (F) and NTS (G) and (H). (B), (C), (D) and (H) are higher magnification photomicrographs of the boxes drawn in A and G. Abbreviations: 3v, third ventricle; AP, area postrema; cc, central channel. Scale bars: (A), and (G)=200 μ m; (B)–(F), (H)=25 μ m.

premamillary nucleus (PMV) included a moderate number of prolactin-responsive cells. Interestingly, the pSTAT5-ir was observed in the ventromedial aspects of the PMV, adjacent to the pSTAT5 immunoreactive cells present in the caudal ARH.

However, although the caudal ARH contained a very high proportion of double-labeled cells, the PMV expressed a low proportion of prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA (Fig. 3(F)). Moderate expression of pSTAT5-ir was observed in

the posterodorsal subdivision of the medial nucleus of the amygdala (MeApd). The MeApd also expressed a high amount of ER α mRNA, resulting in a moderate to high proportion of double-labeled cells (Table 1). In the brainstem, we only analyzed the nucleus of the solitary tract (NTS). Although the NTS included relatively few prolactin-responsive neurons and relatively little ER α mRNA, the majority of these neurons were classified as double-labeled cells (Fig. 3(G), (H) and Table 1).

2.2. Experiment 2: assessment of prolactin response in gonad-intact and ovariectomized mice

After confirming that several brain areas contain prolactin-responsive neurons expressing ER α mRNA, we sought to determine whether variations in sex hormone levels affect prolactin responsiveness in the mouse brain. For this purpose, we perfused gonad-intact mice (Intact+oPRL group) and ovariectomized mice (OVX+oPRL group) after an acute stimulus with ovine prolactin. Prolactin sensitivity was determined by counting the number of pSTAT5-immunoreactive neurons in brain areas that showed low or high coexpression of prolactin-induced pSTAT5-ir and ER α mRNA. A group of gonad-intact PBS-treated mice (Intact+PBS) was included as a control for basal levels of pSTAT5-ir. Intact+PBS mice showed very low expression of pSTAT5-ir in the brain in comparison with prolactin-treated groups (Fig. 4). We observed a significant reduction in prolactin responsiveness in OVX+oPRL mice compared to Intact+oPRL animals (Fig. 4) among areas that exhibited high coexpression of pSTAT5-ir and ER α mRNA, including the AVPV (Fig. 5(A) and (B)), VMH (Fig. 5(C) and (D)), tuberal ARH (Fig. 5(C) and (D)), MeApd (Fig. 5(E) and (F)) and caudal ARH (Fig. 5(G) and (H)). Notably, nuclei with low coexpression of prolactin-induced pSTAT5-ir and ER α mRNA also showed significant reductions in prolactin responsiveness in OVX+oPRL mice (Fig. 4). Among the brain regions that exhibited such a pattern were the MPA (Fig. 5(A) and (B)) and the PMV (Fig. 5(G) and (H)).

Fig. 4 – Bar graphs indicating the number of prolactin-induced pSTAT5 immunoreactive neurons in brain nuclei of Intact+PBS ($n=3$), Intact+oPRL ($n=5$) and OVX+oPRL ($n=9$) mice. *, significantly different ($P<0.05$) from Intact+PBS and OVX+oPRL groups.

2.3. Experiment 3: assessment of the effects of ovariectomy on hypothalamic expression of genes involved in PrLR signaling pathway

Based on the aforementioned findings, sex hormones are required for normal responsiveness to prolactin. To determine whether ovariectomy modulates prolactin sensitivity by changing the expression of genes involved in PrLR signaling pathway, we first performed sequence analyses of the proximal promoter regions of the PrLR, Stat5a and Stat5b genes to identify potential estrogen response element (ERE) half-sites. We found one potential ERE half-site at –313 to –308 base pairs (bp) from the start codon of the mouse PrLR gene (Table 2). Another potential ERE half-site was located at –895 to –890 bp from the start codon of the mouse Stat5a gene (Table 2). The mouse Stat5b gene includes two potential ERE half-sites, located at –222 to –217 and –140 to –135 bp from the start codon (Table 2). Some of these ERE half-sites are conserved among other mammals (Table 2). Thus, ER α can potentially bind and regulate the expression of genes involved in PrLR signaling. Next, we studied a group of mice that was subjected to ovariectomy (OVX group) or sham-surgery (Intact group; euthanized in diestrus 2). One subgroup of these mice was allowed to recover from surgery for 7 days (short-term OVX), whereas another subgroup was maintained for 30 days (long-term OVX). After that, their hypothalami were collected for gene expression analysis. As expected (Österlund et al., 1998; Simerly and Young, 1991), OVX mice showed increased hypothalamic expression of ER α mRNA compared to Intact animals (Fig. 6). However, we did not observe significant changes of hypothalamic PrLR, STAT5a and STAT5b mRNA expression in OVX mice at either 7 days or 30 days after surgery (Fig. 6).

3. Discussion

In the present study, we sought anatomical and functional evidence of possible crosstalk between prolactin and estrogens in the mouse brain. First, we assessed different brain nuclei that might house prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA. We found relatively large numbers of double-labeled neurons in several brain areas, including the AVPV, MPN, ARH, VMHvl and MeA. In contrast, other brain nuclei containing large populations of prolactin-responsive neurons, such as the MPA, PeN, PVH, RCA, VMHdm, LHA, DMH and PMV, displayed only a few double-labeled cells. Second, we evaluated prolactin sensitivity in OVX mice and observed that sex hormones are required for normal responsiveness to prolactin. Finally, we determined the expression of genes involved in the PrLR signaling pathway and observed that despite the striking effects of ovariectomy on prolactin sensitivity and the existence of potential ERE binding sites in their promoter regions, the hypothalamic expression levels of PrLR, STAT5a and STAT5b mRNA did not change in OVX mice.

Previous studies have demonstrated that pSTAT5-ir can be used as a reliable marker of prolactin-responsive neurons (Anderson et al., 2008; Brown et al., 2010; Nagaishi et al., 2014). Animals that were not treated with prolactin before the

Fig. 5 – Distribution of prolactin-induced pSTAT5 immunoreactive neurons in the brains of Intact and OVX mice. (A)–(H). Brightfield photomicrographs of coronal sections showing the expression of pSTAT5-ir in the AVPV (A) and (B), MPA (A) and (B), ARH (C) and (D), (G) and (H), VMH (C) and (D), MeA (E) and (F) and PMV (G) and (H) of Intact+oPRL (A), (C), (E), and (G) and OVX+oPRL (B), (D), (F), and (H) mice. Abbreviations: 3v, third ventricle; f, fornix; oc, optic chiasm; opt, optic tract. Scale bar=200 μ m.

perfusion showed very low basal levels of pSTAT5-ir. This basal expression vanishes in bromocriptine-treated mice, indicating that even basal levels of pSTAT5-ir are likely caused by endogenous prolactin secretion (Brown et al.,

2010). However, some areas that express PrIR mRNA, such as the BST, may not show prolactin-induced pSTAT5-ir (Brown et al., 2010). The reasons for the lack of responsiveness of the BST are unknown but they may be related to the

Table 2 – Sequence analyses of the proximal promoter regions of *PrLr*, *Stat5a* and *Stat5b* genes to identify potential estrogen response element (ERE) half-sites.

Potential ERE binding sites

***PrLr* (-313 to -308)**

Mouse	CGATAAAT TG ----- ACCT GG-----
Rat	
Rabbit	-----AGGG-----ACCTGGGGTGT
Marmoset	-----TGAGATTATAGTGGGGTAC
Gorilla	-----TGAGATTGTACTGAGGGTAC
Human	-----TGAGATTGTACTGAGGGTAC
Chimpanzee	-----TGAGATTGTACTGAGGGTAC
Orangutan	-----TGAGATTGTACTGAGGGTAC
Macaque	-----TGAGATTGTACTAAGGGTAC

***Stat5a* (-895 to -890)**

Mouse	CGGAGGCAGC TGACCT TTGAGGAGGA
Rat	CGGAGGCAGCTGACCTTTGAGGAGGA
Rabbit	CGCAGGCAGCTGACCTTTGAGGAGGA
Marmoset	
Gorilla	
Human	CGCAGGCAGCTGACCTTTGAGGAGGA
Chimpanzee	
Orangutan	
Macaque	CGCAGGCAGCTGACCTTTGAGGAGGA

***Stat5b* (-222 to -217)**

Mouse	-----CATCCTC TGACCT CTACACA
Rat	-----CATCCTCTGACCTCCACACA
Rabbit	-----
Marmoset	TTATTA-----
Gorilla	T-GGTA-----
Human	T-GGTA-----
Chimpanzee	
Orangutan	T-GGTA-----
Macaque	T-GGTA-----

***Stat5b* (-140 to -135)**

Mouse	TTTAAAGATT TGACCT TTAGTGTAAC
Rat	TTTACAGACTTGACCTATACTGTACC
Rabbit	-----
Marmoset	-----
Gorilla	-----
Human	-----
Chimpanzee	-----
Orangutan	-----
Macaque	-----

The highlighted boxes indicate consensus ERE half-sites (5'-TGACCT-3' or 5'-TGACCT-3') in the mouse genome and their corresponding sites in the genomes of other mammals. The range in front of gene names indicates the distance of the corresponding putative ERE half-sites from the start codons.

expression of different isoforms of PrLr, mechanisms downstream of PrLr signaling that could block the activation of STAT5, differences in the PrLr activation threshold or the existence of area-specific co-requirements for the activation of PrLr signaling. Therefore, we cannot rule out the existence of cells co-expressing PrLr mRNA and ER α mRNA which were not classified as dual-labeled by using pSTAT5-ir as a marker of prolactin-responsive cells. Our ER α ³⁵S-labeled riboprobe produced a highly specific labeling pattern consistent with data from the literature (Donato et al., 2013; Simerly et al., 1990), making it possible to identify brain areas that contain double-labeled cells. Nevertheless, we did not perform a systematic

quantitative analysis due to the impossibility of precisely defining cell boundaries. Thus, dense agglomerations of silver grains indicative of ER α mRNA often could not be related to distinct pSTAT5-ir cells. Instead, we chose to perform a qualitative analysis classifying the proportion of double-labeled cells in each brain nucleus as high, moderate, low or very low.

An interaction between prolactin and estrogens is important for the expression of several social behaviors. For example, it has long been known that prolactin and placental lactogens are critical hormones for the expression of maternal behaviors (Bridges et al., 1985, 1990; Lucas et al., 1998; Ormandy et al., 1997a). In addition, estrogens exert a facilitating function on maternal behavior, as the stimulatory effect of central prolactin infusion on maternal behaviors is steroid receptor-dependent (Bridges et al., 1990; Ogawa et al., 1998; Ribeiro et al., 2012). The preoptic region is essential for the interaction between prolactin and estrogens in the induction of maternal behavior (Bridges et al., 1990; Fahrback and Pfaff, 1986; Kuroda et al., 2011; Lee and Brown, 2002; Ribeiro et al., 2012; Tsuneoka et al., 2013). In the vicinity of the preoptic region, we observed nuclei with low to moderate coexpression of pSTAT5-ir and ER α mRNA (i.e., MPA and lateral MPN), whereas the AVPV and medial MPN showed a very high proportion of double-labeled cells. The VMHvl and the MeApd are also critically involved in social behaviors and exhibited high proportions of double-labeled neurons. These two areas form part of the circuits involved in the modulation of several innate behaviors (Gross and Canteras, 2012). Nonetheless, the interaction of estrogens and prolactin in the brain can have an influence beyond the expression of behaviors. For example, prolactin and estrogens regulate the neuroendocrine reproductive axis, and these hormones have the kisspeptin neurons as a common target. The majority of kisspeptin neurons in the AVPV and ARH express ER α immunoreactivity (Cravo et al., 2011) and PrLr mRNA (Kokay et al., 2011; Li et al., 2011). Consistent with that fact, we observed a very high proportion of prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA in these hypothalamic nuclei. Likely as a result of the crosstalk between sex hormones and prolactin in these brain areas, the inhibitory effect of prolactin on LH pulsatility is dependent on estradiol (Anderson et al., 2008).

Our results strongly suggest that sex hormones are required for normal responsiveness to prolactin because OVX mice showed a reduced number of prolactin-induced pSTAT5-immunoreactive neurons in all analyzed brain areas. Previous studies have shown that OVX mice treated with estradiol are significantly more responsive to prolactin in comparison with ovariectomy only (Anderson et al., 2008). The high coexpression of pSTAT5-ir and ER α mRNA in several nuclei indicates a possible crosstalk between PrLr and ER α . However, the coexpression of prolactin-induced pSTAT5-ir and ER α mRNA does not guarantee that prolactin and estrogens interact in that cell. The reduced sensitivity to prolactin in OVX mice was observed in areas showing both low and high proportions of double-labeled neurons. Therefore, because the ability of estrogens to increase prolactin signaling does not necessarily require the coexpression of PrLr and ER α , it may also occur by indirect mechanisms. Indirect effects of estrogens have been reported in specific neuronal populations. For example, melanin-concentrating hormone

Fig. 6 – Hypothalamic mRNA expression. Bar graphs exhibiting the relative gene expression of Intact and OVX mice at 7 days ($n=6/\text{group}$) or 30 days ($n=7\text{--}8/\text{group}$) after the surgery. *, significantly different ($P<0.05$) from Intact group.

(MCH) neurons do not express ER α , although estradiol treatment in OVX rats decreases hypothalamic MCH expression (Murray et al., 2000; Muschamp and Hull, 2007; Santollo and Eckel, 2013). Several indirect mechanisms could be proposed to explain the reduced prolactin responsiveness of OVX mice. The PrlR expression in the choroid plexus mediates the transport of prolactin from the blood to the cerebrospinal fluid (Hirai et al., 2013; Tabata et al., 2012). Thus, a difference in the prolactin transport into the brain might be a possible indirect mechanism since OVX mice show decreased expression of the most abundant PrlR mRNA variant in the choroid plexus (Tabata et al., 2012). The same PrlR mRNA variant is markedly augmented in the choroid plexus of lactating rats (Hirai et al., 2013), which is a condition of increased prolactin responsiveness in the brain (Brown et al., 2011). Alternatively, other hormones, whose secretion could be disturbed by ovariectomy, may also influence prolactin sensitivity in the brain. Finally, sex hormone deficiency leads to many endocrine, metabolic and neuronal changes that could account for these indirect effects.

Several studies have investigated the mechanisms by which estrogens can regulate prolactin signaling. Anderson et al. (2008) observed that estradiol replacement in OVX rats increased PrlR mRNA in the preoptic area and choroid plexus, whereas it had no effects in the ARH. Other studies have demonstrated that sex steroids can induce the expression of PrlR in the brain, indicating that estrogens may regulate brain prolactin signaling by affecting PrlR expression (Lerant and Freeman, 1998; Mustafa et al., 1995; Pi et al., 2003). Nonetheless, we failed to observe significant changes in the mRNA expression of PrlR, STAT5a and STAT5b in the hypothalamus of OVX mice in comparison with gonad-intact mice euthanized in diestrus 2. It is worth mentioning that we analyzed the effects in the whole hypothalamus and changes in specific nuclei may have not been detected. Furthermore, alternative mechanisms have been proposed to explain how sex hormones may regulate prolactin signaling. For example, sex steroid receptors and STAT are distinct families of transcription factors, but they can interact with one another. ER α and STAT5 can interact directly, resulting in decreased prolactin-induced STAT5 transcriptional activity (Faulds et al., 2001; Stoecklin et al., 1999). Sex steroids can also

modulate the expression of proteins that interfere with prolactin signaling cascades, particularly the suppressor of cytokine signaling (SOCS) protein family. Estradiol doubles the activity of the murine SOCS3 promoter (Matthews et al., 2005), and chronic estradiol treatment increases SOCS3 and CIS mRNA expression in the preoptic area, ARH and choroid plexus of OVX rats (Anderson et al., 2008). Higher expression of SOCS3 or CIS is expected to decrease prolactin signaling (Krebs and Hilton, 2001). Although ovariectomy increases the ER α mRNA expression in the brain, the ER α transcriptional activity is expected to be very low in OVX mice. Accordingly, we and others (Anderson et al., 2008; Lerant and Freeman, 1998; Mustafa et al., 1995; Pi et al., 2003) found a permissive rather than negative effect of sex steroids on prolactin signaling. This finding indicates that sex hormones are in fact necessary for a normal responsiveness to prolactin in the brain. Altogether, our results suggest that post-transcriptional mechanisms may be involved in the interaction between sex hormones and prolactin in the mouse brain.

Herein, we described the distribution in the mouse brain of prolactin-responsive cells expressing ER α mRNA. In addition, we confirmed previous observations that sex hormones are required for a normal responsiveness to prolactin. However, despite the relatively large proportion of double-labeled neurons in several brain areas, the mechanisms by which sex hormones increase prolactin signaling are likely indirect because even areas with a few double-labeled neurons were significantly influenced by ovariectomy. Moreover, the effects of sex hormones on prolactin signaling likely depend on post-transcriptional mechanisms because the hypothalamic expression of PrlR, STAT5a and STAT5b did not change in short-term or long-term OVX mice compared to gonad-intact mice. In summary, our findings may contribute to unravel the complex interactions between sex hormones and prolactin in the brain.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

Adult C57BL/6 female mice were maintained in standard conditions of light (12-h light/dark cycle) and temperature

(22 ± 2 °C). All animal procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo and were performed according to the ethical guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

4.2. Experimental procedure

4.2.1. Experiment 1: distribution of prolactin-responsive cells that express *ERα* mRNA in the mouse brain

At 2 weeks after ovariectomy surgery, mice ($n=9$) received an acute injection of ovine prolactin (i.p., $10 \mu\text{g/g}$, Sigma) to induce pSTAT5-ir. Lower doses of ovine prolactin were previously tested (i.e., 1, 2.5 and $5 \mu\text{g/g}$). Although they were able to produce pSTAT5-ir, we obtained weaker and less reliable staining compared to the used dose (personal observations). The mice were perfused 2 h after the injection, and we determined the distribution of prolactin-responsive cells (pSTAT5-ir) that expressed the *ERα* mRNA in several brain nuclei.

4.2.2. Experiment 2: assessment of prolactin response in gonad-intact and ovariectomized mice

Gonad-intact ($n=5$) and ovariectomized (OVX, $n=9$) mice (2 weeks after surgery) received an i.p. injection of ovine prolactin ($10 \mu\text{g/g}$) and were perfused after 2 h. We compared the prolactin responses of Intact+oPRL and OVX+oPRL mice by counting the numbers of neurons expressing prolactin-induced pSTAT5-ir in several brain nuclei. A group of gonad-intact PBS-treated mice (Intact+PBS, $n=3$) was included to establish the number of pSTAT5-immunoreactive neurons without the acute prolactin stimulus.

4.2.3. Experiment 3: assessment of the effects of ovariectomy on hypothalamic expression of genes involved in the PrIR signaling

Mice were subjected to ovariectomy (OVX group) or sham surgery (Intact group). A group of mice was allowed to recover for 7 days (short-term OVX; $n=6/\text{group}$), whereas another group was maintained for 30 days (long-term OVX; $n=7-8/\text{group}$). After recovery, the mice were euthanized by decapitation, and their hypothalami were quickly collected for relative gene expression analysis. The Intact animals were sacrificed in diestrus 2 of their estrous cycle. To dissect the hypothalamus, we defined its limits as follows: rostro-caudal, 1 mm anterior to the optic chiasm and immediately posterior to the mammillary bodies; lateral, defined by the optic tract; and superior, the dorsal limit of the third ventricle. The efficacy of the ovariectomy surgery was assessed by weighing their uteri after euthanasia. OVX mice exhibited a significantly ($P=0.0002$) lighter uterus ($0.018 \pm 0.003 \text{ g}$) than Intact mice ($0.057 \pm 0.007 \text{ g}$).

4.3. Perfusion and tissue sectioning

Mice were deeply anesthetized and perfused transcardially with saline, followed by 4% formaldehyde fixative solution (150 mL per mouse). Brains were collected and post-fixed in the same fixative for 1–2 h and cryoprotected overnight at 4 °C in 0.1 M PBS, pH 7.4, containing 20% sucrose. Brains were

cut ($30\text{-}\mu\text{m}$ thick sections) in the frontal plane using a freezing microtome. Four series of tissue were collected in antifreeze solution and stored at -20 °C.

4.4. In situ hybridization

Free-floating brain sections were rinsed with DEPC-treated PBS, pH 7.0, for 1 h, followed by incubation in 0.1% sodium borohydride (Sigma) in DEPC-PBS for 15 min. Sections were then incubated for 10 min in 0.25% acetic anhydride (Merck) in 0.1 M triethanolamine. *ERα* ^{35}S -labeled riboprobe was generated from cDNA templates as described previously (Donato et al., 2010). The riboprobe corresponds to positions 454–928 of GenBank accession number NM_007956.4, comprising exons 2–4 of the mouse *Esr1* gene. cRNA probes were diluted to 10^6 cpm/ml in hybridization buffer and applied to brain sections. The hybridization buffer consisted of 50% formamide, 10 mM Tris-HCl (Fisher Scientific), 0.01% sheared salmon sperm DNA (Sigma), 0.01% yeast tRNA (Sigma), 0.05% total yeast RNA (Sigma), 10 mM dithiothreitol (Amresco), 10% dextran sulfate (Amresco), 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) and 1x Denhardt's solution (Amresco). Sections were hybridized overnight at 56 °C. The following day, tissue was rinsed four times in $4\times$ sodium chloride/sodium citrate (SSC) and incubated in 0.002% RNase A (Roche Diagnostics GmbH) diluted in 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM EDTA for 30 min at 37 °C. Sections were submitted to stringent washes in $2\times$ SSC and $0.2\times$ SSC at 60 °C for 30 min per incubation. Subsequently, sections were incubated for 48 h in anti-pSTAT5 antisera (1:1000) and processed for immunoperoxidase staining (see detailed protocol below). Tissue was mounted onto SuperFrost Plus slides (Fisher Scientific), dehydrated in increasing concentrations of ethanol and cleared in xylene for 5 min. After air-drying, the slides were placed in X-ray film cassettes with BMR-2 film (Kodak, Rochester, NY) for 2 days. Slides were then dipped in NTB2 photographic emulsion (Kodak), dried, and stored in desiccant-containing, foil-wrapped slide boxes at 4 °C for 18 days. Slides were developed with D-19 developer (Kodak), dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared in xylenes and coverslipped with DPX (Sigma).

4.5. pSTAT5 immunohistochemistry

Brain sections were rinsed in 0.02 M potassium PBS, pH 7.4 (KPBS), followed by a pretreatment in an alkaline (pH > 13) water solution containing 1% hydrogen peroxide and 1% sodium hydroxide (0.5% if the reaction followed the *in situ* hybridization) for 20 min. After rinsing in KPBS, sections were incubated in 0.3% glycine and 0.03% lauryl sulfate for 10 min each. Next, sections were blocked in 3% normal donkey serum for 1 h, followed by incubation in anti-pSTAT5 antisera raised in rabbit (1:1000, Cell Signaling) for 48 h. Subsequently, sections were incubated for 1 h in biotin-conjugated IgG donkey anti-rabbit (1:1000, Jackson Laboratories) and then for 1 h with an avidin-biotin complex (1:500, Vector Labs). The peroxidase reaction was performed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.03% hydrogen peroxide and 0.25% nickel sulfate (omitted if the reaction followed the *in situ* hybridization). The reaction was stopped by rinses in KPBS.

4.6. Relative gene expression (qPCR)

Total RNA from the whole hypothalamus were extracted with TRIzol[®] reagent (Invitrogen). Assessment of RNA quantity and quality was performed with an Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek[®]). Total RNA was incubated in DNase I RNase-free (Roche Applied Science). Reverse transcription was performed with 2 µg of total RNA with SuperScript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers p(dN) 6 (Roche Applied Science). Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®]) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Relative quantification of mRNA was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Data were normalized to the geometric mean of the β -actin (Taqman assay, Mm00607939_s1), 18S (forward: tgggtgacctgcccagtag; reverse: cgaccaaggaaccataact) and cyclophilin A (forward: tatctgcactgccaagactgagt; reverse: cttctgtgtgtgtgcttccattcc) expression and reported as fold changes compared to values obtained from the Intact group (set at 1.0). We used the following primer sequences: ER α (forward: gcagataggagctggttca; reverse: tggagattcaagtcctccaaa); PrlR (forward: cagtaaatgccacgaacgaa; reverse: gaggagctctggttca-aca); STAT5a (forward: cgctggactccatgcttctc; reverse: gacgtg-ggctcctcacactga); STAT5b (forward: ggactccgtccttgataccg; reverse: tccatcggtgtcttccagatcg).

4.7. Data analysis and image collection

In Experiment 1, we performed a relative analysis of several brain nuclei that contained prolactin-responsive cells (pSTAT5-ir; nuclear staining) and/or ER α mRNA (silver grains; cytoplasmic staining). pSTAT5-ir cells were defined as double-labeled if the density of the silver grains immediately around the nucleus was more than three times greater than background levels observed over tissue regions in the same section not containing ER α mRNA. The expression of pSTAT5-ir, ER α mRNA and double-labeled cells were classified as high (+++), moderate (++), low (+) and very low to virtually absent (–; Fig. 1). The boundaries of each nucleus were defined using pSTAT5-ir and ER α mRNA, with a mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2007) as reference. In Experiment 2, we captured brightfield photomicrographs of nuclei that expressed prolactin-induced pSTAT5-ir. We used ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) to perform an automated count of the number of pSTAT5 immunoreactive neurons in each area. The image was converted to binary, and a threshold was selected to only count cells that expressed a dark-brown/black pSTAT5-ir staining. One rostrocaudal level from each nucleus was analyzed. Photomicrographs were acquired with a Zeiss Axiocam HRc camera adapted to a Zeiss Axiomager A1 microscope (Zeiss, Munich, Germany). Images were digitized using Axiovision software (Zeiss). Photoshop image-editing software was used to combine photomicrographs into plates. Only sharpness, contrast and brightness were adjusted.

4.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. We used one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post-test to compare the results from Intact+PBS, Intact+oPRL and

OVX+oPRL groups. The differences between Intact and OVX groups were compared by the unpaired two-tailed Student t-test. We considered P values <0.05 as statistically significant.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: ICF and JD. Performed the experiments: ICF, KWK, VSN, AMRL, AL, JABP and ABC. Analyzed the data and proofread the manuscript: ICF, MM and JD. Wrote the manuscript: JD.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP-Brazil, 2010/18086-0, 2012/02388-3, 2013/16374-7 and 2013/21722-4) and the International Brain Research Organization (IBRO) for their financial support and fellowships, and Ana Maria P. Campos and José L. dos Santos for the technical assistance. This research was also partly supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning (NRF-2013R1A1A1007693 to K.W.K).

REFERENCES

- Anderson, G.M., Kieser, D.C., Steyn, F.J., Grattan, D.R., 2008. Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology* 149, 1562–1570.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268.
- Bridges, R.S., DiBiase, R., Loundes, D.D., Doherty, P.C., 1985. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 227, 782–784.
- Bridges, R.S., Numan, M., Ronsheim, P.M., Mann, P.E., Lupini, C.E., 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8003–8007.
- Brown, R.S., Kokay, I.C., Herbison, A.E., Grattan, D.R., 2010. Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* 518, 92–102.
- Brown, R.S., Herbison, A.E., Grattan, D.R., 2011. Differential changes in responses of hypothalamic and brainstem neuronal populations to prolactin during lactation in the mouse. *Biol. Reprod.* 84, 826–836.
- Cravo, R.M., Margatho, L.O., Osborne-Lawrence, S., Donato Jr., J., Atkin, S., Bookout, A.L., Rovinsky, S., Frazao, R., Lee, C.E., Gautron, L., Zigman, J.M., Elias, C.F., 2011. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 173, 37–56.
- Cui, Y., Riedlinger, G., Miyoshi, K., Tang, W., Li, C., Deng, C.X., Robinson, G.W., Hennighausen, L., 2004. Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals

- distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8037–8047.
- Donato Jr., J., Frazao, R., Fukuda, M., Vianna, C.R., Elias, C.F., 2010. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. *Endocrinology* 151, 5415–5427.
- Donato Jr., J., Lee, C., Ratra, D.V., Franci, C.R., Canteras, N.S., Elias, C.F., 2013. Lesions of the ventral premammillary nucleus disrupt the dynamic changes in Kiss1 and GnRH expression characteristic of the proestrus–estrus transition. *Neuroscience* 241, 67–79.
- Fahrbach, S.E., Pfaff, D.W., 1986. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Horm. Behav.* 20, 354–363.
- Faulds, M.H., Pettersson, K., Gustafsson, J.A., Haldosen, L.A., 2001. Cross-talk between ERs and signal transducer and activator of transcription 5 is E2 dependent and involves two functionally separate mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 15, 1929–1940.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, third ed. Academic Press, San Diego.
- Frasor, J., Gibori, G., 2003. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 118–123.
- Gross, C.T., Canteras, N.S., 2012. The many paths to fear. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 651–658.
- Gutzman, J.H., Miller, K.K., Schuler, L.A., 2004. Endogenous human prolactin and not exogenous human prolactin induces estrogen receptor alpha and prolactin receptor expression and increases estrogen responsiveness in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 69–77.
- Hirai, J., Nishita, M., Nakao, N., Saito, T.R., Tanaka, M., 2013. Regulation of prolactin receptor gene expression in the rat choroid plexus via transcriptional activation of multiple first exons during postnatal development and lactation. *Exp. Anim.* 62, 49–56.
- Kelly, P.A., Binart, N., Lucas, B., Bouchard, B., Goffin, V., 2001. Implications of multiple phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Front Neuroendocrinol.* 22, 140–145.
- Kokay, I.C., Petersen, S.L., Grattan, D.R., 2011. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology* 152, 526–535.
- Krebs, D.L., Hilton, D.J., 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378–387.
- Kuroda, K.O., Tachikawa, K., Yoshida, S., Tsuneoka, Y., Numan, M., 2011. Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: with special emphasis on technical issues of using mouse genetics. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1205–1231.
- Lee, A.W., Brown, R.E., 2002. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behav. Neurosci.* 116, 968–975.
- Lerant, A., Freeman, M.E., 1998. Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res.* 802, 141–154.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2011. Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J. Neuroendocrinol.* 23, 871–882.
- Liu, X.W., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., WynshawBoris, A., Hennighausen, L., 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 11, 179–186.
- Lucas, B.K., Ormandy, C.J., Binart, N., Bridges, R.S., Kelly, P.A., 1998. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 139, 4102–4107.
- Matthews, J., Almlof, T., Kietz, S., Leers, J., Gustafsson, J.A., 2005. Estrogen receptor-alpha regulates SOCS-3 expression in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 168–174.
- Murray, J.F., Baker, B.I., Levy, A., Wilson, C.A., 2000. The influence of gonadal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats. *J. Neuroendocrinol.* 12, 53–59.
- Muschamp, J.W., Hull, E.M., 2007. Melanin concentrating hormone and estrogen receptor-alpha are coextensive but not coexpressed in cells of male rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 427, 123–126.
- Mustafa, A., Nyberg, F., Bogdanovic, N., Islam, A., Suliman, I., Lindgren, U., Roos, P., Adem, A., 1995. Prolactin binding sites in rat brain and liver: effects of long-term ovariectomy and ovarian steroids. *Neurosci. Lett.* 200, 179–182.
- Nagaishi, V.S., Cardinali, L.I., Zampieri, T.T., Furigo, I.C., Metzger, M., Donato Jr., J., 2014. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience* 259, 71–83.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1998. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* 139, 5070–5081.
- Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., Kelly, P.A., 1997a. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 11, 167–178.
- Ormandy, C.J., Hall, R.E., Manning, D.L., Robertson, J.F., Blamey, R.W., Kelly, P.A., Nicholson, R.I., Sutherland, R.L., 1997b. Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3692–3699.
- Österlund, M., G.J.M. Kuiper, G., Gustafsson, J.-Å., Hurd, Y.L., 1998. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-[alpha] and -[beta] mRNA within the female rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54, 175–180.
- Pi, X., Zhang, B., Li, J., Voogt, J.L., 2003. Promoter usage and estrogen regulation of prolactin receptor gene in the brain of the female rat. *Neuroendocrinology* 77, 187–197.
- Ribeiro, A.C., Musatov, S., Shteyler, A., Simanduyev, S., Arrieta-Cruz, I., Ogawa, S., Pfaff, D.W., 2012. siRNA silencing of estrogen receptor-alpha expression specifically in medial preoptic area neurons abolishes maternal care in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 16324–16329.
- Santolito, J., Eckel, L.A., 2013. Oestradiol decreases melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH receptor expression in the hypothalamus of female rats. *J. Neuroendocrinol.* 25, 570–579.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76–95.
- Simerly, R.B., Young, B.J., 1991. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 5, 424–432.
- Stoecklin, E., Wissler, M., Schaeztle, D., Pfützner, E., Groner, B., 1999. Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 195–204.
- Tabata, H., Kobayashi, M., Ikeda, J.H., Nakao, N., Saito, T.R., Tanaka, M., 2012. Characterization of multiple first exons in murine prolactin receptor gene and the effect of prolactin on their expression in the choroid plexus. *J. Mol. Endocrinol.* 48, 169–176.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D.M., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., Ihle, J.N., 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841–850.

-
- Tsuneoka, Y., Maruyama, T., Yoshida, S., Nishimori, K., Kato, T., Numan, M., Kuroda, K.O., 2013. Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 521, 1633–1663.
- Udy, G.B., Towers, R.P., Snell, R.G., Wilkins, R.J., Park, S.H., Ram, P. A., Waxman, D.J., Davey, H.W., 1997. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7239–7244.