VINÍCIUS CESTARI DO AMARAL

**Expressão gênica da prolactina e seus receptores na hipófise
e no útero de camundongo fêmea tratado com
metoclopramida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel
Co-orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

São Paulo

2012

VINÍCIUS CESTARI DO AMARAL

**Expressão gênica da prolactina e seus receptores na hipófise
e no útero de camundongo fêmea tratado com
metoclopramida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel
Co-orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Amaral, Vinícius Cestari do

Expressão gênica da prolactina e seus receptores na hipófise e no útero de camundongo fêmea tratado com metoclopramida / Vinícius Cestari do Amaral. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Gustavo Arantes Rosa Maciel.

Co-orientador: José Maria Soares Júnior.

Descritores: 1.Prolactina 2.Receptores da prolactina 3.Hiperprolactinemia 4.Expressão gênica 5.Útero 6.Hipófise 7.Camundongos

USP/FM/DBD-140/12

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Claudionor Blois do Amaral e Olga Aparecida Cestari do Amaral, meus melhores e maiores Mestres. Com o exemplo de doação, foram fundamentais para que eu chegasse nessa etapa. Dedico também a Priscilla Ludovico da Silva, por proporcionar chão firme em minha caminhada.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat. Professor não é aquele que ensina somente com palavras. As simples atitudes desse exímio educador valem mais que qualquer titulação.

Ao Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel. Sua competência como pesquisador e orientador é compatível ao seu imensurável carisma e inesgotável paciência.

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Júnior. Uma página é pouco para agradecê-lo. Meu agradecimento está embutido em todas as páginas desta tese, lidas, relidas e enormemente melhoradas por esse professor ímpar.

À Dra. Kátia Cândido Carvalho. Sua incansável ajuda foi mais do que fundamental na elaboração deste trabalho. Minha eterna gratidão por ter dado vida a esse estudo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões. Verdadeiro exemplo a ser seguido.
Um professor que mudou minha percepção de mundo.

Aos amigos da Disciplina de Histologia da Universidade Federal de São Paulo, em especial Adriana Carbonel, Roberta Wolf, Luciana Cabanelas, Regina Célia Gomes;

Aos amigos do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM58):
Marinalva de Almeida, Thiago Hideki, Rodrigo Rodrigues Marcondes, Fernanda Condi; Luiz Fernando Portugal Fuchs.

Aos funcionários da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial Célia, Cristiane, Mara Núbia e Cláudia.

À Secretaria de pós-graduação do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.

Ao Centro de Bioterismo da FMUSP, em especial Luisa e Adilamar e Alex.

Aos camundongos, que perderam sua vida em prol da ciência.

À Deus. Pai querido. Que eu possa servir como instrumento de sua graça.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pós-graduação concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento dessa pesquisa (Nº 2010/51043-3).

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo”

Vinícius de Moraes

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumo	vi
<i>Abstract</i>	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Prolactina.....	2
1.2 Tipos de prolactina.....	5
1.3 Receptor de prolactina e seu mecanismo de ação.....	5
1.4 Regulação da prolactina.....	9
1.5 Hiperprolactinemia.....	11
1.6 Modelo experimental de hiperprolactinemia.....	13
1.7 Receptores de estrogênio e progesterona.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	22
3.2 Cirurgia e tratamento dos animais.....	22
3.3 Coleta das amostras e extração do RNA total.....	24
3.4 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	25
3.5 qRT-PCR.....	26
3.6 Processamento das amostras e síntese do DNA complementar.....	28
3.7 Análise Estatística.....	32
3.7.1 Análise Inferencial.....	32
3.7.2 Análise descritiva.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para avaliação da expressão transcricional da PRL e de seus receptores na hipófise.....	34
4.2 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para avaliação da	

expressão transcricional da PRL e de seus receptores no útero.....	38
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES.....	54
7 ANEXOS.....	57
7.1 Anexo 1.....	58
7.2 Anexo 2.....	59
7.3 Anexo 3.....	60
7.4 Anexo 4.....	61
7.5 Anexo 5.....	62
8 REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação do receptor de prolactina.....	7
Figura 2 – Regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário.....	10
Figura 3 – Estrutura química da metoclopramida.....	14
Figura 4 - Perfis de qualidade e quantidade das amostras de RNA extraído. Em A, gráfico representativo do perfil das amostras avaliadas no espectrofotômetro e em B, gel de agarose a 1% impregnado com brometo de etídio, mostrando o perfil de integridade das amostras de RNA extraído.....	30
Figura 5 - Géis de agarose a 1% impregnados com brometo de etídio apresentando os <i>amplicons</i> obtidos nas reações de PCR para o gene da <i>β-actina</i> , nos dois tecidos analisados. Em A, amostras de útero. Em B, amostras de hipófise. As setas indicam a migração dos fragmentos em 70pb.....	31
Figura 6 - Géis de agarose a 1% impregnados com brometo de etídeo e os <i>amplicons</i> obtidos nas reações de PCR para os genes da prolactina (100 pb), <i>β-actina</i> (ACTB-70 pb) e os receptores PRLR-L, PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3 (254 pb).....	31
Figura 7 - Representação gráfica da expressão relativa da PRL hipofisária. Os valores de expressão gênica da PRL foram obtidos em relação à <i>β-actina</i> , utilizada como controle endógeno da reação. *p<0,05 comparado com SS, OSS, OM e OME. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol / OMP Ovariectomizados +	

metoclopramida + progestagênio / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol + progestagênio. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo..... 35

Figura 8 – Representação gráfica da expressão relativa das diferentes isoformas do receptor da prolactina na hipófise. Os valores de expressão gênica foram obtidos em relação à β -actina. Em A, isoforma curta PRLR-S1, não houve diferença significativa entre os grupos. B, isoforma curta PRLR-S2 * $p < 0,05$ comparado com SS, M, OSS, OSS e OMEP; ** $p < 0,05$ comparado com OM. Em C, isoforma curta PRLR-S3, não apresentou diferença significativa entre os grupos D, isoforma longa PRLR-L, não houve diferença significativa entre os grupos. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progestagênio / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol + progestagênio. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo..... 37

Figura 9 – Representação gráfica da expressão relativa da PRL no tecido uterino. Os valores de expressão gênica da PRL foram obtidos em relação à β -actina, utilizada como controle endógeno da reação. Não houve diferença significativa entre os grupos. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progestagênio / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol + progestagênio. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo..... 38

Figura 10 - Representação gráfica da expressão relativa das diferentes isoformas do receptor da prolactina no tecido uterino. Os valores de expressão gênica foram obtidos em relação à β -actina. Em A, PRLR-S1 com $*p<0,05$ comparado aos demais grupos. B, PRLR-S2 com $*p<0,05$ comparado aos demais grupos. C, PRLR-S3, $*p<0,05$ comparado com SS, M, OSS e OM. D, PRLR-L, $*p<0,05$ comparado com SS, M, OSS, OM e OME. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progestagênio / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol + progestagênio. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais causas de hiperprolactinemia.....	12
Tabela 2 – Alocação dos animais após divisão randômica em sete grupos....	23
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
Big-big PRL	Macroprolactina
Big PRL	Prolactina de grande peso molecular
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima de degradação de DNA
DIR	Reagente inativado de DNase
DOPA	Dopamina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador de hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
Jak	Janus Quinase
KO	Knock-out
MAO	Monoamina oxidase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mPRL	Prolactina de pequeno peso molecular
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIF	Fator inibidor de prolactina
PRF	Fator estimulante de prolactina
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
PRLR-L	Receptor de prolactina – isoforma longa
PRLR-S1	Receptor de prolactina – isoforma curta1
PRLR-S2	Receptor de prolactina – isoforma curta 2
PRLR-S3	Receptor de prolactina – isoforma curta 3
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Stat	Transdutores de sinal e ativadores da transcrição

Resumo

Amaral, VC. *Expressão gênica da prolactina e seus receptores na hipófise e no útero de camundongo fêmea tratado com metoclopramida* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: A prolactina é um hormônio polipeptídico, que possui reconhecida ação sistêmica, principalmente na fisiologia da reprodução, porém, seu desequilíbrio, em especial a hiperprolactinemia, é cada vez mais frequente na prática clínica. Apesar de ser um distúrbio relativamente comum, ainda existem dúvidas quanto aos efeitos moleculares da hiperprolactinemia no trato genital, particularmente no útero, e também na hipófise. O presente estudo teve por objetivo verificar os efeitos da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na expressão gênica da prolactina e de seus receptores no útero e na hipófise de camundongo fêmea. **MÉTODOS:** Utilizaram-se 49 camundongos fêmeas (Wistar), randomicamente divididas em 7 grupos contendo 7 animais cada: 1) SS não ovariectomizadas que receberam solução salina (veículo); 2) M não ovariectomizadas tratadas com metoclopramida; 3) OSS ovariectomizadas tratadas com solução salina (veículo); 4) OM ovariectomizadas tratadas com metoclopramida; 5) OME ovariectomizadas tratadas com metoclopramida e 17β -estradiol; 6) OMP ovariectomizadas tratadas com metoclopramida e progesterona micronizada; 7) OMEP ovariectomizadas tratadas com metoclopramida, 17β -estradiol e progesterona micronizada. Após 50 dias os animais foram sacrificados sendo retirados o útero e a hipófise de cada animal para extração do ácido ribonucleico total, que foi utilizado para a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar e avaliação da expressão gênica da prolactina e das diferentes isoformas de seus receptores, por reação em cadeia da polimerase em tempo real. **RESULTADOS:** Na hipófise, em animais não ovariectomizados, o tratamento com metoclopramida aumentou a expressão do gene que codifica a prolactina em relação ao tratamento apenas com o veículo. Nos animais castrados, a progesterona isoladamente ou associada ao estrogênio determinou o incremento do RNA mensageiro da prolactina em relação aos outros animais castrados que receberam outras combinações de tratamento. Este efeito foi semelhante ao da metoclopramida em animais com os ovários intactos. Em relação ao receptor de prolactina, o estrogênio e a progesterona, isoladamente, foram responsáveis pelo incremento da isoforma S2. No útero houve aumento na expressão de RNA mensageiro de prolactina após tratamento com metoclopramida ou com tratamento isolado ou combinado de estrogênio e progesterona. A ovariectomia determinou a redução da expressão das isoformas S1 e S2 do receptor de prolactina de todas as isoformas estudadas. Já o tratamento estroprogestativo determinou elevação das formas S3 e L do receptor, enquanto com a progesterona isoladamente causou apenas o incremento da forma L do receptor da

prolactina no útero dos animais castrados. **CONCLUSÕES:** Nossos dados sugerem que o tratamento com metoclopramida altera de forma diferente a expressão de prolactina e de seus receptores quando se compara o resultado da hipófise em relação ao útero em camundongos fêmeas castrados e tratados com esteróides sexuais.

Descritores: Prolactina; Receptores da Prolactina; Hiperprolactinemia; Expressão Gênica; Útero; Hipófise; Camundongos.

Abstract

Amaral, VC. Gene expression of prolactin and its receptors in the pituitary and uterus of the metoclopramide-treated female mouse [dissertation]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2012

INTRODUCTION: Prolactin is a polypeptide hormone with a recognized systemic action mainly on reproductive physiology. However, prolactin imbalance, particularly hyperprolactinemia, is increasingly more frequent in clinical practice. Although it is a comparatively common disorder, there are still doubts about the molecular effects of hyperprolactinemia on the genital tract especially in the uterus and the pituitary. The present study aimed at verifying the effects of metoclopramide-induced hyperprolactinemia on the gene expression of prolactin and its receptors in the uterus and pituitary of the female mouse. **METHODS:** Forty-nine female Wistar mice were randomized to 7 equal-sized groups as follows: 1) SS nonoophorectomized mice treated with saline solution (vehicle); 2) M nonoophorectomized mice treated with metoclopramide; 3) OSS oophorectomized mice treated with saline solution (vehicle); 4) OM oophorectomized mice treated with metoclopramide; 5) OME oophorectomized mice treated with metoclopramide and 17β -estradiol; 6) OMP oophorectomized mice treated with metoclopramide and micronized progesterone; 7) OMEP oophorectomized mice treated with metoclopramide, 17β -estradiol, and micronized progesterone. The animals were sacrificed 50 days after the end of the treatment, and the uterus and pituitary of each animal were removed for extraction of total ribonucleic acid, which was then used for synthesizing complementary deoxyribonucleic acid and for evaluating the gene expression of prolactin and the different isoforms of its receptors by the real-time polymerase chain reaction. **RESULTS:** In the pituitary of the nonoophorectomized mice, the treatment with metoclopramide against that with vehicle alone increased the expression of the prolactin-encoding gene. In the castrated animals, progesterone by itself or in conjunction with estrogen determined a raise in prolactin messenger RNA as opposed to the two other treatments with different combinations. This effect was similar to that produced by metoclopramide in animals with intact ovaries. Estrogen and progesterone, acting independently of each other, were responsible for the increase in the S2 isoform of the prolactin receptor. In the uterus, there was heightened expression of prolactin messenger RNA under the effect of the treatment with metoclopramide or with estrogen and/or progesterone. Oophorectomy caused a greater reduction in expression of the prolactin receptor S1 and S2 isoforms than in the other isoforms. However, the combined estrogen plus progesterone treatment led to an increase in the S3 and L forms of the receptor, while progesterone alone resulted solely in a higher expression of the L form of the prolactin receptor in the endometrium of the castrated mice. **CONCLUSION:** Our data suggest that

metoclopramide treatment induces different changes in the expression of prolactin and its receptors according to whether the effect occurs in the pituitary or the uterus of castrated female mice treated with sex steroids.

Key Words: Prolactin; Prolactin Receptors; Hyperprolactinemia; Gene Expression; Uterus; Pituitary, Mice.

1. Introdução

1.1 Prolactina

A prolactina (PRL) faz parte da família de hormônios bem estabelecida na literatura, a qual inclui, por exemplo, os hormônios de crescimento (GH) (Broutin et al., 2010). Acredita-se que esses hormônios tenham surgido há, aproximadamente, 70 milhões de anos (Rossi et al., 2002). Em 1970, a PRL foi identificada graças à técnica de radioimunoensaio específico para a forma humana. Até então, havia muita dificuldade em distinguir a PRL do GH (Soares Jr e Gadelha, 2004), pois, estes dois hormônios possuem considerável homologia de estrutura e efeitos biológicos (Alonso et al., 2003).

Em humanos, o gene da PRL está localizado no cromossomo seis e existe apenas um membro da família de PRL. Em camundongos, a família da PRL consiste de pelo menos 26 genes agrupados em região de 1 Mb do cromossomo 13 (Ain et al., 2004).

A PRL é constituída por 199 aminoácidos e três pontes bissulfídicas, sendo proteína da família dos hormônios somatotrópicos (Leite et al., 2007). Este mensageiro químico, polipeptídico, é sintetizado e secretado principalmente pela hipófise (Verna et al., 2006).

Os lactótrofos da adeno-hipófise são os responsáveis por sua síntese/secreção e constituem cerca de 20% das células em hipófises normais (Melmed, 2003; Azevedo et al., 2008).

O número de lactótrofos não se modifica com a idade; no entanto, durante a fase tardia da gravidez, ocorre hipertrofia e hiperplasia dessas células, o que faz aumentar, geralmente, o tamanho da hipófise em duas vezes (Rossi et al., 2009).

A PRL também é produzida em locais não hipofisários, como por exemplo, endométrio, decídua, linfócitos, cérebro, mama e próstata. A PRL produzida na hipófise e a não hipofisária possuem estrutura protéica idêntica e sistemas de regulação distintos (Huang e Walker, 2010). Contudo, a fisiologia da PRL hipofisária é mais estudada (Gomes et al., 2009).

Sabe-se que a PRL age tanto em processos reprodutivos como em não reprodutivos. Apesar de apresentar diversas funções biológicas, como equilíbrio hídrico, crescimento e diferenciação celular, regulação da síntese de proteínas e regulação de respostas imunológicas, uma das principais relaciona-se à reprodução (Khodr et al., 2008).

O útero foi um dos primeiros locais extrapituitários descrito como produtor e secretor de PRL (Rossi et al., 2009). Em úteros não gravídicos, a síntese desse hormônio foi detectada no pico das fases secretora e menstrual, coincidindo com os primeiros sinais histológicos de decidualização (Gomes et al., 2009).

Nas glândulas mamárias, atua em sua fisiologia endócrina durante a gravidez e a lactação (Feuermann et al., 2009). Seu principal papel é estimular a produção de leite pela secreção de caseína e de lacto-albumina (Azevedo et

al., 2008). Além disso, a manipulação das mamas, o sono e o estresse também estimulam a secreção de PRL (Leite et al., 2007).

Nos ovários, participa da manutenção do corpo lúteo (Rossi et al., 2009). Esta ação luteotrófica foi evidenciada após se verificar que camundongos com *KK* do receptor de PRL exibem diminuição do ciclo ovulatório e do número de folículos primários (Steger et al., 1998).

Outros órgãos, como cérebro (Alonso et al., 2003), pulmões, baço, fígado, coração e hipófise, expressam o receptor de PRL, no entanto, a função da PRL nestes locais é ainda incerta (Azevedo et al., 2008).

A expressão gênica da PRL que ocorre na hipófise, no endométrio e no miométrio permite a secreção de PRL com características semelhantes, mas há diferenças no RNA mensageiro (RNAm), o que possivelmente está relacionado com diferenças na sua regulação gênica (Rossi et al., 2009).

A regulação da transcrição do gene e a proliferação das células lactotróficas são reguladas pela dopamina (DOPA) e por agonistas dopaminérgicos seletivos que agem por vários mecanismos intracelulares de sinalização (Nahas et al., 2006). Além disso, a transcrição é também regulada por um fator de transcrição (PIT-1) que se liga na região promotora 5', bem como pela interação dos receptores de estrogênio e glicocorticóides com as sequências periféricas da região promotora 5' (Rossi et al., 2009).

1.2 Tipos de prolactina

Por meio da técnica de radioimunoensaio, observou-se que os níveis séricos de PRL nem sempre coincidem com os achados clínicos, pois, devido a alterações pós-traducionais, como diamidação, glicosilação e fosforilação, há heterogeneidade na molécula de PRL circulante (Naliato et al., 2008).

Os principais tipos de PRL encontrados são: 1) a pequena, monomérica (*mPRL*), com peso molecular de aproximadamente 23-kDa, que representa cerca de 80% de toda a PRL dosada no soro; 2) a grande (*big PRL*), dimérica, com peso molecular de aproximadamente 48 a 56-kDa; 3) a de alta peso molecular (*big-big PRL*), usualmente conhecida como macroprolactina, com peso molecular de 150 a 170-kDa, derivada de um complexo antígeno-anticorpo de PRL monomérica e imunoglobulinas; 4) a que resulta da glicosilação da PRL monomérica (glicosilada), com peso molecular de 25kDa; 5) as de 8kDa e 16-kDa que resultam da clivagem da PRL monomérica (Nahas et al., 2006).

1.3 Receptor de prolactina e seu mecanismo de ação

Os efeitos biológicos da PRL são mediados pela interação de seu receptor (PRLR), que está presente em quase todos os tecidos (Binart et al., 2010). Esse receptor, membro da superfamília de receptores do tipo citocina (Bole-Feysot et al., 1998), é expresso principalmente em regiões relacionadas ao metabolismo da reprodução, como o útero e a hipófise.

O PRLR em sua estrutura terciária é composto por feixe de quatro α hélices antiparalelas (transmembrana) de única passagem. É desprovido de atividade enzimática intrínseca, mas pode sofrer fosforilação se associado a enzimas e proteínas (Kossiakoff, 2004).

O gene que codifica o PRLR é composto por três domínios: extracelular, transmembrana e intracitoplasmático. A dimerização desse receptor ocorre quando uma molécula de PRL liga-se a duas de PRLR, ativando a *Jak2*, que fosforila o PRLR e se autofosforila em múltiplas tirosinas. Essas, por sua vez, formam sítios de ligação de proteínas sinalizadoras, entre as quais se destacam as *Stat* 1 a 5 que também são fosforiladas pela *Jak2* antes de se separarem do complexo receptor-*Jak2* e moverem-se para o núcleo, onde ativam a transcrição gênica (Soares Jr e Gadelha, 2004) (Fig. 1).

Fig. 1 – Mecanismo de ação do receptor de prolactina. Adaptado de Soares Jr e Gadelha (2004)

Em síntese, a *Jak2* faz parte das proteínas Janus quinases (*Jak*) e participa da transdução dos receptores de citocinas, destacando-se o PRLR. Por meio de fosforilação, após acoplamento da PRL e dimerização do receptor, a *Jak2* torna-se ativa e fosforila os resíduos tirosina do receptor em sua porção citoplasmática. Em seguida, os transdutores de sinal e ativadores da transcrição (*Stat*) ligam-se a estas tirosinas fosforiladas do receptor e são ativadas. Após esta ativação, dissociam-se do complexo receptor-*Jak2*, homodimerizam-se

com outras *Stats* e migram para o núcleo da célula onde estimulam a transcrição gênica (Naliato et al., 2008).

O evento de sinalização ativa genes responsivos a PRL, resultando em proliferação e diferenciação celular. A interação do PRLR com enzimas ou com proteínas envolvidas na sinalização foi mapeada no domínio citoplasmático (Brockman et al., 2002).

Foram identificadas, em humanos, sete diferentes isoformas do PRLR e, em camundongos, quatro isoformas, sendo que todas possuem diferentes propriedades de sinalização (Binart et al., 2010).

No camundongo as isoformas conhecidas do PRLR são a longa (PRLR-L) e as curtas (PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3). Estas isoformas são produzidas por *splicing* alternativo e compartilham seqüências idênticas de aminoácidos em seus sítios de ligação e nos domínios extracelulares, mas diferem no sinal de transdução (Huang e Walker, 2010), no comprimento e na seqüência do domínio intracelular (Trott et al., 2004).

Muito do que se sabe sobre a sinalização do PRLR vem de análises da PRLR-L. Essa possui como melhor via de sinalização a ativação da *Jak/Stat*, já o mecanismo de sinalização das isoformas curtas ainda é incerto. Devido à ampla distribuição do PRLR no organismo é difícil propor uma visão geral de sua regulação (Bole-Feysot et al., 1998). Mas sabe-se que a expressão de suas isoformas pode variar de acordo com o ciclo estral (Binart et al., 2010).

1.4 Regulação da prolactina

A PLR possui um sistema de controle hipotalâmico inibitório; dentre os fatores inibitórios, destacam-se a DOPA e o ácido gama-aminobutírico (GABA). Estes, por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, alcançam a hipófise e bloqueiam a produção e liberação de PRL (Nahas et al., 2006). Nesse processo, a atividade inibitória da DOPA é significativamente maior que a do GABA, sendo que este último atua somente em resposta a alguns estímulos (Verna et al., 2005).

O sistema DOPA túbero infundibular (TIDA) é responsável pela liberação da DOPA nos vasos portais. O TIDA possui corpos celulares localizados no núcleo arqueado e axônios situados terminalmente na camada externa da eminência mediana. Estes axônios, por sua vez, estão em contato com os capilares portais e liberam a DOPA, que é produto de sua biossíntese, em concentrações suficientes para inibir a secreção de PRL, sendo essa capacidade de inibição demonstrada “*in vitro*” e “*in vivo*” (Rossi et al., 2002).

Fig. 2 – Regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário. Adaptado de Soares Jr e Gadelha (2004)

Apesar de DOPA ser considerada o principal PIF (*prolactin-inhibiting factor*), outros mecanismos intracelulares de sinalização também podem ser considerados como PIFs, como por exemplo: inibição da adenilatociclase e da MAPK; ativação de fosfatases; aumento dos canais de potássio voltagem-dependente e diminuição dos canais de cálcio voltagem-dependente; GABA; somatostatina e calcitonina. Por outro lado, a liberação de PRFs (*prolactin-releasing factors*) também influencia a regulação de PRL, sendo os principais

TRH, ocitocina, GHRH, GnRH, vasopressina, angiotensina II, NPY, galanina e substância P (Soares Jr e Gadelha, 2004).

Processos autócrinos e parácrinos intrahipofisários, estimuladores ou inibidores, também participam da regulação da secreção de PRL, dando a esse hormônio uma característica de controle multifatorial (Freeman et al., 2000).

1.5 Hiperprolactinemia

A hiperprolactinemia caracteriza-se pela persistência de níveis elevados de PRL sérica. Constitui o distúrbio endócrino de hipersercreção mais comum do eixo hipotalâmico-hipofisário (Gomes et al., 2009). Pode ser identificada tanto em homens como em mulheres, atingindo cerca de 1 a 10% da população adulta (Casanueva et al., 2006), mas sua predominância é maior em pacientes jovens do gênero feminino (20-30%) (Rossi et al., 2009). Entre as manifestações clínicas, realçam: distúrbios do ciclo menstrual, amenorréia, galactorréia, infertilidade e diminuição da libido (Casanueva et al., 2006).

Existem diversas causas de hiperprolactinemia. As principais estão assinaladas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais causas de hiperprolactinemia

Tipo	Causas
Fisiológico	Gravidez; amamentação; estresse; manipulação mamária; coito; sono; exercício físico; período neonatal
Farmacológico	Antagonistas dopaminérgicos, como fenotiazinas (lorpromazina), butirofenomas (haloperidol), benzaminas (metoclopramida, sulpiride, velapride); drogas que causam depleção de dopamina, alfa-metildopa e reserpina; estrogênios; hormônio tireotrófico; antidepressivos tricíclicos e os inibidores da MAO; opiáceos; cocaína
Patológico	Tumores hipofisários (prolactinomas, acromegalia, síndrome da sela túrcica vazia, secção da haste hipofisária, tumores não secretores); lesões hipotalâmicas (histiocitose, sarcoidose, granuloma eosinofílico); tumores hipotalâmicos (craniofaringeomas, meningiomas, disgerminoma); radioterapia; hipotireoidismo primário; insuficiências renal crônica, hepática e da supra-renal; lesão neurogênica periférica; lesões da parede torácica (herpes zoster); lesão medular
Idiopático	Sem causa conhecida

O tratamento de escolha da hiperprolactinemia é realizado com agonistas dopaminérgicos. Esses agentes ligam-se aos receptores dopaminérgicos existentes na superfície dos lactótrofos, inibindo a síntese e a liberação de PRL. Haveria, portanto, redução das concentrações séricas desse hormônio (Naliato

et al., 2005). No entanto, há pacientes que não respondem bem ao tratamento, continuando com o problema. Portanto, há necessidade de estudar esta afecção em modelo experimental de animais.

1.6 Modelo experimental de hiperprolactinemia

Se um agonista dopaminérgico é capaz de diminuir o nível de PRL, um fármaco de ação contrária, isto é, um antagonista dopaminérgico, pode aumentar o nível de PRL sérica, levando a um quadro de hiperprolactinemia. Assim, foi demonstrada que a utilização de metoclopramida é eficiente para o desenvolvimento de um modelo de hiperprolactinemia experimental (Faglia, 2001; Rossi et al., 2002; Verna et al., 2006).

A metoclopramida é usada em animais com o propósito de estudar os níveis séricos de PRL e avaliar os efeitos da elevação deste hormônio (Rossi et al., 2002). A sua atuação se dá diretamente sobre a hipófise, aumentando a síntese de PRL (Betzold, 2004) graças ao bloqueio do receptor D2 dopaminérgico (Bernichtein et al., 2010).

A metoclopramida é um fármaco derivado do ácido paraminobenzóico e relacionada com a procainamida. Sua substância química ativa é o cloridrato de N-dietilaminoetil-2-metoxi-4-amino-5-cloro-benzamida (Figura 3) (Laszczynska et al., 2002), sendo sua ação antagônica dopaminérgica promotora do aumento sérico da PRL (Stuczanowska-Glabowska et al., 2010).

Fig. 3 – Estrutura química da metoclopramida (Stuczanowska-Glabowska et al., 2010)

A hiperprolactinemia experimental induzida pela metoclopramida em camundongos fêmeas reduz a síntese de esteróides ovarianos durante a fase de proestro e também a de progesterona na gestação. Sabe-se que as concentrações dos dois tipos de PRLR, o de cadeia curta e o de cadeia longa,

sofrem influência dos níveis séricos dos hormônios sexuais (Kinoshita et al., 2001; Betzold, 2004).

Jones et al. (1998) demonstraram a expressão do PRLR no endométrio. Posteriormente, verificou-se que camundongos fêmeas hiperprolactinêmicos apresentam a histomorfometria, crescimento endometrial durante o diestro (Rossi et al. 2002; Panzan et al., 2006).

Contudo, não foram esclarecidos os reais efeitos da hiperprolactinemia no trato genital, particularmente na expressão do PRLR no endométrio. Assim como também ainda existem dúvidas quanto aos seus efeitos na hipófise. O desenvolvimento de modelos experimentais, capazes de simular essas desordens e verificar sua interação com o estrogênio e a progesterona, é fundamental para a maior compreensão da ação da PRL nesses tecidos (Rossi et al, 2002)

1.7 Receptores de estrogênio e progesterona

Os esteroides sexuais são, por meio de seus receptores, determinantes nos níveis de expressão e secreção de PRL (Norstedt e Mode, 1982; Sakaguchi et al., 1994; Rossi et al., 2009)

Na hipófise, o estrogênio estimula a secreção de PRL e modula a proliferação mitótica dos lactótrofos. Tais mecanismos são mediados pelas duas isoformas de seu receptor, α e β , identificadas em células produtoras de PRL. Porém, o mecanismo de ação de suas isoformas é pouco compreendido

(Kawashima et al., 2002). Sabe-se que o estrogênio se liga as duas isoformas de seu receptor com afinidade muito similar e regula a expressão de proteínas em nível genômico, sendo que grande parte da atividade do estrogênio é exercida pela isoforma α , envolvida na ativação e proliferação dos lactótrofos e secreção da PRL (Chen et al., 2009; Gutiérrez et al., 2010).

Na hipófise de camundongos, o receptor de estrogênio α é mais expresso que o receptor β (Ogasawara et al., 2009). Está bem definido que nesses animais a isoforma α participa ativamente da homeostase dos lactótrofos mesmo na ausência do estrogênio (Kansra et al., 2010).

A alta incidência de prolactinomas em mulheres, o elevado número de lactótrofos na gestação e a expressão do receptor de estrogênio em tumores hipofisários são evidências clínicas da influência da ação desse componente na saúde feminina (Bem-Jonathan et al., 2009).

Quanto ao receptor de progesterona hipofisário, sabe-se que pertence à superfamília de receptores ligantes induzíveis de fator de transcrição. Sua principal ação é coordenar, em nível molecular, a expressão de genes relacionados à reprodução (Tabibzadeh et al., 1995).

Na ausência de um ligante, o receptor de progesterona é mantido em um complexo inativo contendo proteínas de choque térmico. Quando o ligante se aproxima ocorre mudança do receptor, dissociação das proteínas de choque térmico, dimerização e conexão com glicorticóides na região promotora de genes alvos (Blesson et al., 2012). Sabe-se que o principal foco desse receptor

na hipófise é o ajuste fino da secreção de gonadotrofina durante o ciclo estral (Stefaneanu, 1997).

Outro tecido que necessita da presença do estrogênio e da progesterona para manutenção da função reprodutora é o endométrio. Nessa região os esteróides sexuais agem por meio da ação de seus receptores, os quais respondem a estímulos de modulação gênica (Blesson et al., 2012).

No útero o estrogênio apresenta duas isoformas de seu receptor, α e β . Por meio dessas isoformas, esse esteróide participa ativamente na manutenção da fertilidade e da reprodução, além do controle da expressão de importantes genes, como o da PRL (Gowri et al., 2007). A proliferação uterina também está sob controle desse hormônio, principalmente mediada por sua isoforma α (Möller et al., 2010).

A progesterona também estimula a secreção de PRL no útero. O receptor desse hormônio tem sua expressão regulada pelos compartimentos estromais e epiteliais nesse órgão. O estímulo para secreção de PRL permite controle do mecanismo de decidualização, principalmente no primeiro trimestre de gestação, sendo que sua ablação, em camundongos, pode resultar em infertilidade (Liew et al., 2011).

Em ginecologia endócrina, o número de pesquisas relacionadas à PRL é proporcional à importância desse hormônio na manutenção da saúde. Contudo, estudos sobre os mecanismos envolvidos na expressão gênica desse hormônio e do PRLR, assim como a influência dos esteroides ovarianos nesse contexto,

são necessários para ampliar a fundamentação no tratamento de mulheres com hiperprolactinemia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Analisar, em camundongos fêmeas adultos castrados, o efeito da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na expressão de prolactina e seus receptores no útero e na hipófise.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de prolactina e de seus receptores na hipófise e a influência dos esteróides sexuais;
- Avaliar a expressão de prolactina e de seus receptores no útero e a influência dos esteróides sexuais.

3. Métodos

Este estudo foi, primeiramente, submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPESQ-HCFMUSP / Termo de aprovação N° 0413/09 - Anexo 1).

3.1 Animais

Foram utilizados quarenta e nove camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, virgens, com aproximadamente 100 dias e peso médio de 30 gramas. Os animais foram confinados em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), com tampa gradeada de metal, com alimentação e água *ad libitum*. O local foi mantido em temperatura ambiente de 22°C, com iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes (*Phillips* 40W), com fotoperíodo intercalado de 12 h/claro e 12 h/escuro, considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 horas.

3.2 Cirurgia e tratamento dos animais

Todos os animais foram previamente submetidos a exames colpocitológicos, por sete dias, para caracterização do ciclo estral. Em seguida, realizou-se ovariectomia em 35 deles, que foram anestesiados com Cetamina® (30mg/kg, *König*) e Xilazina® (5mg/kg, *Syntec*) por via intraperitoneal. Realizou-se tricotomia, incisão longitudinal e abertura da cavidade abdominal. Os ovários e as porções distais dos cornos uterinos

foram isolados do depósito de gordura periovariana, removendo-se em seguida os ovários. A seguir, a ferida cirúrgica foi suturada e os animais foram mantidos em gaiolas por 20 dias. Após esse período de adaptação pós-cirúrgica, foram submetidos ao tratamento com os diferentes compostos.

Os animais ovariectomizados foram, randomicamente (Wittes, 2002), divididos em cinco subgrupos, contendo sete animais cada. Os animais com ovários intactos foram também, randomicamente, divididos em dois grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Alocação dos animais após divisão randômica em sete grupos

Grupo	Tratamento	Nº de animais
SS	Não ovariectomizados que receberam solução salina (veículo)	7
M	Não ovariectomizados tratados com metoclopramida	7
OSS	Ovariectomizados tratados com solução salina (veículo)	7
OM	Ovariectomizados tratados com metoclopramida	7
OME	Ovariectomizados tratados com metoclopramida e 17 β -estradiol	7
OMP	Ovariectomizados tratados com metoclopramida e progesterona micronizada	7
OMEP	Ovariectomizados tratados com metoclopramida, 17 β -estradiol e progesterona micronizada	7

Os fármacos e o veículo foram administrados concomitantemente nos respectivos grupos, utilizando o volume de 100 μ L (0,1ml) por solução,

durante 50 dias consecutivos, por via subcutânea. A dose diária de metoclopramida (*Sigma®*) foi de 200µg em solução salina a 0,9%. O 17β-estradiol (*Sigma®*) e a progesterona micronizada (*Sigma®*) foram administrados em solução oleosa, em doses diárias de 1µg e 1mg, respectivamente (Baraño et al. 1991; Rossi et al., 2009).

No último dia, 1h após a administração das soluções, os animais foram eutanasiados com auxílio de guilhotina, exceto os que não se encontravam na fase de proestro (não ovariectomizados), que continuaram a receber as soluções até entrarem nessa fase.

3.3 Coleta das amostras e extração do RNA total

Após os animais serem sacrificados, o sangue foi coletado e centrifugado para separação do soro, que em seguida foi transferido para tubos criogênicos (separados por grupos) e armazenados em freezer a -20⁰ C para posterior determinação da concentração sérica de 17β estradiol, progesterona e prolactina pelo método de Radioimunoensaio. Posteriormente, o útero e a hipófise foram retirados para a extração do RNA total utilizando-se o protocolo do *Trizol* (*Lifetechnologies-USA*).

As amostras de tecido foram trituradas em homogenizador de tecidos (*Politron-USA*), após a adição de 1ml de *Trizol* para cada 100mg de tecido. Após a ruptura das células, a mistura permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 0,2 ml de Clorofórmio (para cada 1 ml de *Trizol* inicial) à mistura com centrifugação a 12.000xg por

15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA total foi separada da fase orgânica, misturada com 0,5 ml (para cada 1 ml de *Trizol* inicial) de Isopropanol e incubada por 16 horas a – 20° C.

No passo seguinte, a mistura foi centrifugada a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O precipitado contendo o RNA total foi lavado com 1ml de Etanol 75% gelado (para cada 1ml de *Trizol* inicial), novamente centrifugado, e após secar a temperatura ambiente por 15 minutos foi ressuspendido em água *MilliQ*. A mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos com homogeneização constante para total dissolução do precipitado. A solução contendo o RNA foi estocada a – 80°C até o momento de uso.

3.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Antes de proceder à síntese do cDNA, o RNA total foi tratado com *DNase I* (*Promega*) para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Nessa etapa foram utilizados 4µg do RNA e seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Foram adicionados 10% do *DNase I Buffer* ao RNA e 1µl de *DNase I*. A mistura foi incubada por 20min a 37°C. Decorrido o período de incubação a reação foi inativada com o DIR (*DNase Inactivation Reagent*) à temperatura ambiente e centrifugada por 1,5 minutos a 12.000xg. O sobrenadante contendo o RNA tratado foi transferido para um tubo novo e armazenado a – 80° C.

O RNA foi purificado utilizando o *kit RNeasy mini* (*Qiagen*) para eliminar qualquer tipo de contaminação residual decorrente do processo de

extração. Para isso, ajustou-se o volume da amostra para 150 µl com H₂O *RNase-free*, adicionou-se 700 µl de tampão RLP e 500 µl de etanol 96%. A mistura foi depositada nas colunas, seguiu-se centrifugação por 15 segundos a 8.000xg. O RNA ligado a coluna foi lavado com 500 µl de tampão, centrifugado e o líquido descartado. Preparou-se o etanol 80% com a H₂O *RNase-free* (*kit*) para adição de 14 µl ao tubo, centrifugando à velocidade máxima por 1 minuto.

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2µg de RNA total utilizando o *kit Hi Capacity Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, USA)*, seguindo as instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20° C.

3.5 qRT-PCR

Os cDNAs obtidos foram submetidos a PCR convencional utilizando pares de iniciadores específicos para o gene de *β-actina* (Tabela 3). Após análises dos fragmentos em géis de agarose (*Invitrogen*), os cDNAs foram submetidos à reação de qRT-PCR.

Realizou-se a padronização das reações com os iniciadores específicos para a isoforma longa do receptor de prolactina (PRLR-L), para as isoformas curtas (PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3) e para o gene de prolactina (PRL) (Tabela 3).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR

Primer	Seqüência (5' - 3')	TA (pb)
PRL	<i>Senso</i> – AAT TAG CCA GGC CTA TCC TGA AG <i>anti-senso</i> – GGA TGG AAG TTG TGA CCA AAC A	100
PRLR	<i>Senso</i> – AAG CCA GAC CAT GGA TAC TGG AG	254
PRLR-L	<i>anti-senso</i> – AGC AGT TCT TCA GAC TTG CCC TT	254
PRLR-S1	<i>anti-senso</i> – AAC TGG AGA ATA GAA CAC CAG AG	254
PRLR-S2	<i>anti-senso</i> – TCA AGT TGC TCT TTG TTG TGA AC	254
PRLR-S3	<i>anti-senso</i> – TTG TAT TTG CTT GGA GAG CCA GT	254
β -actina	<i>Senso</i> – AAT TGT GGC TGA GGA CTT TG3' <i>anti-senso</i> – CAC AGA AGC AAT GCT GTC AC	70

Foi avaliada a expressão de prolactina nos tecidos uterino e hipofisário utilizando-se como amostra referência mistura de RNA de cérebro de camundongas. Os cálculos de expressão dos transcritos foram realizados utilizando o método de Pfaffl (2001).

Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação por PCR foram desenhados utilizando o programa *Primer Express 3.0* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). As condições para construção de cada *primer* foram: (1) cruzar os limites intron-exon; (2) temperatura de anelamento entre 58-60°C; (3) 15-30 pares de base e (4) manter uma porcentagem entre 30-80%

de bases G e C. Todos os *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technology (*DNA Technologies, Coralville, IA, USA*).

Os valores relativos à amplificação do RNAm referentes a cada gene foram estudados e avaliados pela mensuração da fluorescência, quantificados por termociclador e detector *ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*, comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. Após padronização da quantidade de DNAc e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, com 450 nM de *primers* e *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. O gene da beta actina foi selecionado como controle interno para corrigir a variabilidade nas amplificações. O DNAc foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1 ciclo a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelamento). Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno e a quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método de Pfaffl, 2001.

3.6 Processamento das amostras e síntese do DNA complementar

Assim, decorrido o período de 50 dias de tratamento, os animais foram sacrificados, retirando-se a hipófise e o útero. Posteriormente, estes tecidos foram processados para avaliação da expressão gênica da PRL e PRLR. Após a extração do RNA total, as amostras foram quantificadas em

espectrofotômetro para avaliar sua concentração e pureza (Fig. 4A). Foi feita ainda a análise do perfil de integridade do RNA por eletroforese em géis de agarose (Fig. 4B). As mostras apresentaram quantidade e qualidade adequadas para serem utilizadas nas reações de PCR em tempo real.

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2 μ g do RNA total de fragmentos de útero e hipófise, previamente tratadas com *DNase I* para eliminar possível contaminação com DNA genômico. A eficiência da síntese de cDNA e do tratamento com a *DNase I* foram avaliadas por PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da β -actina (Fig. 5A e B). Como podem ser visualizadas nas figuras, as reações resultaram na amplificação de banda única de 70pb, correspondente ao *amplicon* gerado pelos iniciadores utilizados na reação, em todas as amostras testadas.

Antes das reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene da PRL e de PRLR foram testados em reações de PCR convencional utilizando como DNA molde mistura de amostras de cérebro de camundongos (Fig. 6). Essas reações foram realizadas com o intuito de padronizar as temperaturas de anelamento dos iniciadores e avaliar a especificidade dos mesmos. A Figura 6 mostra a migração dos fragmentos obtidos para os genes da PRL (100 pb), de seus receptores (PRLR-L, PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3, todos com 254 pb) e da β -actina (ACTB, 70 pb). Todos os iniciadores amplificaram único fragmento e todos com o tamanho esperado.

Fig. 4 – Perfis de qualidade e quantidade das amostras de RNA extraído. Em A, gráfico representativo do perfil das amostras avaliadas no espectrofotômetro e em B, gel de agarose a 1% impregnado com brometo de etídio, mostrando o perfil de integridade das amostras de RNA extraído

Fig. 5 – Géis de agarose a 1% impregnados com brometo de etídio apresentando os *amplicons* obtidos nas reações de PCR para o gene da β -actina, nos dois tecidos analisados. Em A, amostras de útero. Em B, amostras de hipófise. As setas indicam a migração dos fragmentos em 70pb

Fig. 6 – Géis de agarose a 1% impregnados com brometo de etídeo e os *amplicons* obtidos nas reações de PCR para os genes da prolactina (100 pb), β -actina (ACTB-70 pb) e os receptores PRLR-L, PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3 (254 pb)

3.7 Análise Estatística

3.7.1 Análise inferencial

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de variância de ANOVA, complementando-se com o teste do *post-hoc* de *Tukey-Kramer*. Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade. As análises foram efetuadas empregando-se o programa *GraphPad Prism5*.

3.7.2 Análise descritiva

Os resultados foram agrupados. Posteriormente, foi analisada a homogeneidade em cada grupo de tratamento para cada resultado específico, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) (*GraphPad Prism5*). Em seguida, os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, tanto nas figuras quanto no texto.

4. Resultados

4.1 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para avaliação da expressão transcricional da PRL e de seus receptores na hipófise

As reações de qRT-PCR permitiram detectar a expressão da PRL em todos os grupos analisados (Fig. 7). Os animais com ovários intactos que receberam solução salina (SS) apresentaram menor quantidade de transcrito ($0,67 \pm 0,009$), quando comparado ao grupo com ovários intactos que recebeu metoclopramida (M) ($0,75 \pm 0,001$ $p < 0,005$). Dentre os animais ovariectomizados, as maiores expressões de PRL foram observadas nos grupos OMP ($0,77 \pm 0,04$) e OMEP ($0,76 \pm 0,01$), com diferença significativa quando comparado com os grupos SS ($0,67 \pm 0,09$), OSS ($0,67 \pm 0,02$) e OM ($0,66 \pm 0,01$) ($p < 0,05$). O grupo OMP também mostrou diferença significativamente maior em relação ao grupo OME ($0,70 \pm 0,02$) ($p < 0,05$).

Fig. 7 – Representação gráfica da expressão relativa da PRL hipofisária. Os valores de expressão gênica da PRL foram obtidos em relação à β -actina, utilizada como controle endógeno da reação. * $p < 0,05$ comparado com SS, OSS, OM e OME. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progesterona / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol + progesterona. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo

Os resultados da expressão do receptor de prolactina na hipófise revelaram que as isoformas avaliadas (PRLR-S1, PRLR-S2, PRLR-S3, PRLR-L) foram expressas em todos os animais de todos os grupos analisados (Figura 8A, B, C e D). A isoforma PRLR-S1 não apresentou diferença de expressão entre os diferentes grupos (Anexo 3).

Para a isoforma do receptor PRLR-S2, o grupo SS ($0,43 \pm 0,02$) não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo M ($0,42 \pm 0,01$). Também não foi observada diferença entre esses dois grupos quando

comparados aos grupos OSS ($0,39 \pm 0,01$), OM ($0,30 \pm 0,04$) e OMEP ($0,40 \pm 0,04$). Por outro lado, as maiores quantidades de transcritos para PRLR-S2 ocorreram nos animais ovariectomizados em que os esteróides sexuais foram ministrados isoladamente (OME e OMP). O grupo OME apresentou expressão de $0,61 \pm 0,14$, sendo estes valores significativamente maiores do que os dos 5 grupos SS, M, OSS, OM e OMEP ($p < 0,05$). O grupo OMP apresentou maior expressão ($0,50 \pm 0,08$) em comparação ao grupo OM ($p < 0,05$) (Fig. 8B).

A expressão das isoformas PRLR-S3 e PRLR-L, tanto nos animais com ovários intactos quanto nos castrados, não apresentou diferença entre si (Fig. 8C e 8D, Anexo 3).

Fig. 8 - Representação gráfica da expressão relativa das diferentes isoformas do receptor da prolactina na hipófise. Os valores de expressão gênica foram obtidos em relação à β -actina. Em A, isoforma curta PRLR-S1, não houve diferença significativa entre os grupos. B, isoforma curta PRLR-S2 * $p < 0,05$ comparado com SS, M, OSS, OSS e OMEP; ** $p < 0,05$ comparado com OM. Em C, isoforma curta PRLR-S3, não apresentou diferença significativa entre os grupos. D, isoforma longa PRLR-L, não houve diferença significativa entre os grupos. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progesterona / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol + progesterona. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo

4.2 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para avaliação da expressão transcricional da PRL e de seus receptores no útero

No tecido uterino, observou-se que o RNAm da PRL foi expresso em todos os grupos experimentais, entretanto não houve diferenças estatísticas entre eles (Fig 9, Anexo 4).

Fig. 9 - Representação gráfica da expressão relativa da PRL no tecido uterino. Os valores de expressão gênica da PRL foram obtidos em relação à β -actina, utilizada como controle endógeno da reação. Não houve diferença significativa entre os grupos. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progesterona / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17β estradiol + progesterona. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo

Os resultados do qRT-PCR mostraram que houve expressão das quatro isoformas do receptor de prolactina (PRLR-S1, PRLR-S1, PRLR-S3, PRLR-L) no endométrio (Fig. 10A, B, C e D). Com referência à isoforma PRLR-S1 não houve diferença entre o grupo SS ($3,40 \pm 2,29$) e o grupo M ($3,39 \pm 2,37$). Porém, nos animais ovariectomizados, identificou-se maior expressão no grupo OSS ($11,87 \pm 6,13$) em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 10A).

A isoforma PRLR-S2 revelou expressão maior no grupo M ($6,79 \pm 2,99$) quando comparada ao SS ($4,97 \pm 2,07$ $p < 0,05$). Nos grupos de animais ovariectomizados os valores médios de expressão obtidos foram de $6,28 \pm 3,16$ no grupo OSS; $2,87 \pm 1,19$ no OM; $2,68 \pm 0,72$ no OME; $1,66 \pm 1,03$ no OMP e de $1,17 \pm 0,40$ no grupo OMEP. Diferença estatística pôde ser observada quando se compararam os grupos M e OSS (maiores valores de expressão do gene) com os demais grupos ($p < 0,05$) (Fig. 10B).

Para a isoforma PRLR-S3, não houve diferença significativa de expressão no grupo SS ($2,85 \pm 1,89$) em comparação ao M ($3,06 \pm 1,71$). A maior expressão pôde ser observada no grupo OMEP ($6,10 \pm 0,11$, $p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos analisados (Fig. 10C, Anexo 4).

Para a PRLR-L, os animais que não foram ovariectomizados apresentaram valores de expressão de $1,77 \pm 0,48$ no grupo SS e $1,86 \pm 0,47$ no M. Os grupos ovariectomizados revelaram valores de $1,72 \pm 0,73$ no grupo OSS; $2,18 \pm 0,34$ no OM; $1,91 \pm 0,22$ no OME; $3,42 \pm 0,83$ no OMP e $3,10 \pm 1,13$ no grupo OMEP. Observou-se que as maiores quantidades de transcritos para esse gene ocorreu nos grupos OMP e OMEP, sendo essa diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 10D).

Fig. 10 - Representação gráfica da expressão relativa das diferentes isoformas do receptor da prolactina no tecido uterino. Os valores de expressão gênica foram obtidos em relação à β -actina. Em A, PRLR-S1 com $*p < 0,05$ comparado aos demais grupos. B, PRLR-S2 com $*p < 0,05$ comparado aos demais grupos. C, PRLR-S3, $*p < 0,05$ comparado com SS, M, OSS e OM. D, PRLR-L, $*p < 0,05$ comparado com SS, M, OSS, OM e OME. Grupos: SS Solução Salina / M Metoclopramida / OSS Ovariectomizados + solução salina / OM Ovariectomizados + metoclopramida / OME Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol / OMP Ovariectomizados + metoclopramida + progesterona / OMEP Ovariectomizados + metoclopramida + 17 β estradiol + progesterona. A linha tracejada representa valor de referência de cérebro de camundongo.

4. Discussão

Em nosso estudo, identificamos a expressão do gene da PRL e do seu receptor tanto na hipófise quanto no útero de camundongos fêmeas. Contudo, houve comportamento diferente nesses dois tecidos em relação ao tratamento com metoclopramida. Na hipófise, esse fármaco determinou aumento da expressão do gene relacionado com a produção de PRL, o que não ocorreu no útero. Além disso, o comportamento da produção de RNA mensageiro dos receptores de prolactina após o tratamento hormonal também foi diferente na hipófise em relação ao útero.

O modelo de hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida foi preconizado por Singtripop et al. (1991) e, posteriormente, empregado por diversos pesquisadores que também constataram incremento importante nos níveis séricos de PRL (Rossi et al., 2002; Verna et al., 2005; Panzan et al., 2006; Verna et al., 2006; Gomes et al., 2009; Rossi et al., 2009). Nesses modelos experimentais, o fármaco empregado determinou aumento tanto da hipófise, como dos lactótrofos. Nossos dados sobre a expressão gênica mostraram que a metoclopramida aumentou o RNA mensageiro do gene responsável pela produção de PRL na adeno-hipófise. Estes achados reforçam o modelo da metoclopramida no desenvolvimento da hiperprolactinemia experimental. Todavia, deve-se salientar que maiores expressões do gene da PRL ocorreram nos animais com ovários intactos. Possivelmente há algum fator ou hormônio ovariano que seja crucial para este aumento que não sejam o estrogênio e/ou a progesterona. Este fenômeno já foi anteriormente identificado em outros trabalhos da literatura (Gomes et al., 2009; Rossi et al., 2009).

Aparentemente, o mecanismo que a metoclopramida determina a elevação da produção de PRL é indireto. Este fármaco é antagonista específico do receptor de dopamina (D_2) na hipófise. Sabe-se que existem dois tipos de D_2 na membrana dos lactótrofos, o longo (D_{2L}) e o curto (D_{2C}). Em ambos, a metoclopramida bloqueia ação da dopamina. Salienta-se que esta catecolamina se liga a esses receptores e, por ativação da via *MAPK* quinase, estimula apoptose nos lactótrofos, bloqueando a produção de PRL (Iwanaga et al., 2011). Assim, redução da ação antagonista da metoclopramida determinaria redução da repressão da produção, bem como declínio na apoptose. Este fato pode levar também a proliferação dos lactótrofos, como já foi observado em trabalhos anteriores (Gomes et al., 2009; Iwanaga et al., 2011; Radl et al., 2011).

Salienta-se ainda que a ação da metoclopramida na hipófise é menor nos animais castrados sem reposição hormonal. Este fato mostra que os esteróides sexuais ovarianos são importantes na modulação da elevação de PRL, principalmente, a progesterona (Gomes et al., 2011). Notamos que nos animais castrados tratados com a progesterona houve incremento significativo do RNA mensageiro da PRL. Este efeito é maior do estrogênio isoladamente. Este dado, em parte, parece conflitante com a literatura que mostra que o estrogênio como fator importante para a hiperprolactinemia (Susuki et al, 2008).

Existem relatos para justificar a ação da progesterona na expressão da PRL hipofisária. De fato, Guivach'h et al. (2011) observaram que o aumento na concentração sérica de progesterona e de 17β estradiol

modulou o processamento de remoção de *íntrons* e junção de *éxons* (*splicing*) na transcrição do RNA mensageiro dos D₂. Nesse estudo, os hormônios sexuais inibiram a ativação desses receptores. Isso fez com que a DOPA não se acoplasse na membrana dos lactótrofos que, por sua vez, produziram mais PRL. O mecanismo dessa inibição não é certo, mas acredita-se que esteja relacionado a um *feedback* positivo entre a concentração de esteróides ovarianos e estímulo hipotalâmico. Segundo os autores, no *feedback* esteróide-hipotálamo o aumento do nível sérico de esteróides ovarianos pode determinar aumento na produção de PRL.

Ogasawara et al. (2009) demonstraram que o estrogênio é capaz de estimular a produção de PRL sem a necessidade de outros fatores hipofisários em fetos de camundongos. Há uma série de células na hipófise que, na fase fetal, transformam-se em células produtoras de PRL em resposta ao estrogênio.

É sabido que a ovariectomia pode levar a diminuição da produção de PRL e consequentemente do número de lactótrofos (Yin e Arita, 2000). Fortes evidências apontam que o estrogênio altera a atividade da DOPA em rápidas escalas de tempo. O estrogênio via receptores de membrana, também altera síntese e liberação de DOPA pelos neurônios dopaminérgicos (Jacobs e D'Esposito, 2011). Yin e Arita (2000) observaram a importância dos receptores de estrogênio ao verificarem que animais ovariectomizados submetidos ao tratamento com 17 β estradiol desenvolveram hiperprolactinemia por hiperplasia dos lactótrofos.

Susuki et al. (2008) verificaram que o 17β estradiol, a progesterona, ou a combinação de ambos os fármacos influenciaram série de genes na hipófise de camundongo, incluindo o da PRL. Os esteróides sexuais incrementaram o nível de RNA mensageiro do fator de transcrição *Stat5A*. Em maior quantidade o *Stat5A* moveu-se para o núcleo do lactótrofos, onde ativou a transcrição de PRL. Apesar desse achado, não foi atribuída ação isolada da progesterona na ativação do gene da PRL.

A relação da progesterona com o eixo hipotálamo-hipófise também foi estudada por Piroli et al. (2001). Esses autores verificaram o efeito do esteróide sexual na regulação de galanina (fator liberador de PRL) e na expressão gênica de PRL. Concluíram que a progesterona diminuiria a produção de galanina, porém a amplitude dessa mudança não foi suficiente para alterar a quantidade de RNA mensageiro da PRL. Contudo, nossos dados sugerem que a progesterona aumenta também a expressão do RNA mensageiro da PRL o que não foi visto neste estudo.

Apesar dos relatos anteriores, segundo Chaturvedi e Sarkar, (2008), na hipófise, ao se comparar progesterona com estrogênio, não se esperaria superioridade do primeiro hormônio no estímulo de produção da PRL em relação ao outro. Isto não foi verificado com nossos dados, nem com outros investigadores.

Johren et al (1997) realizaram reposição com progesterona em animais ovariectomizados. Concluíram que este esteróide aumentou a produção de PRL por inibição dos receptores hipofisários de Angiotensina II (Ang). Em condições normais, os receptores de Ang estimulam a liberação

de DOPA pelo hipotálamo na via túbero-infundibular. A progesterona reduziu a expressão do receptor de Ang nessa região, permitindo maior produção de PRL. Este seria um possível mecanismo que explicaria a maior expressão de PRL nos animais castrados e que receberam progesterona.

Outra possível explicação para nosso achado pode estar no sistema imunológico. Baraño et al. (1991) verificaram em animais ovariectomizados tratados com progesterona isolada, que a diminuição do 17β estradiol prejudicou a funcionalidade do macrófago e do linfócito, deixando os camundongos fêmeas imunossuprimidos e com déficit no metabolismo oxidativo. A depressão metabólica poderia diminuir atividade dos neurônios dopaminérgicos hipofisários e, conseqüentemente, haveria menor secreção desse antagonista dos lactótrofos.

Em nosso trabalho, supomos que pode ter ocorrido mecanismo compensatório. A possível imunossupressão e alteração do metabolismo oxidativo, por diminuição de 17β estradiol, pode ter levado à maior produção de PRL pelos lactótrofos. De fato a PRL é um fator de crescimento de células do sistema imunológico. Animais imunossuprimidos podem apresentar maior concentração de PRL sérica, uma vez que a PRL estimula a função dessas células de defesa, porém esse mecanismo é incerto (Dorshkind et al., 2000).

Há ainda indícios que a metoclopramida e a progesterona poderiam atuar na mesma via de sinalização celular, muito provavelmente, por estimularem as proteínas *Stat5A*, quinases *Src* e fosfatidilinositol-3 (*PI3K*)/*AKT*, pela via das proteínas *Nek3-vav2-Rac1* e que na fase final

poderiam influenciar também a *Mapk*. A combinação desses fatores pode levar ao aumento da expressão de PRL na hipófise (Goffin et al, 2002).

Para os mesmos autores duas classes de receptores, citocina e tirosinas quinases, realizam a transdução de sinais por meio de suas proteínas tirosino-quinases intrínsecas ou associadas. Todas as citocinas são constituídas de quatro α hélices que estão dobradas em um arranjo característico e estão intimamente associadas a uma proteína *Jak*. A via *Jak/Stat* funciona em cascata a partir dos receptores citocina e tirosino-quinase. Monômeros *Stat* ligados aos receptores são fosforilados pelas Jaks associadas aos receptores; então, dimerizam e se deslocam para o núcleo, onde ativam a transcrição. Após translocação para interior nuclear, a *MAPK* quinase pode regular a transcrição e a expressão da PRL.

Nossos dados sobre a análise da expressão dos PRLR hipofisários mostram que tanto os animais tratados com metoclopramida associada ao estrogênio quanto os tratados com metoclopramida associada a progesterona, apresentaram maior expressão da isoforma curta do receptor de prolactina. Segundo Goffin et al. (2002), a via de sinalização da isoforma curta do receptor de prolactina tem pouca ação biológica. Na hipófise a PRL age preferencialmente por sinalização isoforma longa de seu receptor, que também é mais abundante e desempenha papel mais importante na regulação da biologia celular. O aumento da isoforma curta do receptor de PRL não traria modificações expressivas na secreção de PRL, pois o grande regulador das vias de sinalização (*Stat5A*, *Src kinase*, *PI3K/AKT*, *Nek3-vav2-*

Rac1 e *Mapk*) da PRL é a isoforma longa. Portanto, o tratamento estrínico ou estroprogestativo determina diminuição da atividade de PRL na hipófise.

Em nossos achados, a expressão aumentada da isoforma curta do PRLR hipofisário foi mais evidente em animais tratados com estrogênio do que com progesterona. A relação entre o estrogênio e a produção de PRL está bem elucidada na literatura. Palm et al. (2001) observaram que o aumento crônico no nível sérico de 17β estradiol estimula a secreção de prolactina por um complexo mecanismo hipotalâmico não totalmente definido.

Kansra et al. (2010) afirmam que a expressão do PRLR é controlada por um complexo sistema regulatório em nível transcricional governado por múltiplos promotores. No trabalho realizado por esses autores, o 17β estradiol promoveu aumento na quantidade de transcritos de RNAm do PRLR agindo diretamente sobre os promotor transcricional *Stat5A*. Tal mecanismo foi encontrado tanto na isoforma curta quanto na longa do PRLR.

Nossos dados sugerem que a isoforma PRLR-S2 hipofisária foi a mais influenciada pela ação do estrogênio. Contudo, os resultados sobre a expressão do gene da PRL mostra que o estrogênio isoladamente não determinou efeito parecido. Essa discordância provavelmente ocorreu porque utilizamos metoclopramida, e a ação antagônico-dopaminérgica desse fármaco transcorreu independente das concentrações de estrogênio ou progesterona.

Quanto aos resultados encontrados no útero, a PRL foi expressa em todos os grupos de estudo, contudo não houve diferença entre eles quanto à intensidade de expressão, ou seja, a metoclopramida e a aplicação de esteróides ovarianos não determinaram aumento na expressão gênica nesse tecido, sendo inverso ao que foi visto na hipófise. Segundo Jones et al. (2002), no útero a PRL pode ser produzida na decídua, no citotrofoblasto coriônico, trofoblasto placentário e no epitélio amniótico. Além disso, o compartimento estromal e glandular do endométrio foram identificados como produtores de PRL. Acredita-se no papel da PRL no preparo do endométrio para implantação do ovo, na modulação da atividade imune e na regulação de fatores envolvidos na proliferação trofoblástica.

Sabe-se que o local de ação da metoclopramida é o eixo hipotálamo-hipófise, e não o útero (Iwanaga et al., 2011). Esse eixo é a principal estrutura que controla a liberação de PRL no organismo (Cone et al., 2003). Por outro lado, no endométrio, espera-se que a PRL seja expressa no pico das fases secretora e menstrual, coincidindo com os primeiros sinais histológicos de decidualização (Rossi et al., 2002). No nosso estudo, os animais foram sacrificados em fase folicular (proestro), portanto os dados relativos à expressão de PRL uterina são condizentes com a literatura.

Os efeitos da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na morfologia uterina já foram descritos por alguns investigadores em nosso meio. Rossi et al. (2002) verificaram crescimento endometrial exagerado em animais com hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida durante a fase de diestro e associou este efeito a redução de número de corpos lúteos

de camungongos fêmeas. Além disso, Panzam et al. (2006) observaram diminuição da produção de progesterona, do número de pinopódios e do número de implantações embrionárias no endométrio de ratas. Estes fatos sugerem diminuição de fertilidade destes animais tratados com metoclopramida. Gomes et al. (2009) verificaram que a hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida levou à intensa proliferação em todas as camadas uterinas, endométrio e miométrio, com incremento expressivo do número de células, de mitoses, bem como aumento da espessura do epitélio luminal, bem como glandular. Além disso, estes autores também observaram aumento de eosinófilos no estroma endometrial o que sugerem forte ação estrínica.

No útero, segundo Binart et al. (2010), eventos de sinalização do PRLR nas isoformas curta 3 e longa induzem genes envolvidos em proliferação e diferenciação celular, como ocorre com o *IFN-regulated gene 1* que é da mesma família do P27 de camundongos. Esse processo ocorreria em sinergismo com os esteróides sexuais no início da fase de implantação. De fato nosso trabalho identificou grande expressão dessas isoformas nesse tecido, o que complementaria a explicação das modificações morfológicas encontrada nos trabalhos anteriores (Rossi et al., 2002; Panzam et al., 2006; Gomes et al., 2009).

Nos últimos anos, mais de 300 funções da PRL foram identificadas em várias espécies de animais, mas ainda existe dúvida sobre qual delas possui relevância para os humanos, pois ainda não foram identificadas doenças relacionadas ao gene da PRL ou de seus receptores (Bernichtein;

Touraine e Goffin, 2010). Contudo, pouco ainda se conhece da sua fisiologia influenciando o sistema reprodutor. Portanto, nosso estudo incrementa os conhecimentos sobre este sistema, principalmente, na hipófise e no útero.

Nos nossos achados, a isoforma longa e todas as curtas do receptor de prolactina uterina foram expressas em todos os grupos de estudo. Esses resultados são diferentes dos descritos por Rossi et al. (2009), que não detectaram transcritos para os PRLR no útero de animais castrados tratados com metoclopramida e identificaram apenas a isoforma longa e um tipo da curta nos animais sem castração.

Nosso estudo revela diferente padrão. Os esteróides sexuais influenciaram o PRLR-S3. Para essa isoforma, o grupo de animais ovariectomizados tratados com metoclopramida em associação ao estrogênio e a progesterona teve maior expressão. No entanto, é importante realçar que utilizamos PCR quantitativo em tempo real em nosso experimento, que é mais sensível que o PCR semi-quantitativo (Carvalho et al., 2010).

Nos dados referentes à expressão da isoforma longa do receptor de prolactina uterina, o grupo que recebeu progesterona e o grupo tratado com esse hormônio em associação com o estrogênio apresentaram maiores expressões dessa isoforma. Esse resultado é corroborado por Binart et al. (2010) que afirmam que os esteróides sexuais desempenham importante papel no mecanismo de controle da expressão PRLR-L.

Para Kinoshita et al. (2001), os PRLR são expressos em diversos órgãos e suas concentrações estão na dependência dos níveis séricos dos

hormônios sexuais. Em nosso estudo, a análise da expressão da isoforma longa (PRLR-L) e curta (PRLR-S3) uterina, sugere que quanto maior a concentração sérica de estrogênio e progesterona, maior será sua expressão.

O PRLR uterino tem sido alvo de estudo nas duas últimas décadas, mas pouco se sabe sobre sua biologia em animais submetidos à hiperprolactinemia (Harbaum et al., 2010). Nosso estudo aponta que o tratamento com metoclopramida pode alterar a expressão dos receptores PRLR-S3 e PRLR-L no útero.

Em relação às isoformas PRLR-S1 e PRLR-S2 uterinas, a redução dos níveis séricos de esteróides sexuais nos animais ovariectomizados, parece ter estimulado suas expressões. No entanto, sabe-se que, além dos esteróides sexuais, outros fatores podem estimular os PRLR (Freeman et al., 2000). Mesmo ovariectomizados esses animais, provavelmente, continuaram com a produção de PRL no hipotálamo, porém em menor quantidade. Sabe-se que a neuroregulação da PRL é multifatorial, estando sob um complexo sistema regulador duplo, que envolve um controle tanto inibidor como estimulador pelo sistema hipotalâmico-hipofisário, por via neuroendócrina, autócrina ou parácrina. O hipotálamo inibe de forma tônica a secreção de PRL pela adeno-hipófise com a secreção de DOPA, mas também existem os fatores estimulantes desse hormônio, como TRH, ocitocina, GHRH, GnRH, vasopressina, angiotensina II, NPY, galanina e substância P (Freeman et al., 2000). A diminuição sérica dos esteróides ovarianos poderia ter ativado algum fator estimulante da expressão das isoformas PRLR-S1 e PRLR-S2

pelo útero. Todavia, essa suposição ainda deve ser investigada em trabalhos futuros.

6. Conclusões

O presente estudo permite-nos concluir que:

- 1A) A expressão do gene da prolactina na hipófise revelou-se aumentada nos animais não ovariectomizados que receberam metoclopramida em relação aos que receberam apenas veículo.
- 1B) Na hipófise dos animais castrados, a progesterona isolada ou associada ao estrogênio determinou incremento do RNA mensageiro da prolactina em relação aos animais castrados que receberam outras combinações de tratamento (metoclopramida associada a estrogênio ou progesterona). Este efeito parece ser semelhante ao da metoclopramida em animais com ovários intactos. Em relação ao receptor de prolactina, nossos dados sugerem que o estrogênio ou a progesterona, ambos isoladamente, seriam responsáveis pelo aumento da expressão da isoforma S2.

- 2) No útero, houve elevação da expressão gênica da prolactina tecidual após o tratamento com metoclopramida e com estrogênio e/ou progesterona. Contudo, a ovariectomia determinou redução da expressão das isoformas S1 e S2 do receptor de prolactina. O tratamento estroprogestativo ocasionou aumento das isoformas S3 e L, enquanto a progesterona, isoladamente, causou apenas o incremento da isoforma L do receptor de prolactina de camundongos fêmeas castrados.

7. Anexos

7.1 Anexo 1

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0413/09**, intitulado: **"EFEITOS DA HIPERPROLACTINEMIA INDUZIDA PELA METOCLOPRAMIDA NOS RECEPTORES DE PROLACTINA ENDOMETRIAL E HIPOFISÁRIA DE CAMUNDONGAS ADULTAS OOFORECTOMIZADAS"** apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat**

Pesquisador (a) Executante: **Vinícius Cestari do Amaral**

CAPPesq, 01 de Julho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

7.2 Anexo 2

Tabela 4: Determinação da concentração sérica de 17 β estradiol, progestagênio e prolactina nos sete grupos de estudo (média $\pm$ desvio padrão)

	17 β estradiol (pg/mL)	Progestagênio (ng/mL)	Prolactina (ng/mL)
SS	138,27 $\pm$ 3,58 ^a	14,25 $\pm$ 3,15 ^b	61,94 $\pm$ 2,12
M	140,98 $\pm$ 5,82 ^a	12,96 $\pm$ 1,33 ^b	407,50 $\pm$ 5,52 ^c
OSS	3,32 $\pm$ 0,63	1,49 $\pm$ 0,10	58,48 $\pm$ 2,59
OM	5,29 $\pm$ 1,22	1,37 $\pm$ 0,27	387,01 $\pm$ 11,34 ^c
OME	141,04 $\pm$ 7,27 ^a	0,85 $\pm$ 0,12	385,50 $\pm$ 10,10 ^c
OMP	4,49 $\pm$ 1,23	14,07 $\pm$ 1,10 ^b	335,73 $\pm$ 13,64 ^c
OMEF	139,83 $\pm$ 4,10 ^a	16,89 $\pm$ 0,31 ^b	304,81 $\pm$ 4,79 ^c

a- maiores concentrações de estrogênio quando comparados aos grupos OSS, OM e OMP (p<0,05)

b- maiores concentrações de progestagênio quando comparados aos grupos OSS, OM e OME (p<0,05)

c- maiores concentrações de prolactina quando comparados ao grupo OSS

7.3 Anexo 3

Tabela 5: Valores da expressão relativa do gene da prolactina (PRL) e seus receptores (PRLRL, PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3) no tecido hipofisário dos sete grupos de estudo

	SS	M	OSS	OM	OME	OMP	OMEP
PRL	0,67 ± 0,09	0,75 ± 0,01	0,67 ± 0,02	0,66 ± 0,01	0,70 ± 0,02	0,77 ± 0,04	0,76 ± 0,01
PRLRL	0,84 ± 0,03	0,91 ± 0,01	0,85 ± 0,05	0,85 ± 0,02	0,94 ± 0,06	0,93 ± 0,05	0,87 ± 0,04
PRLRS1	1,41 ± 0,38	1,85 ± 0,40	1,25 ± 0,34	1,81 ± 0,21	1,57 ± 0,41	1,46 ± 0,39	1,47 ± 0,37
PRLRS2	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,30 ± 0,04	0,61 ± 0,14	0,50 ± 0,08	0,40 ± 0,04
PRLRS3	1,28 ± 0,22	1,43 ± 0,10	0,98 ± 0,08	1,30 ± 0,05	1,10 ± 0,25	1,26 ± 0,15	1,04 ± 0,06

7.4 Anexo 4

Tabela 6: Valores da expressão relativa do gene da prolactina (PRL) e seus receptores (PRLRL, PRLR-S1, PRLR-S2 e PRLR-S3) no tecido uterino dos sete grupos de estudo

	SS	M	OSS	OM	OME	OMP	OMEP
PRL	8,08 ± 1,88	8,43 ± 0,71	5,92 ± 0,53	8,79 ± 0,92	7,54 ± 1,87	7,39 ± 0,22	6,72 ± 0,48
PRLRL	1,77 ± 0,48	1,86 ± 0,47	1,72 ± 0,73	2,18 ± 0,34	1,91 ± 0,22	3,42 ± 0,83	3,10 ± 1,13
PRLRS1	3,40 ± 2,29	3,39 ± 2,37	11,87 ± 6,13	1,29 ± 1,84	2,79 ± 2,95	1,31 ± 2,16	2,22 ± 1,49
PRLRS2	4,97 ± 2,07	6,79 ± 2,99	6,28 ± 3,16	2,87 ± 1,99	2,68 ± 0,72	1,66 ± 1,03	1,17 ± 0,40
PRLRS3	2,85 ± 1,89	3,06 ± 1,71	2,54 ± 0,26	1,91 ± 0,70	4,23 ± 0,10	3,84 ± 1,27	6,10 ± 0,11

7.5 Anexo 5

Trabalho apresentado no 15° *World congress of gynecological endocrinology* – Florença / Itália – 7 a 10/03/2012.

Effects of hyperprolactinemia on the murine uterine prolactin gene and prolactin receptor expressions

Vinícius Cestari do Amaral¹; Kátia Cândido Carvalho¹; Rodrigo Rodrigues Marcondes¹; Gustavo Arantes Rosa Maciel¹; Maria Cândido Pinheiro Baracat¹; José Maria Soares Júnior¹; Edmund Chada Baracat¹.

¹School of Medicine - University of São Paulo, Department of Gynecology and Obstetrics, Laboratory of Structural and Molecular Gynecology (LIM 58), São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Vinícius Cestari do Amaral.

Mailing address: Avenida Dr. Arnaldo, 455 (Sala 2113 – Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular). CEP:01246-903. São Paulo – SP, Brasil.

Telephone: +55(11)7366-5295. E-mail: vinicius.cestari@yahoo.com.br

Introduction

Hyperprolactinemia is characterized by persistently high prolactin (PRL) levels in the blood, and it is the most common endocrine disorder of pituitary hypersecretion on the hypothalamic-pituitary axis^{1, 2}.

The treatment of choice for hyperprolactinemia is dopamine agonist administration, which inhibits PRL synthesis and release. Conversely, a dopamine antagonist may raise serum PRL levels, leading to hyperprolactinemia. In fact, it has been shown that metoclopramide is efficient in the development of a hyperprolactinemia model^{3, 4}.

Metoclopramide-induced hyperprolactinemia in female mice⁵ reduces the synthesis of not only ovarian steroids during proestrus but also progesterone during pregnancy. The concentration and gene expression of PRL receptors are affected as well given their dependence on the serum levels of sex hormones⁶.

The role of hyperprolactinemia interaction with sex steroids in the gene expression of PRL and its receptors in the uterus is still controversial. We thus undertook this study to evaluate the gene expression of PRL and its receptors in the uterus after sex steroid administration using the real-time PCR technique.

Materials and Methods

This research was approved by the local institutional committee.

Of 49 female mice (SWISS) with a normal estrous cycle, previously checked by vaginal smears taken for 7 days, a random¹³ total of 35 underwent bilateral

oophorectomy and were then confined to cages for 20 days. After this postoperative adjustment period, these animals were randomly allocated¹³ to 5 groups, and the nonoophorectomized mice, to 2 groups. The groups, all of equal size (n=7), were GI (nonoophorectomized control mice), GII (nonoophorectomized mice with untreated hyperprolactinemia), GIII (oophorectomized control mice), GIV (oophorectomized mice with untreated hyperprolactinemia), GV (oophorectomized mice with hyperprolactinemia treated with estrogen), GVI (oophorectomized mice with hyperprolactinemia treated with progestogen), and GVII (oophorectomized mice with hyperprolactinemia treated with estrogen and progestogen).

The drugs, which were administered subcutaneously for 50 consecutive days, were as follows: metoclopramide (Sigma®), 200µg/day in 0.9% saline solution; 17β-estradiol (Sigma®) and micronized progesterone (Sigma®), 1µg/day and 1mg/day, respectively, in oil-based solution^{3, 4}. On the last day, one hour after drug administration, the mice were sacrificed, except for those not in proestrus. These continued to receive the drugs until they entered that phase¹.

Sample collection and processing

The mice were killed by decapitation and their left and right uterine horns were removed for total RNA extraction through TRIzol® (Invitrogen). The RNA thus obtained was resuspended in sterile MilliQ water and stored in a freezer at -80°C.

Qualitative RNA analysis, cDNA (complementary DNA) synthesis, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was treated with DNase I (Invitrogen) to remove any genomic DNA contamination. Subsequent synthesis of cDNA was performed using up to 2µg of total RNA and the Hi Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer`s instructions.

Qualitative cDNA analysis

The cDNAs were analyzed by the conventional end-point PCR technique, using the pairs of specific activators for the β -actin gene. Following interpretation of cDNA quality in agarose gels (Sigma®), the cDNAs were utilized in the qRT-PCR reactions¹⁴.

Simultaneously, standardization of reactions with the specific initiators for the 4 prolactin receptor (PRL-R) isoforms, L, S1, S2, and S3, was carried out. Endometrial prolactin expression was also assessed.

Statistical analysis

The results were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and, additionally when necessary, to the Tukey-Kramer multiple comparisons test to check for significant differences between the experimental groups. The significance level was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Gene expression analysis of endometrial prolactin and its receptors

As shown by transcript analysis for endometrial prolactin, expression of such a gene was highest in GIV and lowest in GIII ($p<0.05$).

Expression of the long endometrial prolactin receptor isoform was highest in GVI and GVII and lowest in GI and GIII ($p<0.05$). Of the short prolactin receptor isoforms, PS1, PS2, and PS3 alone were evaluated. The highest expression of PS1 was found in GIII, and the lowest, in GIV and GVI ($p<0.05$). Expression of PS2 was highest in GII and GIII and lowest in GVI and GVII ($p<0.05$). PS3 was mostly expressed in GVII and least so in GIII ($p<0.05$).

Discussion

Prolactin is known to interact with estroprogestogen therapy⁷, and such knowledge was further confirmed by this study. Our results highlight the influence of progesterone in increasing gene expression for the PRL oligonucleotide while estrogen action remains at a low point. Despite such an effect, when progesterone is administered along with estrogen, gene expression decreases. Thus, estrogen therapy, as well as estroprogestogen therapy, may benefit the uterus as regards prolactin expression in a hyperprolactinemic state.

Understanding prolactin receptor behavior is another relevant aspect targeted in the past two decades⁸. Yet, little is known about prolactin receptor interaction in animals subjected to a hyperprolactinemic state.

Expression analysis of the receptors showed that all isoforms (PL, PS1, PS2, and PS3) were expressed in all of the study groups. This underscores

the sensitivity of the technique that was chosen⁹. In contrast, Rossi et al. (2009) was not able to detect transcripts for endometrial prolactin receptors in any of the oophorectomized animals with hyperprolactinemia. These divergent results appear to stem from the choice of the analytical techniques employed.

PRL receptors are expressed in diverse organs, such as the uterus and the hypophysis¹⁰. However, their concentrations are known to be dependent on sex hormone levels in the blood^{4, 6} as corroborated by our results that showed that the higher the serum concentration of these steroids, the higher the expression of the long isoforms of the receptor.

Sex steroids are fundamental in establishing the expression levels of the prolactin receptor^{11, 12}. In the present study, such an effect was manifested by the increased expression of the long receptor isoforms, and this took place whether the hormones were administered separately (GV and GVI) or conjointly (GVII).

References

- 1- Gomes RC, Oliveira PB, Rossi AG, Baracat MC, Simões RS, Baracat EC, Junior JM. Efeitos da hiperprolactinemia sobre o útero de camundongos no proestro. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(8):385-90.
- 2- Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, Bronstein MD, et al. Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 65(2):265-73.

3- Barañao RI, Tenenbaum A, Rumi LS. Effects of sexual steroid hormones on the functionality of murine peritoneal macrophages. *Steroids*. 1991 Sep;56(9):481-5.

4- Rossi AGZ, Gomes RCT, Simões MJ, Simões RS, Oliveira PB, Soares-JR JM, Baracat EC. Effects of metoclopramide-induced hyperprolactinemia on the prolactin receptor of murine endometrium. *Fertility and Sterility*. 2009; S/V (S/N): 1-7.

5- Betzold CM. Galactagogues. *J Midwifery Womens Health*. 2004; 49(2):151-4.

6- Kinoshita H, Yasui T, Ushigoe K, Irahara M, Tanaka M, Nakashima K, et al. Expression of ovarian prolactin receptor in relation to hormonal changes during induction of ovulation in the rat. *Gynecol Obstet Invest*. 2001; 52(2):132-8.

7- Rossi AG, Soares JM Jr, Motta EL, Simoes MJ, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, et al. Metoclopramide-induced hyperprolactinemia affects mouse endometrial morphology. *Gynecol Obstet Invest*. 2002; 54(4):185-90.

8- Harbaum L, Pollheimer MJ, Bauernhofer T, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. Clinicopathological significance of prolactin receptor expression in colorectal carcinoma and corresponding metastases. *Mod Pathol*. 2010 Jul;23(7):961-71. Epub 2010 May 7.

9- Carvalho, K C. ; Cunha, I. W. ; Rocha, Rafael Malagoli . Molecular tools used in the study of sarcomas, Review. Applied Cancer Research (Online), v. 30, p. 237-239, 2010.

10- Jones RL, Critchley HOD, Brooks J, Jabbour HN, Mcneilly AS. Localization and temporal pattern of expression of prolactin receptor in human endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83:258-62.

11- Norstedt G, Mode A. On the primary site of action of estrogens and androgens in the regulation of hepatic prolactin receptors. Endocrinology. 1982 Aug;111(2):645-9.

12- Sakaguchi K, Ohkubo T, Sugiyama T, Tanaka M, Ushiro H, Nakashima K. Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and oestradiol. J Endocrinol. 1994 Nov;143(2):383-92.

13- 30- Wittes J. Sample size calculations for randomized controlled trials. Epidemiol Rev. 2002; 24:1.

14- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29:45.

8. Referências

Ain R, Dai G, Dunmore JH, Godwin AR, Soares MJ. A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(47):16543-8.

Alonso V, Santana BAA, Pirage Jr W, Goulart LR, Diniz HS, Machaim MF, Borges GSN. Effect of prolactin receptor gene on the quantitative characteristics of economic interest on pigs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2003; 40:366-372

Azevedo MF, Barbosa CCH, David GS, Batista EBGV, Campos LV, Nilo DM, Logato AS, Araújo DMC. Abordagem prática da hiperprolactinemia no Distrito Federal. *Brasília Med*. 2008; 45(2):122-128.

Barañao RI, Tenenbaum A, Rumi LS. Effects of sexual steroid hormones on the functionality of murine peritoneal macrophages. *Steroids*. 1991; 56(9):481-5.

Ben-Jonathan N, Chen S, Dunckley JA, LaPensee C, Kansra S. Estrogen receptor-alpha mediates the epidermal growth factor-stimulated prolactin expression and release in lactotrophs. *Endocrinology*. 2009;150(2):795-802.

Betzold CM. Galactagogues. *J Midwifery Womens Health*. 2004; 49(2):151-4.

Bernichtein S, Touraine P, Goffin V. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol*. 2010; 206(1):1-11.

Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(6):362-8.

Blesson CS, Büttner E, Masironi B, Sahlin L. Prostaglandin receptors EP and FP are regulated by estradiol and progesterone in the uterus of ovariectomized rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 18;10:3.

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*. 1998;19(3):225-68.

Brockman JL, Schroeder MD, Schuler LA. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Mol Endocrinol* 2002; 16(4):774-84.

Broutin I, Jomain JB, Tallet E, van Agthoven J, Raynal B, Hoos S, Kragelund BB, Kelly PA, Ducruix A, England P, Goffin V. Crystal structure of an affinity-matured prolactin complexed to its dimerized receptor reveals the topology of hormone binding site 2. *J Biol Chem*. 2010; 12; 285(11):8422-33.

Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, Bronstein MDI. Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. Clin Endocrinol (Oxf). 2006; 65(2):265-73.

Carvalho KC. ; Cunha IW. ; Rocha, Rafael Malagoli . Molecular tools used in the study of sarcomas, Review. Applied Cancer Research (Online), 2010; v. 30, p. 237-239.

Chen S, Bangaru M, Sneade L, Kansra S. Epidermal growth factor receptor cross-talks with ligand-occupied estrogen receptor- α to modulate both lactotroph proliferation and prolactin gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297(2):331–339.

Cone RD, Low MJ, Elmquist JK. Neuroendocrinology. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. Williams Textbook of Endocrinology. 10th Ed. Saunders Inc; 2003; p.81-176.

Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and functions: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. Endocr Rev 2000; 21, 292-312.

Faglia G. Prolactinomas and hyperprolactinemic syndrome. In: DeGroot L, Jameson J, editors. Endocrinology. 4th ed., v.1. Philadelphia:W.B.Saunders; 2001; p.329-42.

Feuermann Y, Mabjeesh SJ, Shamay A. Mammary Fat Can Adjust Prolactin Effect on Mammary Epithelial Cells via Leptin and Estrogen. Int J Endocrinol. 2009; 427-460.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev 2000; 80: 1523-631.

Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. Annu Rev Physiol. 2002; 47-67.

Gomes RC, Oliveira PB, Rossi AG, Baracat MC, Simões RS, Baracat EC, Soares-Junior JM. Efeitos da hiperprolactinemia sobre o útero de camundongos no proestro. Rev Bras Ginecol Obstet. 2009; 31(8):385-90.

Gowri PM, Sengupta S, Bertera S, Katzenellenbogen BS. Lipin1 regulation by estrogen in uterus and liver: implications for diabetes and fertility. Endocrinology 2007;148(8):3685-93.

Guivarc'h-Levêque A, Homer L, Broux PL, Moy L, Priou G, Vialard J, Collet D, Arvis P, Dewailly D. Influence duration of the use of estrogens beyond the menses in estradiol IVF antagonist programming cycles. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2011; 40(6):498-502.

Gutiérrez S, Petiti JP, Sosa LV, Fozzatti L, De Paul AL, Masini-Repiso AM, Torres AI. 17β -oestradiol acts as a negative modulator of insulin-induced lactotroph cell proliferation through oestrogen receptor alpha, via nitric oxide/guanylyl cyclase/cGMP. *Cell Prolif.* 2010; 43(5):505-14.

Harper CV, Featherstone K, Semprini S, Friedrichsen S, McNeilly J, Paszek P, Spiller DG, McNeilly AS, Mullins JJ, Davis JR, White MR. Dynamic organization of prolactin gene expression in living pituitary tissue. *J Cell Sci.* 2010; 23(Pt 3):424-30.

Huang KT, Walker AM. Long term increased expression of the short form 1b prolactin receptor in PC-3 human prostate cancer cells decreases cell growth and migration, and causes multiple changes in gene expression consistent with reduced invasive capacity *Prostate.* 2010; 70(1):37-47.

Iwanaga T, Hozumi Y, Takahashi-Iwanaga H. Immunohistochemical demonstration of dopamine receptor D2R in the primary cilia of the mouse pituitary gland. *Biomed Res.* 2011; 32(3):225-35.

Jacobs E, D'Esposito M. Estrogen shapes dopamine-dependent cognitive processes: implications for women's health. *J Neurosci.* 2011; 31(14):5286-93.

Jöhren O, Sanvitto GL, Egidy G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1A receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. *J Neurosci.* 1997; 17(21):8283-92.

Jones RL, Critchley HOD, Brooks J, Jabbour HN, Mcneilly AS. Localization and temporal pattern of expression of prolactin receptor in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:258-62.

Kadmiel M, Fritz-Six K, Pacharne S, Richards GO, Li M, Skerry TM, Caron KM. Research resource: haploinsufficiency of receptor activity-modifying protein-2 (ramp2) causes reduced fertility, hyperprolactinemia, skeletal abnormalities, and endocrine dysfunction in mice. *Mol Endocrinol.* 2011; 25(7):1244-53.

Kansra S, Chen S, Bangaru ML, 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):100-60.

Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S, Arita J. The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1: a cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology*. 2002; 143(7):2750-8.

Khodr CE, Clark SM, Hurley DL, Phelps CJ. Long-term, homologous prolactin, administered through ectopic pituitary grafts, induces hypothalamic dopamine neuron differentiation in adult Snell dwarf mice. *Endocrinology*. 2008; 149(4):2010-18.

Kinoshita H, Yasui T, Ushigoe K, Irahara M, Tanaka M, Nakashima K, et al. Expression of ovarian prolactin receptor in relation to hormonal changes during induction of ovulation in the rat. *Gynecol Obstet Invest*. 2001; 52(2):132-8.

Kossiakoff AA. The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors. *Adv Protein Chem.* 2004; 68:147-69.

Laszczyńska M, Słuczanska-Głabowska S, Piasecka M, Skowron J, Debińska-Szymańska T. Germ cells with nuclear DNA fragmentation related to apoptotic cells in rat testis in experimental hyperprolactinemia induced by metoclopramide. *Folia Histochem Cytobiol.* 2002; 40(2):163-4.

Leite EL, Nunes FB, Pires MGS, Lunardelli A, Lhullier FR, Martins MR, Oliveira JR. Influência do uso continuado de fluoxetina nas dosagens séricas de prolactina em mulheres. *RBAC.* 2007; 39(4): 283-285.

Liew SH, Sarraj MA, Drummond AE, Findlay JK. Estrogen-dependent gene expression in the mouse ovary. *PLoS One.* 2011; 6(2):e14672.

Melmed S, Kleinberg D. Anterior pituitary. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams Textbook of Endocrinology.* 10th Ed. Saunders Inc; 2003. p.177-279.

Möller FJ, Diel P, Zierau O, Hertrampf T, Maass J, Vollmer G. Long-term dietary isoflavone exposure enhances estrogen sensitivity of rat uterine responsiveness mediated through estrogen receptor alpha. *Toxicol Lett.* 2010; 196(3):142-53.

Nahas EAP, Nahas-Neto J, Pontes A, Dias R, Fernandes CE. Estados hiperprolactinêmicos – inter-relação com o psiquismo. *Rev. Psiq. Clín.* 2006; 33(2); 68-73.

Naliato ECO, Farias MLF, Violante AHD. Prolactinomas e densidade mineral óssea em homens. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(2) 75-84.

Naliato EC, Violante AH, Caldas D, Farias ML, Bussade I, Lamounier Filho A, Loureiro CR, Fontes R, Schrank Y, Loures T, Colao A. Bone density in women with prolactinoma treated with dopamine agonists. *Pituitary.* 2008; 11(1):21-8.

Norstedt G, Mode A. On the primary site of action of estrogens and androgens in the regulation of hepatic prolactin receptors. *Endocrinology* 1982; 111(2): 645-9.

Ogasawara K, Nogami H, Tsuda MC, Gustafsson JA, Korach KS, Ogawa S, Harigaya T, Hisano S. Hormonal regulation of prolactin cell development in the fetal pituitary gland of the mouse. *Endocrinology*. 2009 Feb; 150(2):1061-8.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29:45.

Palm IF, van der Beek EM, Swarts HJ, van der Vliet J, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A. Control of the estradiol induced prolactin surge by the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*. 2001; 142(6):2296-302.

Panzan MQ, Soares-Júnior JM, da Motta EL, Haapalainen EF, de Jesus Simões M, Baptista HA, Haidar MA, Baracat EC. Metoclopramide induced hyperprolactinemia caused marked decline in pinopodes and pregnancy rates in mice. *Hum Reprod*. 2006; 21(10):2514-20.

Piroli GG, Cassataro J, Pietranera L, Grillo CA, Ferrini M, Lux-Lantos V, De Nicola AF. Progestin regulation of galanin and prolactin gene expression in oestrogen-induced pituitary tumours. *J Neuroendocrinol*. 2001; 13(3):302-9.

Radl DB, Ferraris J, Boti V, Seilicovich A, Sarkar DK, Pisera D. Dopamine-induced apoptosis of lactotropes is mediated by the short isoform of D2 receptor. *PLoS One*. 2011; 6(3): e18097.

Rossi AGZ, Gomes RCT, Simões MJ, Simões RS, Oliveira PB, Soares-JR JM, Baracat EC. Effects of metoclopramide-induced hyperprolactinemia on the prolactin receptor of murine endometrium. *Fertility and Sterility*. 2009; 1-7.

Rossi AG, Soares JM Jr, Motta EL, Simoes MJ, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, et al. Metoclopramide-induced hyperprolactinemia affects mouse endometrial morphology. *Gynecol Obstet Invest*. 2002; 54(4):185-90.

Sakaguchi K, Ohkubo T, Sugiyama T, Tanaka M, Ushiro H, Nakashima K. Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and oestradiol. *J Endocrinol*. 1994; 143(2):383-92.

Semprini S, Friedrichsen S, Harper CV, McNeilly JR, Adamson AD, Spiller DG, Kotelevtseva N, Brooker G, Brownstein DG, McNeilly AS, White MR, Davis JR, Mullins JJ. Real-time visualization of human prolactin alternate promoter usage in vivo using a double-transgenic rat model. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(4):529-38.

Singtripop T, Mori T, Park MK, Sakamoto S, Kawashima S. Development of uterine adenomyosis after treatment with dopamine antagonists in mice. *Life Sci*. 1991; 49(3):201-6.

Soares-Jr JM, Gadelha M. Fisiologia da prolactina. Laboratórios Pfizer Ltda [online]. São Paulo: 2004. Disponível em: http://www.segmentofarma.com.br/arquivos/Fisiologia%20da%20Prolactina_P3UGKC.pdf. Acesso em 15/02/2009.

Słuczanska-Głębowska S, Laszczyńska M, Wylot M, Głębowski W, Piasecka M, Gącarzewicz D. Morphological and immunohistochemical comparison of three rat prostate lobes (lateral, dorsal and ventral) in experimental hyperprolactinemia. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010; 48(3):447-54.

Stefaneanu L. Pituitary Sex Steroid Receptors: Localization and Function. *Endocr Pathol.* 1997; 8(2):91-108.

Steger RW, Chandrashekar V, Zhao. Neuroendocrine and reproductive functions in male mice with target disruption of the prolactin gene. *Endocrinology* 1998; 139: 3691-5.

Suzuki T, Schirra F, Richards SM, Jensen RV, Sullivan DA. Estrogen and progesterone control of gene expression in the mouse meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(5):1797-808.

Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod.* 1995; 10(10):2793-9.

Trott JF, Hovey RC, Koduri S, Vonderhaar BK. Multiple new isoforms of the human prolactin receptor gene. *Adv Exp Med Biol.* 2004; 554:495-9.

Verna C, Martins FW, Mosquete R, Simões RS, Simões MJ, Soares Júnior JM, Baracat EC. Efeito da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na glândula lacrimal: estudo experimental. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27(9): 524-8.

Verna C, Soares JM, Martins FW, Teixeira RC, Mosquette R, Simões RS, Simões Mde J, Baracat EC. Efeito da hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida na córnea de camundongas. *Arq Bras Oftalmol.* 2006; 69(5):645-9.

Wittes J. Sample size calculations for randomized controlled trials. *Epidemiol Rev.* 2002; 24:1.

Yin P, Arita J . Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle. *Neuroendocrinology*. 2000; 72(2):72-9.