

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Projeto de pesquisa para dissertação de mestrado Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia - ICB/UFMG

Mauro Sérgio Batista da Silva

***Efeito estrogênico sobre a expressão do
receptor de membrana para estradiol
GPER 1 em tecidos secretores ou alvos
para a ocitocina***

Orientadora: Prof(a). Dra. Adelina Martha dos Reis

Co-orientadora: Prof(a). Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte – MG

Agosto – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

***Efeito estrogênico sobre a expressão do
receptor de membrana para estradiol GPER 1
em tecidos secretores ou alvos para a
ocitocina***

Mauro Sérgio Batista da Silva

Projeto de pesquisa para dissertação de mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia - ICB/UFMG

Orientadora: Prof(a). Dra. Adelina Martha dos Reis
Co-orientadora: Prof(a). Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte – MG

Agosto – 2014

“Todo o conhecimento que não leva a novas perguntas rapidamente morre: não consegue manter a temperatura necessária para a manutenção da vida”

Wisława Szymborska

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que suportou meus sonhos, conhecimentos e, essencialmente, a vida. Agradeço a minha mãe e irmãs por cada passo conquistado e a meu pai, em grande memória, pela eterna inspiração na busca de explorar cientificamente o mundo ao meu redor.

Agradeço a Deus por ter sido meu porto seguro em todos esses anos, nos momentos de conquista ou dificuldades.

Às professoras e tutoras Dra. Adelina Martha dos Reis e Dra. Maristela de Oliveira Poletini por terem me dado a grande oportunidade de aprender a vivência científica, por sua grande atenção, por sua sabedoria e carinho.

Ao suporte financeiro das agências de fomento à pesquisa científica_ CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Aos meus grandes amigos que me apoiaram durante diferentes etapas da minha vida. Aos colegas do Departamento de Fisiologia que sempre me ajudaram nas atividades científicas, conselhos e calorosa amizade.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) que suportam e apoiam nossa demanda de trabalho.

E aos professores da pós-graduação que me inspiraram no desejo de ser um pesquisador da área de Fisiologia.

Lista de Figuras

<u>Figura 1</u> : Concentração plasmática de estradiol (A) e progesterona (B) ao longo do ciclo estral de ratas.	32
<u>Figura 2</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} durante o ciclo estral de ratas nos principais núcleos hipotalâmicos secretores de Ocitocina.	33
<u>Figura 3</u> : Fotomicrografias de imunolocalização para GPER1 e ocitocina no PVN.	34
<u>Figura 4</u> : Análise da expressão proteica de ocitocina e GPER1 no PVN ao longo do ciclo estral de ratas. .	
<u>Figura 5</u> : Fotomicrografias de imunolocalização para GPER1 e ocitocina no SON.	36
<u>Figura 6</u> : Análise da expressão proteica de ocitocina e GPER1 no SON ao longo do ciclo estral de ratas.	37
<u>Figura 7</u> : Expressão de OTR _{RNAm} durante o ciclo estral de ratas na hipófise anterior.	39
<u>Figura 8</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} durante o ciclo estral de ratas na hipófise anterior.	39
<u>Figura 9</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} no SON, PVN e Hipófise anterior.	40
<u>Figura 10</u> : Fotomicrografias de imunohistoquímica para GPER1 na hipófise anterior 1.	41
<u>Figura 11</u> : Fotomicrografias de imunohistoquímica para GPER1 na hipófise anterior. 2	42
<u>Figura 12</u> : Análise da expressão proteica de GPER1 na hipófise anterior por densidade óptica ao longo do ciclo estral de ratas.	43
<u>Figura 13</u> : Análise da quantidade de células hipofisárias que expressam o receptor GPER1 durante o ciclo estral de ratas.	44
<u>Figura 14</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} durante o ciclo estral de ratas no útero.	45
<u>Figura 15</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	46
<u>Figura 16</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	47
<u>Figura 17</u> : Expressão de OTR _{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	48
<u>Figura 18</u> : Expressão de OTR _{RNAm} na hipófise anterior no ciclo estral e após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	49
<u>Figura 19</u> : Expressão de GPER1 _{RNAm} no útero após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	50
<u>Figura 20</u> : Expressão de OTR _{RNAm} no útero no ciclo estral e após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	51
<u>Figura 21</u> : Expressão de OTR _{RNAm} no útero após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas.	52

RESUMO

A ocitocina é um hormônio produzido principalmente por núcleos hipotalâmicos e liberado na porção posterior da glândula hipófise cujos efeitos já descritos na literatura são versáteis. A sinalização ocitocinérgica ocorre via receptor de ocitocina (OTR) nos tecidos alvos como útero e lobo anterior da glândula hipófise. A modulação da ação ocitocinérgica ocorre principalmente por estrogênios a fim de aumentar a eficiência da resposta do tecido alvo. A atuação estrogênica ocorre via seus receptores clássicos ER α e ER β , bem como por ação rápida via receptores recentemente descritos, dentre eles o receptor de estradiol acoplado à proteína G denominado GPER1. O presente trabalho teve como objetivo identificar o perfil de expressão de GPER1, por PCR de tempo real e imunohistoquímica, nos núcleos produtores e também em tecidos alvos de ocitocina ao longo do ciclo estral de ratas, além de determinar o efeito do tratamento com estradiol e progesterona sobre esta expressão. Ratas de três meses de idade tiveram o ciclo estral acompanhado por, no mínimo quinze dias, e a eutanásia foi realizada nas diferentes fases do ciclo estral (diestro, manhã e tarde de proestro, , estro e metaestro). Fêmeas na fase da tarde de proestro apresentaram maiores níveis de RNAm e proteína para GPER1 no PVN em relação às outras fases, A expressão gênica para o receptor de estradiol no SON não variou ao longo do ciclo. A adeno-hipófise apresentou maior expressão de GPER1, RNAm e de proteína, na tarde de proestro. Em adição, os resultados mostraram que a expressão de OTR também foi maior na tarde de proestro. Fêmeas ovariectomizadas foram injetadas por quatro dias com: óleo de milho (veículo), estradiol (E2), ou com estradiol por quatro dias e progesterona no quarto dia (E2+P4) ou com óleo de milho por quatro dias e uma injeção de progesterona no quarto dia (P4). Fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo mostraram um aumento na expressão do gene *gper1*, enquanto que administração de E2 ou E2+P4 diminuiu significativamente a expressão do receptor na hipófise e no útero. Em contrapartida, administração dos esteroides ovarianos aumentou expressão de OTR. Nossos resultados mostram que a expressão de GPER1 é maior durante a tarde de proestro, período que coincide com maior secreção de ocitocina e gonadotrofinas em fêmeas. A expressão de GPER1 é dependente da variação de estradiol presente no ciclo estral em tecidos secretores e alvos para ocitocina e administração de estradiol reduz sua expressão nos tecidos alvos. A presença de maior ativação de GPER1 durante o proestro pode estar ligado a

maior secreção ocitocinérgica, em fêmea, em seu período fértil. O presente estudo conclui que a expressão de GPER1 apresenta variações nos núcleos produtores de ocitocina, bem como em tecidos alvos para este peptídeo de acordo com as diferentes fases do ciclo estral. Estas variações de expressão de GPER1 acompanham alterações de expressão de ocitocina e seu receptor nos tecidos alvos para este hormônio. Além disso, na hipófise a expressão desse receptor de estradiol é modulada pelos esteroides ovarianos.

ABSTRACT

The oxytocin is a hormone produced mainly in hypothalamic nuclei and released in the posterior pituitary gland lobe; its effects described in the literature are versatile. The oxytocinergic signaling occurs via the oxytocin receptor (OTR) in target tissues such as the uterus and anterior pituitary gland. The modulation of oxytocinergic action occurs mainly by estrogens in order to increase the efficiency of target tissue response. The estrogenic activity operates through classical receptors ER α and ER β , as well as rapid responses using recently described receptors. Those include the G protein-coupled estrogen receptor named GPER1. This study aimed to identify the expression profile of GPER1, by real-time PCR and immunohistochemistry, in both oxytocin secreting and target tissues during the female estrous cycle in rats, as well as the effects of estradiol and progesterone on this expression. Three-month old female rats had the estrous cycle followed during at least fifteen days and euthanasia was performed in each phase of the cycle: diestrus, proestrus morning (9:00h), proestrus afternoon (17:00h), estrus and metaestrus. During the proestrus afternoon, we found higher levels of GPER1 mRNA and protein in the PVN compared with the other phases. Gene or protein expression for the estradiol receptor in the SON did not vary over the cycle. The anterior pituitary showed higher expression of GPER1 mRNA or protein on the afternoon period of proestrus. In addition, the results showed that OTR expression was higher on the proestrus afternoon. Ovariectomized animals were treated for four days as follow: corn oil (vehicle); estradiol (E2); estradiol for four days and progesterone on forth day (E2+P4); or corn oil for four days and on forth day with an injection of progesterone (P4). Ovariectomized treated with vehicle had an increase in the expression of the gene *gper1* while administration of E2 or E2+P4 significantly decreased the expression of the receptor in the pituitary and uterus. On the other hand, administration of ovarian steroids increased expression of OTR. Our results show that the expression of GPER1 is higher during the proestrus afternoon, which coincided with a previously described increase of oxytocin and gonadotropin secretion in females. The expression of GPER1 depends of the estradiol variation of estrous cycle in secretory and targets tissues for oxytocin, and estradiol administration reduces its expression in target tissues. The greater activation of GPER1 during proestrus afternoon might be linked to higher oxytocin secretion in females during their fertile period. The present study concludes that GPER1 expression shows variations in producing oxytocin nuclei

as well as target tissues for the peptide according to the different stages of the estrous cycle. Those changes in expression of GPER1 following changes of expression of oxytocin and its receptor on target tissues to this hormone. In addition, ovarian steroids modulate the pituitary expression of the estradiol receptor.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1 A Ocitocina	11
1.1.1 A Ocitocina	11
1.1.2 O Receptor de Ocitocina	12
1.1.3 A ação estrogênica sobre o Sistema Ocitocinérgico	14
1.2. Estrogênios e seus receptores	15
1.3. GPER 1_ Receptor de Estrogênio acoplado à Proteína G	17
1.3.1 Caracterização inicial do GPER 1	17
1.3.2 GPER 1 e seus ligantes	19
1.3.3 GPER 1: Localização, Distribuição e Efeitos Fisiológicos	20
2. Justificativa.....	23
3. Objetivo	24
4. Materiais e Métodos	25
4.1 Ciclo Estral	25
4.2 Coleta de tecidos	25
4.3 Efeito da administração de estradiol por reposição hormonal aguda	27
4.4 Extração de RNA e PCR em Tempo Real.....	27
4.5 Imunohistoquímica e Imunofluorescência	29
4.2 Dosagem de estradiol e progesterona por ELISA.....	30
5. Análise Estatística	31
6. Resultados	32
6.1 Expressão de GPER1 e OTR ao longo do ciclo estral	32
6.2 Efeito da administração de esteroides ovarianos na expressão de GPER1 e OTR.....	45
7. Discussão.....	53
8. Referências Bibliográficas	62

1. Introdução

1.1. Sistema Ocitocinérgico

1.1.1 A Ocitocina

A ocitocina é um hormônio peptídico de nove aminoácidos (*Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly*), produzido principalmente por núcleos hipotalâmicos e liberado na porção posterior da glândula hipófise, cujos efeitos já descritos na literatura são versáteis. A ocitocina foi o primeiro hormônio peptídico a ter sua estrutura elucidada e recebeu este nome que significa “*nascimento rápido*” devido a conhecida atividade uterogênica do peptídeo (Du Vigneaud et al., 1953). Inicialmente, foi descrita sua ação como importante ativador da ejeção de leite dos ductos mamários e participação das contrações uterina necessárias para o parto (Hawker & Robertson, 1957). Após melhor caracterização do sistema ocitocinérgico, sabe-se que este hormônio tem um maior espectro de atuação no organismo.

A ocitocina é produzida inicialmente como o pró-hormônio denominado *ocitocina-neurofisina*. Durante o transporte axonal, a proteína é clivada de seu carreador neurofisina por peptidases dentro de vesículas que posteriormente serão secretadas segundo estímulos captados pelos neurônios ocitocinérgicos; como por exemplo, sinalização mediada por estradiol (Perlow et al., 1982). A ocitocina é secretada em resposta a diferentes estímulos: durante o trabalho de parto; em resposta à sucção do mamilo promovendo a ejeção do leite durante o período da lactação; mudanças na osmolaridade e ingestão de alimentos (Lucio-Oliveira & Franci, 2012; Mecawi et al., 2011); durante o orgasmo e ereção peniana (Caldwell 1992; Argiolas 1992).

Grande atenção tem sido direcionada aos aspectos neuroendócrinos da secreção de ocitocina uma vez que neurônios ocitocinérgicos são ativados por estímulos estressores, ingestão alimentar e afetos sociais entre parceiros e entre mãe e prole (Onaka et al., 2012). Em humanos, estímulos estressores psicológicos agudos levam a aumento da secreção de ocitocina (Pierrehumbert et al., 2010; Sanders et al., 1990). Em roedores, ocitocina possui efeitos ansiolíticos por diminuir a ativação do eixo do estresse hipotálamo-hipófise-Adrenal (Windle et al., 2004). A ativação de neurônios ocitocinérgicos é correlacionada a comportamentos sociais, como por exemplo, a uma

maior interação intraespecífica tais como comportamento sexual, ligação entre progenitores e prole, interações sociais em humanos, dentre outros (McCall & Singer, 2012).

Evolutivamente, o sistema ocitocinérgico é relativamente antigo dentro do grupo *Vertebrata*. Possivelmente o surgimento dos genes codificadores da ocitocina e vasopressina aconteceu após a radiação do grupo *Cyclostomata* por duplicação gênica. Sendo assim, a importância da ocitocina e vasopressina, sobre a regulação da reprodução e osmoregulação, por exemplo, vai além do grupo de mamíferos placentários como havia sido proposta inicialmente. Peptídeos relacionados à ocitocina como mesotocina (amplamente presente em *Tetrapoda*) e isotocina (peixes *Osteichthyes*) são exemplos da importância da conservação da ação desses hormônios ao longo do processo evolutivo (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Sabe-se também que a ocitocina não somente é secretada na terminação axonal, mas também pelo corpo celular e dendritos agindo como um fator autócrino/parácrino que aumenta o contato célula-célula, o que leva à maior secreção do próprio hormônio por mecanismo de retroalimentação positiva neural (Theodosis et al., 1986; Moos et al., 1984). A secreção de ocitocina na circulação sistêmica depende da atividade elétrica dos neurônios magnocelulares localizados nos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo que possuem sua terminação axonal na hipófise posterior. Em roedores, tais neurônios mostram mudanças na taxa de disparo que são correlacionadas com a intensidade e relevância dos estímulos fisiológicos. A excitabilidade dos neurônios ocitocinérgicos é controlada por fatores centrais e periféricos (Oliet & Bourque, 1992).

Em adição, a secreção de ocitocina pode ser induzida por estimulação elétrica ou mecânica do cérvix uterino, que mimetizam a intromissão peniana no canal vaginal durante a cópula. A estimulação leva à secreção hormonal pelo mecanismo do reflexo de Ferguson e induz pseudogravidez por até 10 ou 12 dias, similarmente ao que ocorre após a cópula de fêmeas com machos vasectomizados (Komisaruk & Sansone, 2003; Moos & Richard, 1975; Everett, 1964).

1.1.2 O Receptor de Ocitocina

O receptor de ocitocina (OTR) pertence à família de receptores acoplados a proteína G (GPCR). A proteína G envolvida na interação com o receptor é do tipo

Gq/11 α . A ativação das subunidades β/γ é responsável pela atividade de fosfolipases C- β e consequente geração de inositol trifosfato e 1,2-diacylglicerol. A ação da ocitocina sobre seus tecidos alvos depende da geração de transientes de cálcio intracelular e fosforilação de enzimas como as quinases MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*). A resposta mediada por OTR dependerá da natureza tecidual e o momento no qual o receptor está expresso. (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

OTR apresenta alta homologia com os receptores de vasopressina (V1a, V1b e V2). Novamente isso evidencia a origem comum dos sistemas ocitocinérgico e vasopressinérgico ao longo do processo evolutivo. Estudos demonstram que a ativação de OTR está relacionada a uma maior interação social e, a mutação ou ausência de tal receptor possui complicações como sintomas presentes de autismo (Damiano et al., 2014; Pobbe et al., 2012). De fato, a administração de ocitocina ou terapias que envolvem o aumento da secreção de ocitocina são grandes prospecções clínicas para o tratamento de diferentes transtornos mentais como esquizofrenia, transtornos de ansiedade e depressão (Matsuzaki et al., 2012; de Wied et al., 1993).

A ação do OTR é altamente dependente da quantidade de colesterol presente na membrana plasmática. A interação do colesterol com OTR é de elevada especificidade e não é devido a meras alterações de fluidez da membrana. Experimentos realizados onde o receptor OTR é expresso na membrana de células de insetos, que possui baixo teor de colesterol, o receptor apresenta baixa afinidade de ligação pela ocitocina com $K_d > 100\text{nM}$ e, mais além, quando colesterol é adicionado à cultura celular, a afinidade de interação entre receptor e peptídeo aumenta consideravelmente. O colesterol é considerado um importante regulador alostérico do OTR sendo fundamental para a sinalização de ocitocina (Gimpl et al., 1995).

Quanto a modulação do receptor por esteroides sabe-se que a progesterona é capaz de se ligar ao OTR com relativa afinidade ($K_d \sim 20\text{nM}$) inibindo a ativação do receptor. A progesterona assim, atuando como um modulador negativo do OTR, dificulta sua ação dela em tecidos alvos, como acontece durante a quiescência uterina induzida pela progesterona (Grazzini et al., 1998). Por outro lado, o aumento da secreção local de ocitocina ovariana e ativação de OTR leva a um aumento da produção de progesterona na fase luteínica (KhanDawood et al., 1998).

É de longa data o conhecimento sobre efeitos dos estrogênios sobre a regulação da ocitocina e seu receptor. Administração de estradiol aumenta a expressão do receptor de ocitocina em diferentes tecidos, bem como atua sobre a secreção de ocitocina (Richard & Zingg, 1990; Nissenson et al., 1978). Maior abordagem será discutida no seguinte tópico desta dissertação.

1.1.3 A ação estrogênica sobre o sistema ocitocinérgico

Os hormônios esteroides ovarianos estão diretamente relacionados à secreção de ocitocina ao longo do ciclo reprodutivo de fêmeas. A liberação cíclica de estradiol e progesterona desempenha um papel crucial para comportamento de acasalamento (Griffin & Flanagan-Cato, 2011; Soma et al., 2005). O estradiol está relacionado ao aumento dos níveis circulantes de ocitocina em mulheres, principalmente durante a fase folicular e nos estágios finais do período de gravidez (Kumaresan et al., 1974). Em ratas, o conteúdo de ocitocina hipofisário decai consideravelmente durante as fases de proestro e estro, demonstrando que a concentração aumentada de estradiol observada nesse período é capaz de estimular a liberação de ocitocina a nível hipofisário (Yamaguchi et al., 1979; Crowley et al., 1978). Estudos mais antigos demonstraram que estradiol é capaz de excitar neurônios ocitocinérgicos, mas não vasopressinérgicos do núcleo paraventricular de ratas ovariectomizadas. Os efeitos observados foram correlacionados com a administração prévia de estradiol por dois dias anteriores ao procedimento de estereotaxia e registro dos potenciais de ação antidrômicos por estimulação elétrica na hipófise posterior (Akaishi & Sakuma, 1985).

Outros trabalhos buscaram correlacionar a secreção de ocitocina à ativação dos receptores clássicos de estrogênios, ER α e ER β . Entretanto, a existência de ER α nos neurônios ocitocinérgicos é controversa e a ativação de ER β ainda permanece em estudo com possibilidade da expressão do gene da ocitocina ser mediada via esse último receptor (Sharma et al., 2012; Shughrue et al., 2002). De maneira interessante, Wang e colaboradores, em 1995, demonstraram que estradiol induz a secreção de ocitocina e AVP dos dendritos e corpo celular em neurônios magnocelulares. O estudo foi feito com neurônios do núcleo supraóptico e foi analisada a exocitose dos grânulos secretores de ocitocina por eletromicroscopia. Um aspecto importante a ser destacado desse estudo é o papel do estradiol na secreção de ocitocina por mecanismos rápidos

e provavelmente não-genômicos, sob concentrações fisiológicas que ocorreu após 20 minutos da exposição ao esteroide (Wang et al., 1995). Naquela época observou-se uma lacuna para a explicação do efeito observado, uma vez que efeitos mediados por estradiol eram tidos como genômicos, ou seja, respostas mais demoradas por meio de ativação de receptores ER α e ER β . Sendo assim, maiores investigações sobre tal mecanismo serão foco do presente estudo, tendo por base a hoje conhecida presença de um receptor de membrana, o GPER 1 (GPR30).

1.2. Estrogênios e seus receptores

Os estrogênios são hormônios esteroides produzidos em grandes quantidades pelos ovários e outros tecidos, tais como o encéfalo, tecido adiposo, glândulas adrenais, entre outros. Devido a seu amplo espectro de ação e tecidos alvos, é de grande interesse o entendimento dos mecanismos de ação dos estrogênios e a modulação destes hormônios em outros sistemas.

Estrogênios participam de diferentes eventos fisiológicos, tais como a fertilidade, a secreção dos hormônios hipofisários (Somponpun & Sladek, 2002; Wang et al., 1995), da função imune (Watson & Gametchu, 2001), da homeostase cardiovascular (Murphy & Steenbergen, 2007), da neuroproteção (Baudry et al., 2012; Al-Sweidi et al., 2012), da manutenção da matriz óssea (Hadji, 2012) e do metabolismo energético (Faulds et al., 2012), dentre outros.

A secreção de estradiol ocorre de maneira cíclica no organismo feminino a partir da aromatização de androgênios em estrogênios nas células da granulosa dos ovários. A variação da concentração plasmática de estradiol influencia a resposta de diferentes tecidos em todo o organismo, sendo assim, faz o reconhecimento de diferentes fases durante os ciclos hormonais femininos. Em ratas, o ciclo reprodutivo é constituído basicamente de quatro fases definidas a partir da morfologia do esfregaço vaginal (Long & Evans, 1922). As concentrações plasmáticas de estradiol aumentam consideravelmente na fase do proestro em decorrência da sinalização hipofisária de hormônio folículo estimulante (FSH). Apesar da caracterização de quatro fases bem

definidas, durante a própria fase de proestro, há um aumento considerável de estradiol e progesterona durante o período da tarde para desencadeamento do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH). Após o pico de LH, ocorre o evento da ovulação e posteriormente a formação de um corpo lúteo ovariano capaz de secretar progesterona em grande quantidade. (Smith et al, 1975). Sabe-se que a retroalimentação positiva do estradiol sobre o pico de gonadotrofinas é essencial, entretanto a presença da progesterona local é facilitatória para secreção de LH hipofisário em quantidades fisiológicas (Mennin & Gorski, 1975; Kuo & Micevych, 2012).

Classicamente, a ação dos estrogênios nas células alvo acontece através de seus receptores nucleares, ER α e ER β , que modulam a transcrição de vários genes. Os receptores nucleares estão presentes principalmente no citosol e quando ligados à molécula dos estrogênios se dimerizam e translocam-se para o núcleo. A resposta transcricional desta sinalização ocorre devido a ligação desse dímero em sequências específicas do genoma denominadas Elementos Responsivos a Estrogênio (EREs). Todavia, sabe-se que os estrogênios são capazes de efetuar efeitos genômicos via outros elementos responsivos como AP-1 (*Activator Protein-1*) e CREB (*cAMP response element-binding protein*), entre outros fatores de transcrição (Edward, 2005).

Em adição às alterações na maquinaria de transcrição nuclear mediada pelos estrogênios, tais moléculas possuem efeitos fisiológicos rápidos e não-genômicos (Boonyaratanakornkit & Edwards, 2007; Fu & Simoncini, 2007). Os efeitos não-genômicos mediados pelos estrogênios possuem diferentes candidatos como receptores. Entre eles se destacam os receptores ER α e ER β , porém ancorados juntamente com complexos proteicos à membrana plasmática, e receptores recentemente descritos como ER-X, Gq-mER e GPR30 capazes de ativar vias intracelulares independentes de transcrição nuclear (Micevych & Kelly, 2012). A consequência da sinalização de estrogênios via respostas não-genômicas tem sido bastante discutida em estudos com células excitáveis. O estradiol é capaz de modular a resposta de receptor ionotrópico de glutamato por ação primária em outras proteínas, como por exemplo, canais de potássio retificadores de influxo (GIRK). A ativação desses canais levam a uma robusta hiperpolarização neuronal e o estradiol é capaz de modular negativamente essa resposta. Outras vias de ativação da resposta não-

genômica por estrogênios ocorre, por meio da geração de segundos mensageiros e ativação de receptor acoplado à proteína G.

O receptor aqui citado, GPR30, foi caracterizado ainda nos anos 1990 por diferentes grupos (O'Dowd et al., 1998; Camerci et al., 1997; Owman et al., 1996). O receptor GPR30 foi recentemente renomeado pela IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) como *GPER 1* (Filardo et al., 2009)

1.3 GPER 1_ Receptor de Estrogênio acoplado à Proteína G

1.3.1 Caracterização inicial do GPER 1

O GPER 1 é da categoria de receptores de membrana com sete domínios transmembrânicos acoplado à proteína G (*GPCRs_G-protein coupled receptors*). Tais receptores são ligados ao complexo heteromérico da proteína G composto pelas subunidades α , β e γ . A partir da ligação do hormônio, ocorre uma mudança conformacional no receptor, o que possibilita o desacoplamento da subunidade $G\alpha$ do complexo $G\beta\gamma$. Os GPCRs são divididos em quatro famílias baseadas no subtipo de $G\alpha$ presente: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$. $G\alpha_s$ ativa adenilil ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc), um importante segundo mensageiro celular, que por sua vez ativa a proteína cinase A (PKA). $G\alpha_i$, por outro lado, diminui os níveis de AMPc por inibir a atividade da adenilil ciclase. $G\alpha_{q/11}$ estimula fosfolipase C β (PLC β), promovendo a produção de outros importantes segundos mensageiros tais como o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3). $G\alpha_{12/13}$ é responsável por controlar a atividade de proteínas Rho. (Sladek & Song, 2012).

O grupo de Filardo e colaboradores demonstrou que a ativação de ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) mediada por estradiol em células de câncer de mama é dependente da presença de GPER 1. A partir da expressão induzida de GPER 1 em células de câncer de mama do tipo *MDA-MB-231*, que expressam pouco ou nenhum ER α e GPER 1, ocorreu a fosforilação ERK1/2 dependente de estradiol, semelhante à resposta obtida em células *MCF-7* que expressam tanto o ER α e GPER 1. A fosforilação de ERK1/2 dependente de estradiol foi também observada em células

cancerosas da mama *SkBr3*, que expressam GPER 1, mas não possuem ER α . Em conjunto, estes resultados indicaram que a expressão GPER 1 é essencial para a ativação rápida de ERK (Filardo et al., 2000).

A ativação de ERK via GPER 1 ocorre inicialmente através da ativação do receptor tirosina cinase, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). O processo envolve a proteína G α_s e consequente aumento da produção de AMPc. Via G $\beta\gamma$ - ocorre a ativação de Src e fosforilação de Shc, resultando na liberação de HB-EGF (*Heparan Bound-Epidermal Growth Factor*) e produção subsequente de EGF, que por sua vez, se liga ao receptor EGFR por sinalização parácrina ou autócrina (Quinn et al., 2009). A sinalização iniciada por EGFR desencadeia principalmente duas cascatas bioquímicas: ativação de PI3K (*Phosphatidylinositide 3-kinase*) e ERK (Filardo & Thomas, 2005). Estudos de outros grupos têm mostrado que a transcrição do gene *c-fos* em células de câncer da mama após administração de estradiol ocorre de maneira dependente da expressão de GPER 1, uma vez que o nocaute de *Gper1* em células deixam de apresentar essa resposta (Maggiolini et al., 2004).

O aumento da produção de AMPc após a administração de estradiol já era conhecido desde a década de 1960 em útero de ratas (Szego & Davis, 1967) e posteriormente em artérias coronárias (Mugge et al., 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que, em preparações de membrana de células *SkBr3*, que expressam apenas GPER 1, ocorre produção de AMPc mediada após administração de estradiol. Em adição, ativação de GPER 1 mediada por estradiol ou seu agonista, G-1, leva a maior mobilização de cálcio intracelular em diferentes tipos celulares. Primeiramente foi demonstrada mobilização de cálcio estimulada por estradiol em células COS7 transfectadas com GPER 1 (Revankar et al., 2005), bem como em células *SkBr3* (Dennis et al., 2009) e células HEK₂₉₃ que expressam GPER 1 (Filardo et al., 2007). Em adição, estradiol e agonista de GPER 1, G-1, são capazes de iniciar sinalização de cálcio intracelular em neurônios hipotalâmicos (Brailoiu et al., 2007). Entretanto, a administração de G-1 não foi capaz de ter os mesmos efeitos em neurônios GnRH (Romano et al., 2008).

1.3.2 GPER 1 e seus ligantes

Receptores de estrogênios clássicos apresentam uma forte preferência para a molécula 17- β estradiol, encontrado no organismo, em comparação com seu isômero 17 α -estradiol. Testes de ligação competitiva demonstraram que similarmente, o 17 α -estradiol não liga-se ao receptor GPER 1. Outras formas fisiológicas de estrogênios, estrona e estriol, assim como outros esteroides, incluindo cortisol, progesterona e testosterona, não se ligam ao GPER 1 (Thomas et al., 2005).

Os estudos mostraram que o tamoxifeno, bem conhecido como um modulador seletivo de receptor de estrógeno (SERM), e ICI182,780 ligam-se de maneira significativa ao GPER 1, todavia, ao contrário das propriedades antagonistas que esses compostos exibem com respeito aos receptores de estrogênios clássicos, ambos os compostos servem como agonistas de GPER 1 (Revankar et al, 2005; Filardo et al, 2000). Como um dos efeitos mediados pela ligação tamoxifeno-GPER 1, ocorre um aumento da incidência de hiperplasia do endométrio em pacientes com câncer de mama tratadas com esse medicamento, o qual é usualmente administrado na prática clínica (Smith et al, 2007; Senkus-Konefka et al, 2004).

Em 2006, Bologna e colaboradores identificaram um composto não esteroide, denominado G-1, através de uma combinação de triagem virtual e biomolecular para um ligante específico de GPER 1 (Bologna et al., 2006). Os estudos mostraram uma afinidade de ligação de G-1 para GPER de cerca de 11 nM, em comparação com 6 nM para estradiol. Nenhuma ligação significativa de G-1 em concentrações de até 1 μ M pôde ser demonstrada para ER α ou ER β . A caracterização funcional de G-1 demonstrou uma ativação GPER 1 seguida da mobilização de cálcio intracelular e ativação de PI3K. Desde a sua descoberta, G-1 tem sido utilizado em um grande número de estudos para investigar o papel de GPER 1 em numerosos sistemas e em estudos com células cancerosas. Mais recentemente, foi identificado o antagonista para o receptor GPER 1, G15, o que permitiu ampliar o conhecimento dos papéis do GPER 1 nos sistemas reprodutivo e nervoso (Dennis et al., 2009). Após tal descoberta, outro antagonista que possui menor atividade com o receptor ER α e efeitos similares ao G-15 para GPER 1 foi também identificado e nomeado G-36 (Dennis et al., 2011).

1.3.3 GPER 1: Localização, Distribuição e Efeitos Fisiológicos

Muitos dos estudos, já aqui citados, buscaram a caracterização da sinalização mediada por GPER 1 em culturas celulares. O GPER 1 tem sido considerado um receptor de membrana por muitos estudos, embora sua localização na célula ainda seja discutida (Funakoshi et al., 2006). Trabalhos iniciais demonstraram a presença do receptor na membrana plasmática em preparações *in vitro* de membrana. Todavia sabe-se hoje que a localização celular de GPER 1 é predominantemente intracelular, no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (Matsuda et al., 2008; Otto et al., 2008; Hirotaka et al., 2007; Revankar et al., 2005).

Em um estudo de expressão do receptor GPER 1, foi utilizada a estratégia de co-expressão do gene para o receptor juntamente com o gene repórter lacZ em camundongo. A expressão foi identificada em diferentes tipos celulares como endotélio de pequenas artérias, em múltiplos tecidos como coração, rins, peritônio e trato genital; células de músculo liso e pericitos no cérebro; células principais gástricas no estômago; subpopulações neuronais na camada II do córtex bem como no giro denteado; em populações de células do lobo intermediário e lobo anterior da hipófise e em células cromafins da medula das glândulas adrenais (Isensee et al., 2009).

Outro estudo buscou, por meio da técnica de imunohistoquímica, a localização de GPER 1 em cérebro e alguns tecidos periféricos. Os resultados indicaram expressão do receptor em diferentes áreas do prosencéfalo como na formação hipocampal (CA1-CA3), diferentes áreas do córtex, expressão pronunciada no hipotálamo (área preóptica, núcleos supraquiasmático, PVN, SON, núcleo arqueado e ventromedial), no mesencéfalo (substância nigra), núcleos pontinos e locus coeruleus, e algumas regiões da medula espinhal. Em adição a estes resultados, o estudo também demonstrou a presença de GPER 1 na hipófise (lóbulos anterior, intermediário e neural), células cromafins da glândula adrenal, células musculares lisas da pelve renal e densa marcação na células da granulosa dos ovários em detecção no corpo lúteo (Hazell et al., 2009). Brailoiu e colaboradores, por outro lado, já haviam demonstrado a presença de GPER 1, por meio de imunohistoquímica em cérebro de ratos, no hipotálamo, principalmente no PVN e SON; estriado e Ilhas de Calleja, além de regiões do tronco encefálico como área postrema, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago (Brailoiu et al., 2007).

O estradiol possui diversos efeitos já descritos na literatura sobre o sistema nervoso desde modulação da plasticidade neural até sob sua influência sobre processamento sensorial e cognição. Foi demonstrado que ativação do receptor GPER 1 diminui a sinalização do receptor de serotonina 5-HT(1A) no PVN, demonstrada por uma redução dos níveis de ocitocina e ACTH. Desses resultados conclui-se que o receptor GPER 1 pode ser responsável pelos efeitos, já descritos anteriormente, nos quais o estradiol é responsável por aumentar o efeito de drogas ansiolíticas (Xu et al., 2009).

Ações rápidas do estradiol sobre neurônios hipotalâmicos têm sido descritas em muitos trabalhos (Kelly & Rønnekleiv, 2012; Dominguez & Micevych, 2010; Malyala et al., 2005). Sabe-se que o estradiol é responsável por realizar o mecanismo de “feedback” positivo sobre o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH). Após tal evento ocorre a inibição da secreção das gonadotrofinas, LH e hormônio folículo estimulante (FSH) (hormônio folículo-estimulante). O estradiol também age como principal estimulador da síntese e secreção de prolactina, que ocorre em um período de tempo relativamente curto, através da retirada da inibição de neurônios dopaminérgicos sobre os lactotrófos hipofisários (Grattan & Kokay, 2008; Freeman et al., 2000). A participação de receptores de membrana sobre a secreção de prolactina ainda permanece em estudo, mas sabe-se que infusão intracerebroventricular (icv) de G-1 é capaz de mimetizar os efeitos do estradiol sobre a secreção de prolactina. No entanto, no mesmo estudo referenciado, G-1 não foi capaz de inibir o “feedback” negativo sobre a secreção de LH (Lebesgue et al., 2009).

Estradiol também é responsável por proteger o encéfalo de danos patológicos e déficit de memória. G-1, atuando no receptor GPER 1, foi capaz de proteger células hipocâmpais de neurotoxicidade induzida por glutamato (Gingerich et al., 2010). Além disso, ativação do receptor GPER 1 por G1 e administração de estradiol proporcionam níveis semelhantes de neuroproteção em modelo de isquemia em ratas jovens ovariectomizadas (Lebesgue et al., 2010).

Grande atenção tem sido direcionada à identificação de GPER 1 no hipotálamo, principalmente nos núcleos PVN e SON. Nesses núcleos, a marcação para o receptor é localizada principalmente em neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos. Já era conhecido que nessas regiões hipotalâmicas há predomínio de receptor clássico para estrógenos, ER β . No entanto, sua expressão é maior em células do PVN produtoras do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a presença de GPER 1 nessa região

poderia ser um indício de uma via de sinalização mediada por estradiol, não-genômica, em neurônios produtores de ocitocina e AVP (Brailoiu et al., 2007). A colocalização de ocitocina e GPER 1 foi demonstrada por meio de imunofluorescência e hibridização *in situ* no PVN e SON com identificação intracelular do receptor no aparelho de Golgi. (Sakamoto et al., 2007). A função do GPER 1 nessas regiões ainda não está clara na literatura e será um dos focos deste presente estudo.

2. Justificativa

Os esteroides ovarianos, especialmente o estradiol, estão diretamente relacionados à secreção de ocitocina ao longo do ciclo reprodutivo de fêmeas. A participação do estradiol na secreção de ocitocina pode ocorrer rapidamente, o que indica o envolvimento de mecanismos não-genômicos. Estradiol é capaz de modificar a resposta de órgãos alvos para ocitocina como a glândula hipófise e o útero. Assim, o estudo do perfil de variação do receptor GPER 1 ao longo do ciclo reprodutivo e o efeito da administração de estradiol sobre a expressão de seu próprio receptor se faz necessária.

3. Objetivo

Investigar o papel do estradiol na expressão do receptor GPER1 em tecidos alvos para ocitocina.

3.1. Objetivos Específicos

- Estudar o perfil de variação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) e proteico para *GPER 1* nas diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar no PVN e SON, núcleos secretores de ocitocina.
- Estudar o perfil de variação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) do receptor de ocitocina, OTR, na hipófise ao longo do ciclo estral.
- Estudar o perfil de variação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) e proteico para *GPER 1* nas diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar em tecidos alvos para ocitocina: a glândula hipófise e a o útero.
- Investigar o papel da administração de estradiol sobre a expressão gênica (RNAm) de *GPER 1* e OTR na glândula hipófise e útero.

4. Materiais e Métodos.

4.1. Ciclo estral

Ratas Wistar de aproximadamente 250g com regime de água e ração *ad libitum* e controle de temperatura e iluminação (12:12h), tiveram o ciclo estral acompanhado durante, pelo menos 15 dias (3 ciclos completos), por meio da coleta e visualização do esfregaço vaginal. Para realização do esfregaço vaginal, é feita a contenção do animal e inserção de uma pipeta contendo aproximadamente 0.5mL de solução salina (0,9%NaCl) no canal vaginal. A gota coletada é então colocada em uma lâmina de vidro e visualizada no microscópio (em aumento de 20x na objetiva).

A visualização do esfregaço segue parâmetros previamente estabelecidos quanto à morfologia das células coletadas do canal vaginal (Becker et al., 2005).

Com o objetivo de obter uma fase do ciclo com maior concentração de estradiol circulante para comparação com as demais fases, foi necessária a identificação e sacrifício de ratas na fase de proestro no período da tarde e as demais fases no período da manhã, como já indicado em trabalhos clássicos da área da endocrinologia (Smith et al., 1975). Esfregaços provenientes da fase de proestro apresentam grupos celulares bem aderidos uns aos outros (*clusters*) de células epiteliais nucleadas e arredondadas. Na fase de diestro, o esfregaço vaginal apresenta grande quantidade de células leucocitárias, no estro é caracterizado por uma grande quantidade de células epiteliais cornificadas de forma escamosa, e na fase de metaestro apresenta grande quantidade de leucócitos, bem como de diferentes células amorfas e poucas células nucleadas e cornificadas. As ratas foram divididas nos seguintes grupos segundo a fase do ciclo identificada: *Proestro*, *Estro*, *Metaestro* e *Diestro* para todos os grupos.

Todos os procedimentos estavam de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) no protocolo nº. 120 / 2014.

4.2 Coleta de tecidos

Em um primeiro grupo de animais, após a identificação da fase do ciclo, foi realizada a perfusão do cérebro. As ratas foram anestesiadas com Cetamina (100 mg/mL) e Xilazina (20 mg/mL), com administração de 0,1mL/100g de peso corporal.

Após anestesia, as ratas foram perfundidas intracardialmente com 100 mL de solução heparinizada de PBS 0,1M (Tampão Fosfato Salino) seguida de 400 mL de solução de paraformaldeído 4%. Durante a perfusão a artéria aorta é ocluída com pinça hemostática e o útero foi retirado e pesado para confirmação da fase do ciclo estral. Após a perfusão, cérebro e hipófise foram coletados. Cérebros foram pós-fixados em paraformaldeído 4% durante 2h, preservados em solução de sacarose 30g/L, congelados rapidamente, em isopentano a - 80° e posteriormente mantidos em freezer - 80° C, aguardando o processamento para imunohistoquímica. As hipófises foram retiradas e pós-fixadas em paraformaldeído 4% durante 24h e preservadas em álcool etílico 70°.

Em um segundo desenho experimental os animais também tiveram o acompanhamento do ciclo estral e sacrifício por decapitação para coleta do sangue e órgãos: cérebro, hipófise e útero. O plasma foi obtido após centrifugação a -4° C durante 20 minutos em rotação de 3.000 rpm. Após a coleta, o plasma foi colocado em alíquotas em tubos de 0.5 mL e mantidos à -80° C. A hipófise foi dividida em adenohipófise e neurohipófise com auxílio de pinças. O cérebro foi imediatamente congelado em gelo seco para posterior obtenção do SON e PVN utilizando-se de agulhas de microdissecção.

4.3 Efeito da administração de estradiol por reposição hormonal

Ratas Wistar de aproximadamente 250g com regime de água e ração *ad libitum* e controle de temperatura e iluminação (12:12h) foram anestesiadas 0,1mL/100g de peso corporal de uma solução de Cetamina (100 mg/mL) e Xilazina (20 mg/mL), . Após anestesia, as ratas foram ovariectomizadas bilateralmente.

A recuperação cirúrgica ocorreu por uma semana. As ratas foram divididas em quatro grupos de tratamento para avaliação do efeito dos principais esteroides ovarianos sobre a expressão de GPER1 e OTR.

Os seguintes tratamentos por injeção subcutânea foram utilizados:

- **Grupo 1: OVX** – animais tratados com óleo de milho durante 4 dias
- **Grupo 2: E2** – animais tratados com *Cipionato de Estradiol (10µg/0,2mL/rata) por 4 dias
- **Grupo 3: E2 + P4** – animais tratados com *Cipionato de Estradiol (10µg/0,2mL/rata) por 4 dias mais injeção de **Progesterona (2,5mg/0,2mL/rata) no quarto dia.
- **Grupo 4: P4** – animais tratados com óleo de milho por 4 dias mais injeção de **Progesterona (2,5mg/0,2mL/rata) no quarto dia.

*Cipionato de Estradiol. Pfizer. Guarulhos, SP, Brasil.

** Progesterona (4-Pregnene-3,20-diona). Sigma-Aldrich. St Louis, MO, EUA.

Seguido o sacrifício, sangue e tecidos (hipófise e útero) foram coletados. O peso uterino foi medido para verificação do efeito da terapia de reposição hormonal segundo cada tratamento.

4.4 Extração de RNA e Real-Time PCR

Os tecidos foram processados em tubos *ependorf* previamente autoclavados. Foram adicionados 1 mL de TRIzol® em cada tubo, seguidos de homogeneização dos tecidos, por meio de protocolo já estabelecido em nosso laboratório.

Ao homogenato, adicionou-se clorofórmio e realizou-se centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante translúcido foi transferido cuidadosamente para tubos plásticos (*ependorf*) de 1,5 mL autoclavados, e adicionou-se 650 µL de isopropanol. Seguiu-se, uma centrifugação de 35 minutos a 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1 mL de etanol a 75% ao precipitado, seguindo-se de uma centrifugação por 15 minutos de 12.000 rpm à 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o RNA extraído foi diluído em água estéril livre de DNase e RNase sendo mantido à -80° C. O RNA será ressuspendido em 10-50µl de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc.), e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (*turbo-DNA-free*™, Ambion Inc.).

Resumidamente, a cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para DNase I e 1 µl de DNase I. A seguir, as amostras foram incubadas por 30 min à 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação, seguido por incubação por 2 min a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g por 2 min para precipitar o reagente de inativação com a DNase.

Os primers para *GPER 1* e *OTR* foram previamente diluídos em água estéril livre de DNase e RNase. Os primers utilizados para análise de *GPER 1* foram:

18S

Forward: 5' **CGGCTACCACATCCAAGGAA** 3'

Reverse: 5' **GCTGGAATTACCGCGGCT** 3'

GPER1

Forward: 5' **TCCTGCCTCTACACCATCTT** 3'

Reverse: **ACAGGTCTGGGATAGTCATCTT** 3'

OTR

Forward: 5' **GGGTCAGTAGTGTCAAGCTTAT** 3'

Reverse: 5' **CACATCTGCACGAAGAAGAAAG** 3'

A transcrição reversa foi realizada em tubos previamente autoclavados a partir de 1 µg de RNA, adicionando-se uma solução contendo 1 µL de random primers (100 ng/µL), 1 µL de dNTP (10 mM) e água livre de RNases e DNases para um volume final de 13 µL. A incubação ocorreu à 65° C por 5 minutos e à -4° C por 1 minuto. Após incubação foi adicionada, à solução anterior, 4 µL de tampão para PCR, DTT (0,1M), inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima Superscript III RT. A seguinte incubação ocorre à 25° C por 5 minutos; 50° C por 50 minutos e 70° C por 15 minutos. O cDNA resultante do processo foi armazenado à -20° C.

Para o PCR quantitativo foi necessário o preparo das soluções separadamente para amplificação para o gene de interesse *gper 1* ou *otr* e para o gene normalizador *18s*. Tais soluções possuem os primers *forward* e *reverse* dos genes citados em água livre de RNase e DNase. As amostras, seguidas das suas respectivas soluções, foram pipetadas na placa de 96 poços juntamente com mix universal SYBRgreen (LifeTechnologies™). A análise dos dados será feita pela comparação entre número de cópias dos poços controle e experimentais, obtida entre as porções de crescimento

geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (CT), foi encontrado o ΔCT que é a diferença do valor médio para o gene de interesse e para o RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços tratados da média dos poços de menor expressão, obtendo-se o $\Delta\Delta CT$. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$), obtendo-se assim o número de vezes que o gene foi expresso em relação a este grupo de menor expressão (Livak & Schmittgen, 2001). A análise da expressão gênica segundo o método citado parte da comparação entre diferentes tratamentos ou estados fisiológicos capazes de mudar o perfil de expressão de RNA do tecido alvo

4.5 Imunohistoquímica e imunofluorescência

As hipófises (n=4), previamente coletadas da perfusão, foram processadas para imunohistoquímica para GPER1 (irGPR30) utilizando-se o complexo avidina-biotina já previamente padronizado (Brailoiu et al. 2005). Cortes de 5 μ m, em micrótomo, foram primeiramente tratados com H₂O₂ a 3% para extinguir as peroxidases endógenas, bloqueados com soro de cabra normal a 10%, e incubadas com GPER1 anti-soro (diluição 1:10.000). GPER1 anti-soro é um anticorpo policlonal de coelho (Abcam, Eugene, EUA) dirigido contra o terminal-C humano GPER1 (CAVIPDSTEQSDVRFSSAV; Revankar et al 2005). Após lavagem cuidadosa, os cortes foram incubados com anticorpo biotilado anti-IgG de coelho (diluição 1:150, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 2h e lavagem com PBS. A incubação em solução de complexo avidina-biotina foi feita por 1 h (diluição 1:100, Laboratórios Vector). Seguindo várias lavagens em tampão salino Tris 0,05M, os cortes foram incubados em solução de 0,05% diaminobenzidine (DAB) / 0,001% H₂O₂ e lavados durante pelo menos 2h, no mesmo tampão. As secções foram montadas em lâminas com álcool gel a 0,25%, seco ao ar, desidratadas com álcool absoluto seguido de xileno e cobertas por lamínulas. Para cada secção analisada, 8 campos de área 0,15mm² (objetiva de 20x), capazes de cobrir maior parte do corte de adenohipófise, foram analisados. Como controle, algumas secções foram processadas com soro pré-imune em lugar de anti-soro GPER1. As imagens foram analisadas em Microscópio Axio Vert. A1 com câmera de aquisição em cores AxioCam MR3 e software *AxioVision LE64*.

Imunofluorescência: Cérebros coletados (n=4-5), após perfusão intracardíaca, foram utilizados para estudos de colocalização neuronal do receptor GPER 1 e ocitocina. Secções de 30 µm foram obtidas em criostato da região correspondente aos PVN e SON, segundo as coordenadas do atlas de Paxinos & Watson (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, San Diego, 2007*). Todos os cortes coronais obtidos da porção medial do PVN (Bregma: -1,80mm a -2,12mm) e da porção anterior do SON (Bregma: -0,92mm a -1,40mm) foram analisados bilateralmente. O valor da contagem do número total de secções obtidas foi normalizado para quatro secções (menor número de secções obtidas). Os cortes foram previamente lavados com PBS 0,01M, tratados com glicina 0,1M e posteriormente incubação com uma solução de 0,04% Triton TX-100 em PBS e, posteriormente, com uma solução de 2%BSA em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Seguiu-se uma incubação com anticorpo para GPER 1 feito em coelho (Abcam ab39742, Cambridge, EUA), na concentração 1:5.000 e ocitocina feito em camundongo (Abcam ab78364, Cambridge, EUA) também na concentração 1:5.000. Ambos anticorpos primários foram diluídos em solução de PBS0,01M adicionado de 0,3% Triton TX-100 e 1%BSA. A incubação ocorreu por durante 40 h à -4 °C Após o período descrito, o processo foi seguido por lavagens em PBS e incubação com os anticorpos secundários: Alexa Fluor® 488 (ab150073) anti-coelho feito em burro e Alexa Fluor® 647 (ab150115) anti-camundongo feito em cabra, ambos diluídos 1:500 em solução de PBS0,01M adicionado de 0,3% Triton TX-100 e 1%BSA. Para aquisição das imagens utilizou-se Microscópio Axio Vert. A1 com câmera de captação em preto e branco AxionCam M2 Zeiss e software *AxionVision 4.8*. Foi utilizado o filtro FITC de excitação a 495nm e emissão a 517nm para detecção de sinal para GPER1 e filtro 647 de excitação a 653nm e emissão a 669nm para detecção de sinal correspondente a imunomarcacão de ocitocina. Em software *ImageJ* (NIH) as imagens foram processadas em Série Z, para melhor visualização, e coloridas artificialmente em verde para imunodeteccão de GPER1 e vermelho para imunodeteccão de ocitocina. Sobreposição das imagens e geração de coloração em ameralo indicam colocalização protéica.

4.6 Dosagem de estradiol e progesterona por ELISA

As amostras de plasma coletadas sem a presença de inibidores foram utilizadas para dosagem de estradiol e progesterona por método de ELISA. A dosagem segue as

especificações do *kit* para Estradiol do fabricante (DRG Instruments GmbH, Frauenbergstr, Alemanha).

5. Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov & Smirnov seguida da análise de variância (ANOVA) one-way e complementados por pós-teste de Newman-Keuls. O nível de significância adotado em todos os testes foram $P < 0,05$, sendo utilizado para as análises o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6. Resultados

6.1. Expressão de GPER1 e OTR ao longo do ciclo estral

Dados do primeiro desenho experimental demonstram que ratas na tarde de proestro apresentam maiores níveis de estradiol e progesterona plasmáticos, como já conhecido pela literatura (Smith et al, 1975). Ratas na manhã de proestro não apresentaram diferenças quanto aos valores de estradiol plasmático em comparação à tarde, entretanto o pico de progesterona foi apenas encontrado nesse período como demonstra na figura 1.

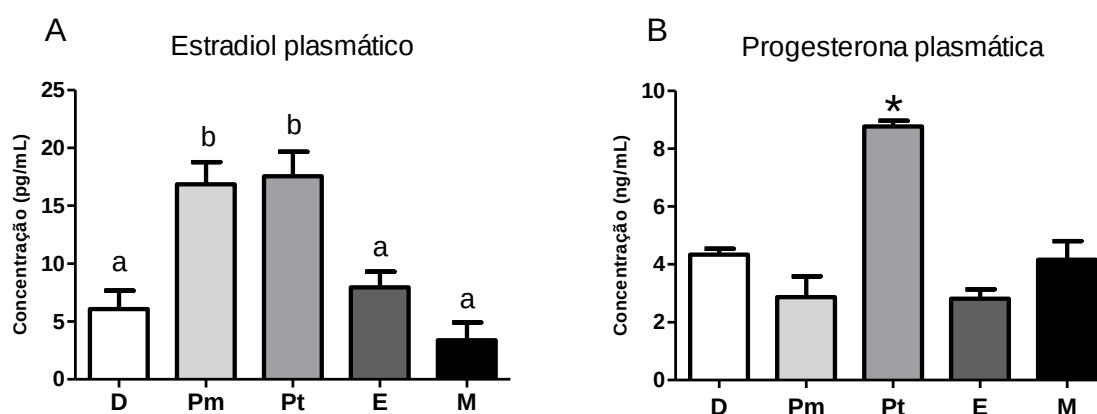


Figura 1: Concentração plasmática de estradiol (A) e progesterona (B) ao longo do ciclo estral de ratas. A concentração plasmática dos esteroides ovarianos foi determinada por método ELISA. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Valores são reportados como média±erro padrão. Letras diferentes e (*) indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

Seguindo para a análise da expressão gênica nos principais núcleos hipotalâmicos produtores de ocitocina, os resultados mostraram que a expressão de *gper1* possui variação durante o ciclo estral no PVN com maior valor de expressão na tarde de proestro e menores valores de expressão para a fase de metaestro. A expressão do receptor de estradiol no SON não variou durante as fases do ciclo (figura 2). O pico da expressão de GPER1 no PVN seguiu o mesmo perfil de variação observada nos níveis de estradiol e progesterona durante o ciclo estral, com altas concentrações presentes na tarde do proestro (figura 1).

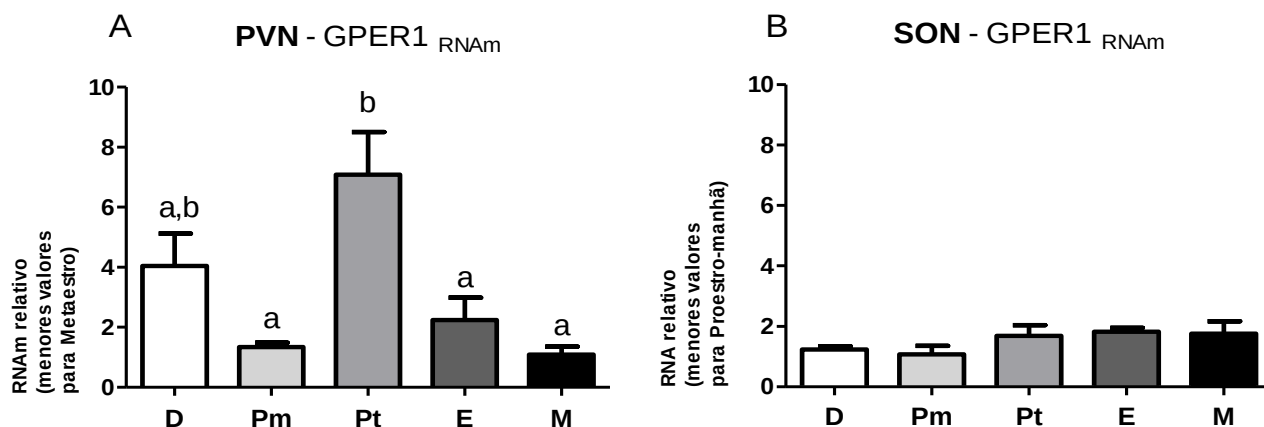


Figura 2: Expressão de GPER1_{RNAm} durante o ciclo estral de ratas nos principais núcleos hipotalâmicos secretores de ocitocina. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real na região do PVN (A) e do SON (B). A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Valores são reportados como média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

Em seguida à análise de expressão gênica para *gper1*, fez-se sua imunocolocalização proteica de GPER1 e ocitocina nas diferentes fases do ciclo estral: diestro, tarde de proestro, estro e metaestro. Na fotomicrografia da figura 3, observa-se que o GPER1 e ocitocina colocalizam-se nas regiões neurais estudadas. Após a análise do número de células, apresentada graficamente na figura 4, os dados mostram maior detecção de ocitocina durante a tarde do proestro (figura 4A), bem como do número de células que expressam GPER1 (figura 4B). A expressão do receptor de estradiol já mostrou-se aumentada durante o diestro, comparado com o estro e metaestro. Após a contagem dos neurônios que expressam GPER1 e ocitocina, pôde-se observar um pico de maior colocalização na fase de proestro com declínio durante o estro e retomada de aumento para fase de metaestro (figura 4C).

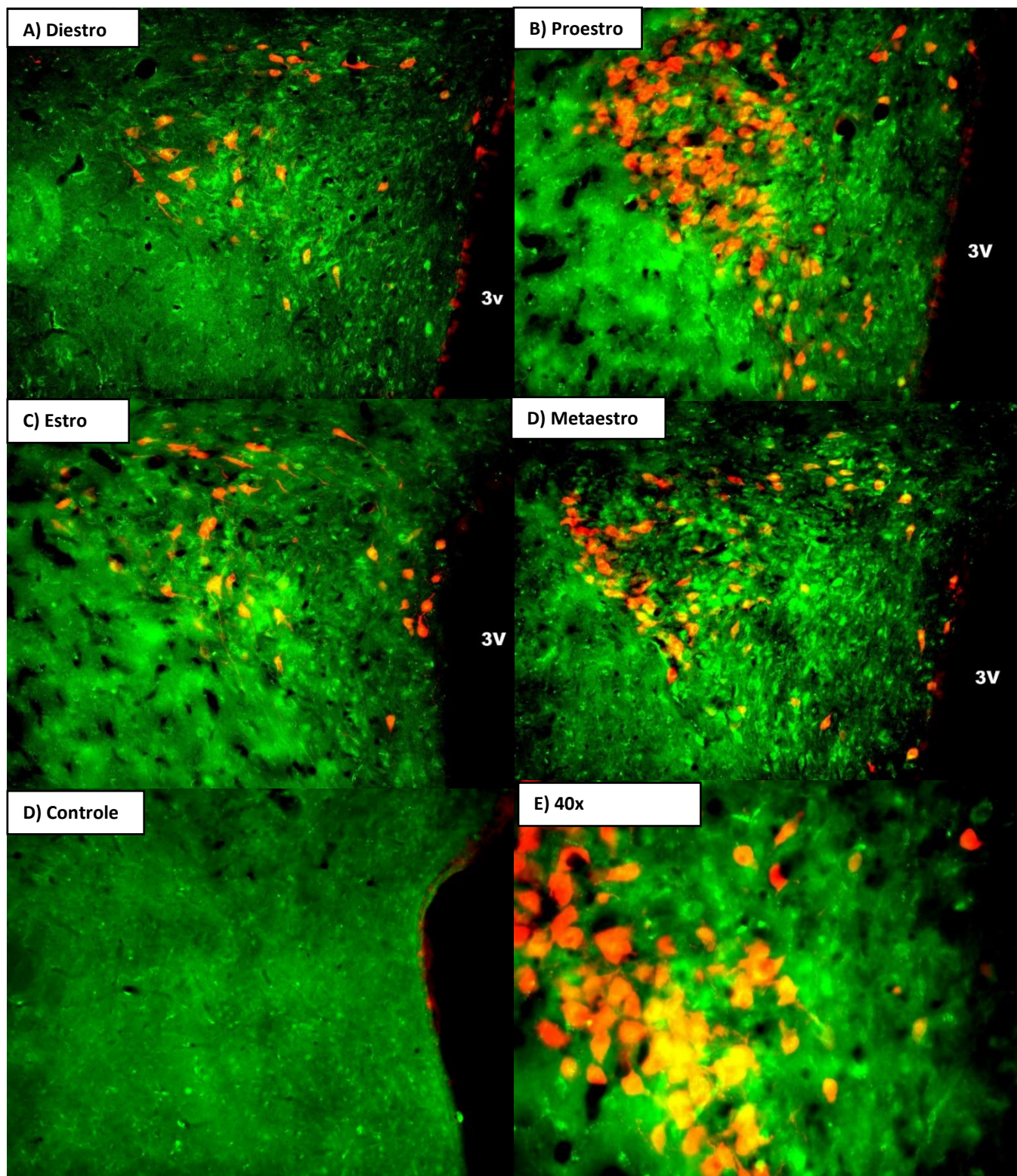


Figura 3: Fotomicrografias da imunolocalização para GPER1 e ocitocina no PVN. As figuras representam células de ratas nas fases de: A) diestro; B) proestro; C) estro; D) metaestro; E) ausência de anticorpo primário, controle e F) proestro (objetiva de 40x). A área analisada nas quatro fases corresponde a 0,38 mm². Em verde são representadas células irGPER1 e em vermelho irOcitocina. Colocalização entre as duas proteínas pode ser identificada em células amarelas. (3V), terceiro ventrículo.

PVN

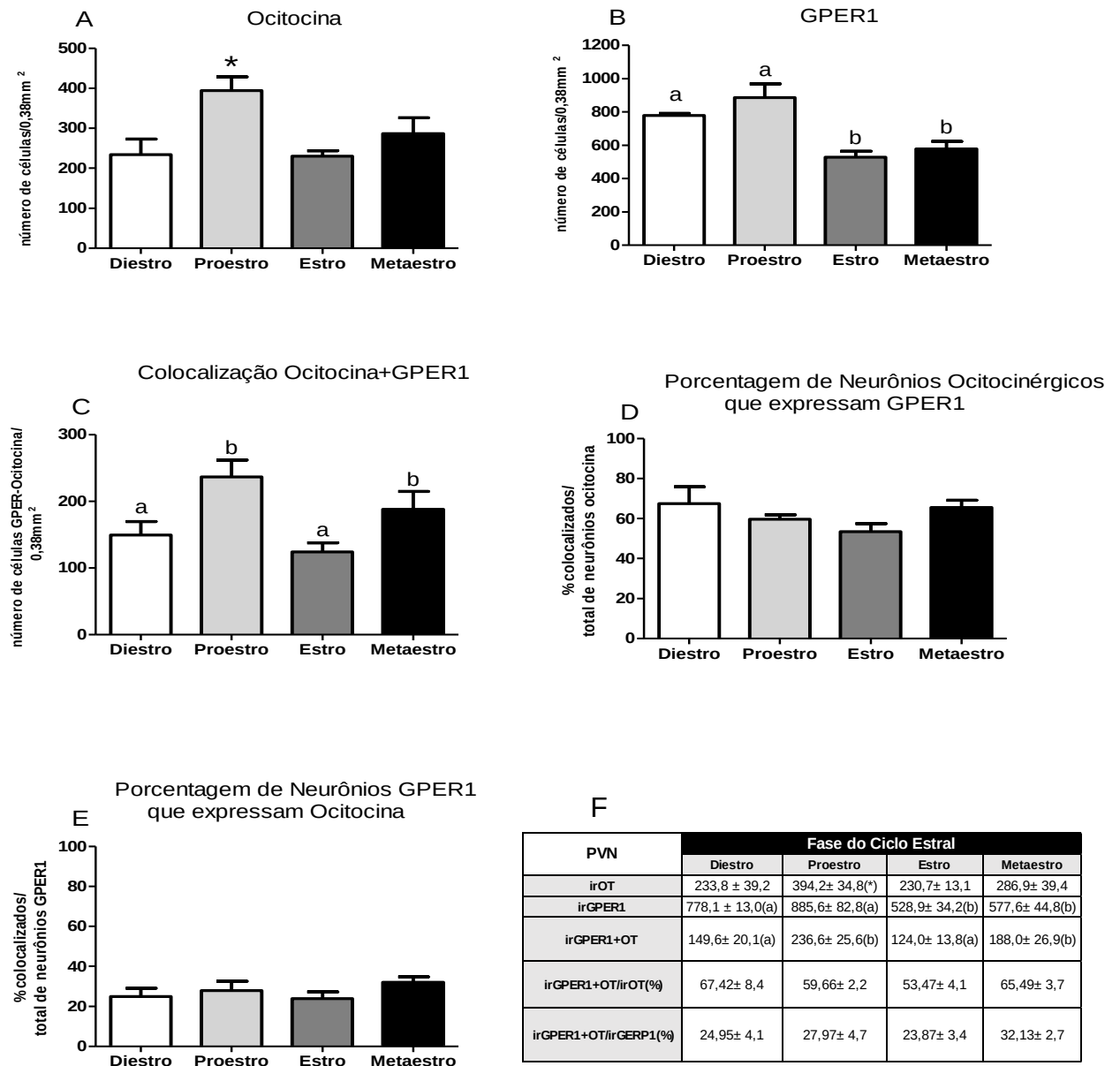


Figura 4: Análise da expressão proteica de ocitocina e GPER1 no PVN ao longo do ciclo estral de ratas. Valores são reportados como média±erro padrão do número de células imunoreativas (ir). A) irOcitocina; B) irGPER1; C) irOcitocina+GPER1; D) irOcitocina que expressam GPER1; E) irGPER1 que expressam ocitocina; F) tabela com valores referentes às análises apresentadas graficamente. Letras diferentes e (*) indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

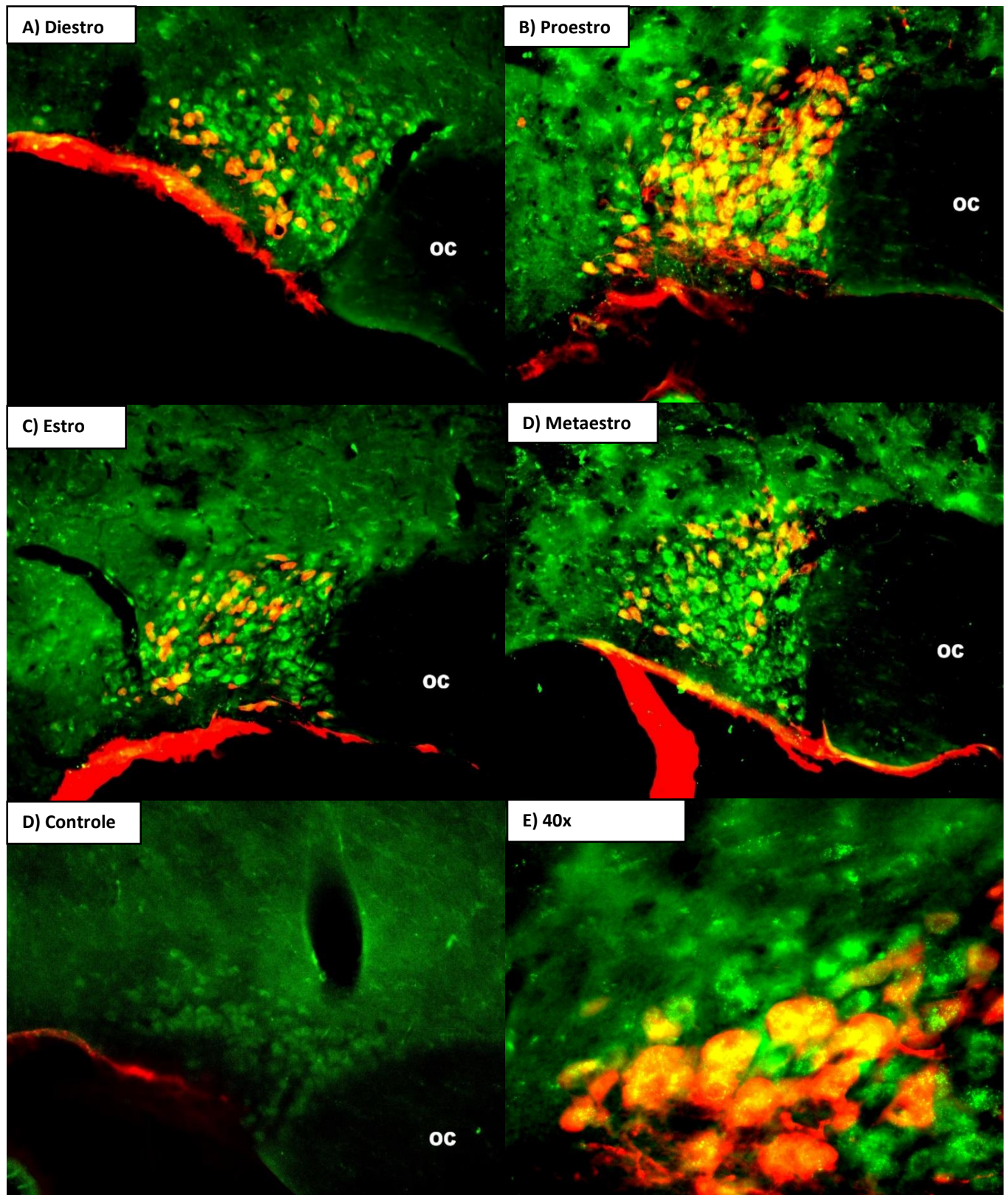


Figura 5: Fotomicrografias da imunolocalização para GPER1 e ocitocina no SON. As figuras representam células de ratas nas fases de: A) diestro; B) proestro; C) estro; D) metaestro; E) ausência de anticorpo primário, controle e F) proestro (objetiva de 40x). A área analisada nas quatro fases corresponde a 0,38 mm². Em verde são representadas células irGPER1 e em vermelho irOcitocina. Colocalização entre as duas proteínas pode ser identificada em células amarelas. (oc), quiasma óptico.

SON

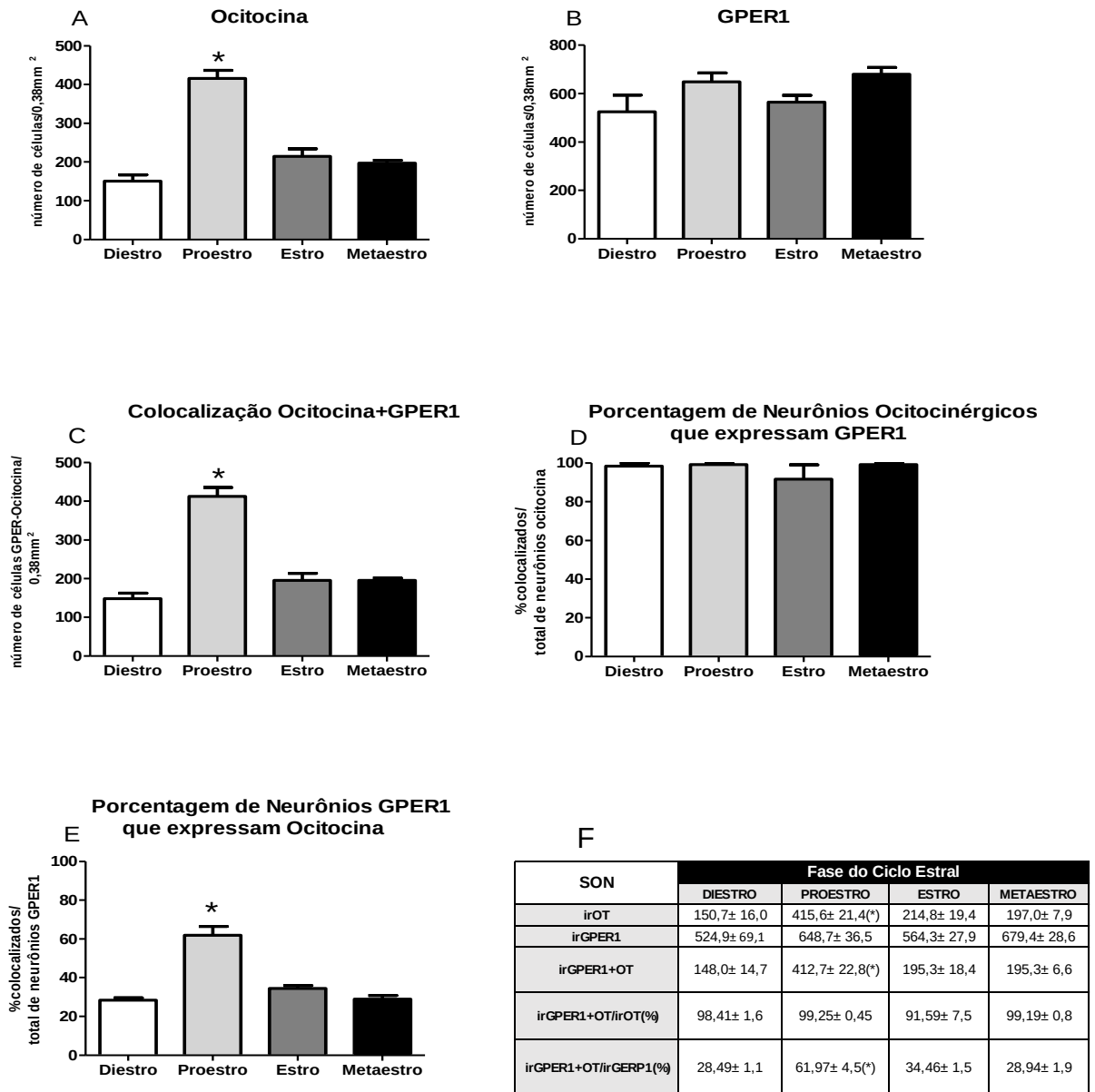


Figura 6: Análise da expressão proteica de ocitocina e GPER1 no SON ao longo do ciclo estral de ratas. Valores são reportados como média±erro padrão do número de células imunoreativas (ir). A) irOcitocina; B) irGPER1; C) irOcitocina+GPER1; D) irOcitocina que expressam GPER1; E) irGPER1 que expressam ocitocina; F) tabela com valores referentes às análises apresentadas graficamente. Letras diferentes e (*) indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$. Estatística utilizada: One-way ANOVA.

A fim de expressar a quantidade de neurônios ocitocinérgicos que possuem o receptor GPER1 fez-se a análise apresentada na figura 4D. Observou-se que não há variação na porcentagem de células irOcitocina que expressam GPER1 e os valores foram em torno de 60%. Dentro da população de todas as células que expressam GPER1 e podem responder a estradiol via tal receptor de membrana, cerca de 25% são produtoras de ocitocina (figura 4D).

Realizamos a imunocolocalização de ocitocina e GPER1 também para o SON ao longo do ciclo estral como mostra a figura 5. A partir da contagem de células positivas para ocitocina (irOcitocina), observou-se uma maior quantidade de células que expressam este peptídeo durante a tarde de proestro (figura 6A).

A expressão proteica de GPER1 (figura 6B) não variou durante o ciclo estral de ratas, similar à expressão gênica (figura 2). Por outro lado, a expressão conjunta de ocitocina e receptor de estradiol apresentou maior contagem de células positivas durante a fase de proestro (figura 6C).

A quantidade de células produtoras de ocitocina que expressam GPER1 foi de aproximadamente 100% na região do SON (figura 6D), independente da fase do ciclo estral analisada, padrão similar ao observado na expressão gênica (figura 2). Dentro da população de células do SON que expressam o receptor GPER1, há um aumento de aproximadamente 2x na tarde de proestro quando comparado às demais do ciclo estral (figura 6E).

A hipófise anterior é considerada um sítio de ação da ocitocina assim como possui modulação estrogênica ao longo do ciclo reprodutivo de fêmeas. Sendo assim, seguimos para a análise da variação da expressão do RNAm para o receptor de ocitocina, OTR, e GPER1 ao longo do ciclo estral de ratas neste tecido alvo. Resultados demonstraram que OTR variou de forma cíclica na hipófise anterior com maior expressão de RNAm durante a tarde de proestro e grande declínio na transição para a fase de estro (figura 7). A expressão do RNAm para o receptor de estrogênio também foi maior durante a tarde de proestro e mostrou menores níveis de expressão nas fases seguintes, estro e metaestro. (figura 8)

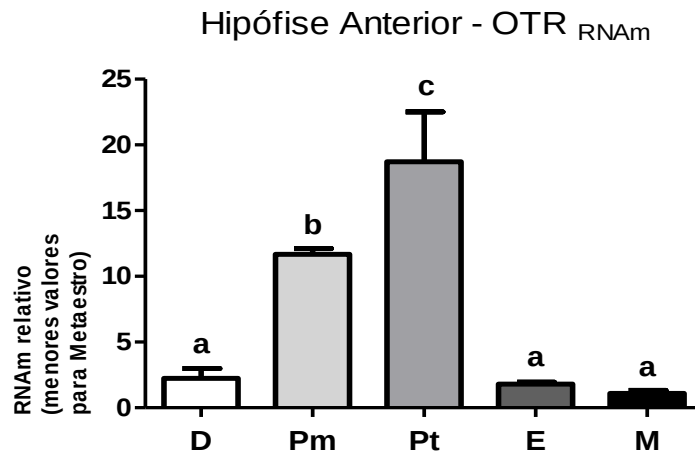


Figura 7: Expressão de OTR_{RNAm} durante o ciclo estral de ratas na hipófise anterior. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene *18S*. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

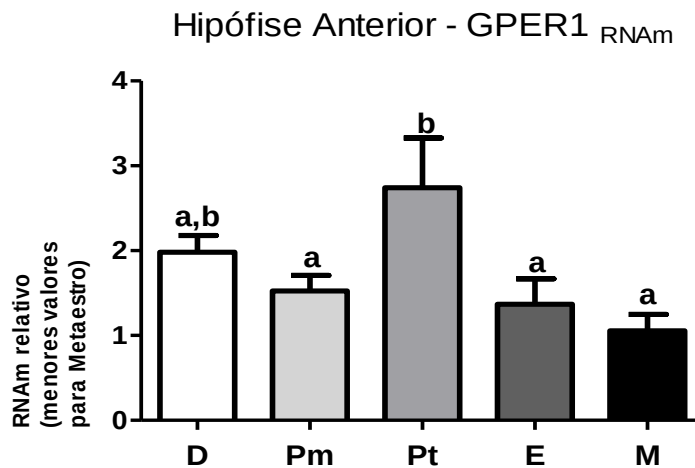


Figura 8: Expressão de GPER1_{RNAm} durante o ciclo estral de ratas na hipófise anterior. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene *18S*. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

As ratas na tarde de proestro demonstraram maior sensibilidade à sinalização ocitocinérgica e estrogênica segundo as análises realizadas. A fim de estabelecer qual seria o sítio de maior expressão do receptor GPER1, fez-se a normalização dos valores de RNAm em relação aos menores valores encontrados no SON durante a tarde de proestro. Os resultados indicam que o tecido encefálico, entre secretores e alvos para ocitocina analisados com maior expressão de RNAm para GPER1, é a hipófise anterior (figura 9). Em relação ao SON ($1,07 \pm 0,22$), o PVN possui uma expressão de GPER1 cerca de 6 vezes maior ($6,47 \pm 1,11$) e a adenohipófise com uma expressão de aproximadamente 17 vezes maior em relação ao SON ($18,55 \pm 4,84$).

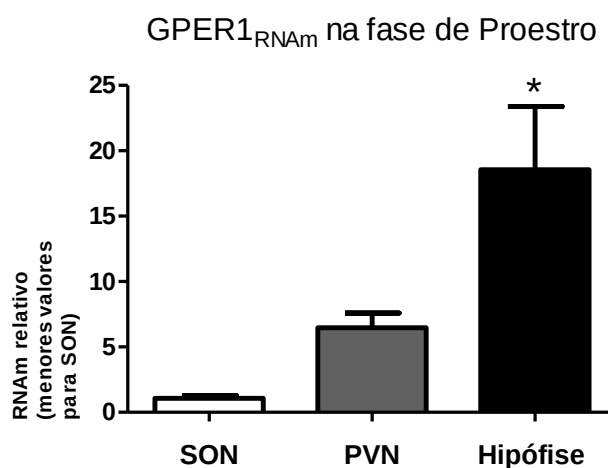


Figura 9: Expressão de GPER1_{RNAm} no SON, PVN e na hipófise anterior. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real e normalizada com gene *18S*. Menores valores de expressão encontrados no SON durante a fase da tarde de proestro. Valores são reportados como média ± erro padrão dos níveis de RNAm. (*) indica diferença estatística, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

O passo seguinte foi a realização de imunohistoquímica para GPER1 no tecido alvo em questão, a hipófise anterior nas quatro fases do ciclo estral. As análises de intensidade de imunomarcagem por densidade óptica e fotomicrografias para contagem de células irGPER1 são apresentadas nas figuras 10 e 11, respectivamente.

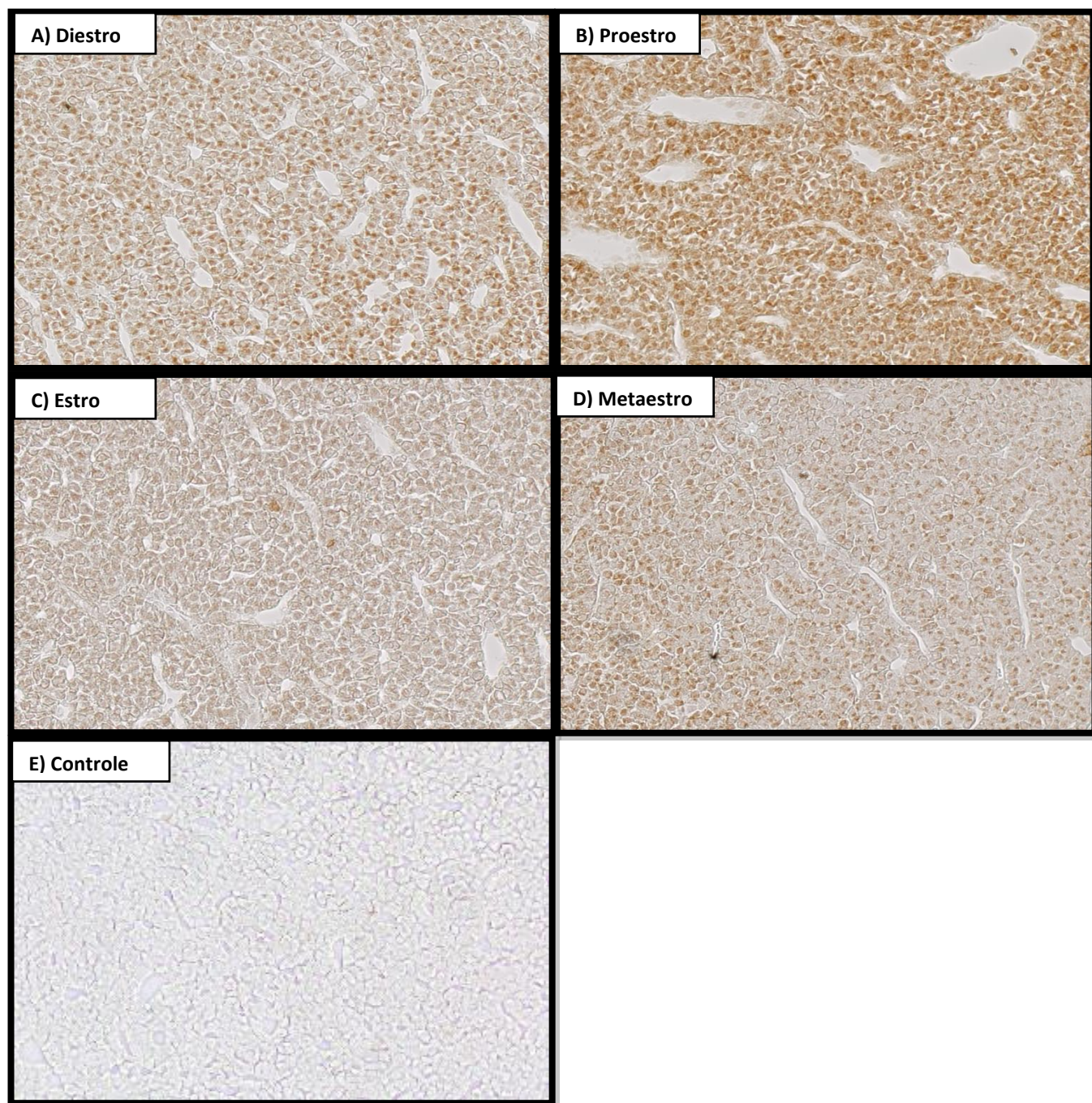


Figura 10: Fotomicrografias de imunohistoquímica para GPER1 na hipófise anterior. As figuras representam células de ratas nas fases de: A) diestro; B) proestro; C) estro; D) metaestro e E) ausência de anticorpo primário, controle. A área analisada das quatro fases corresponde a 0,15mm² em objetiva 20x. A imunohistoquímica foi feita sem presença de contracoloração para análise de expressão proteica por densidade óptica em software *ImageJ*..

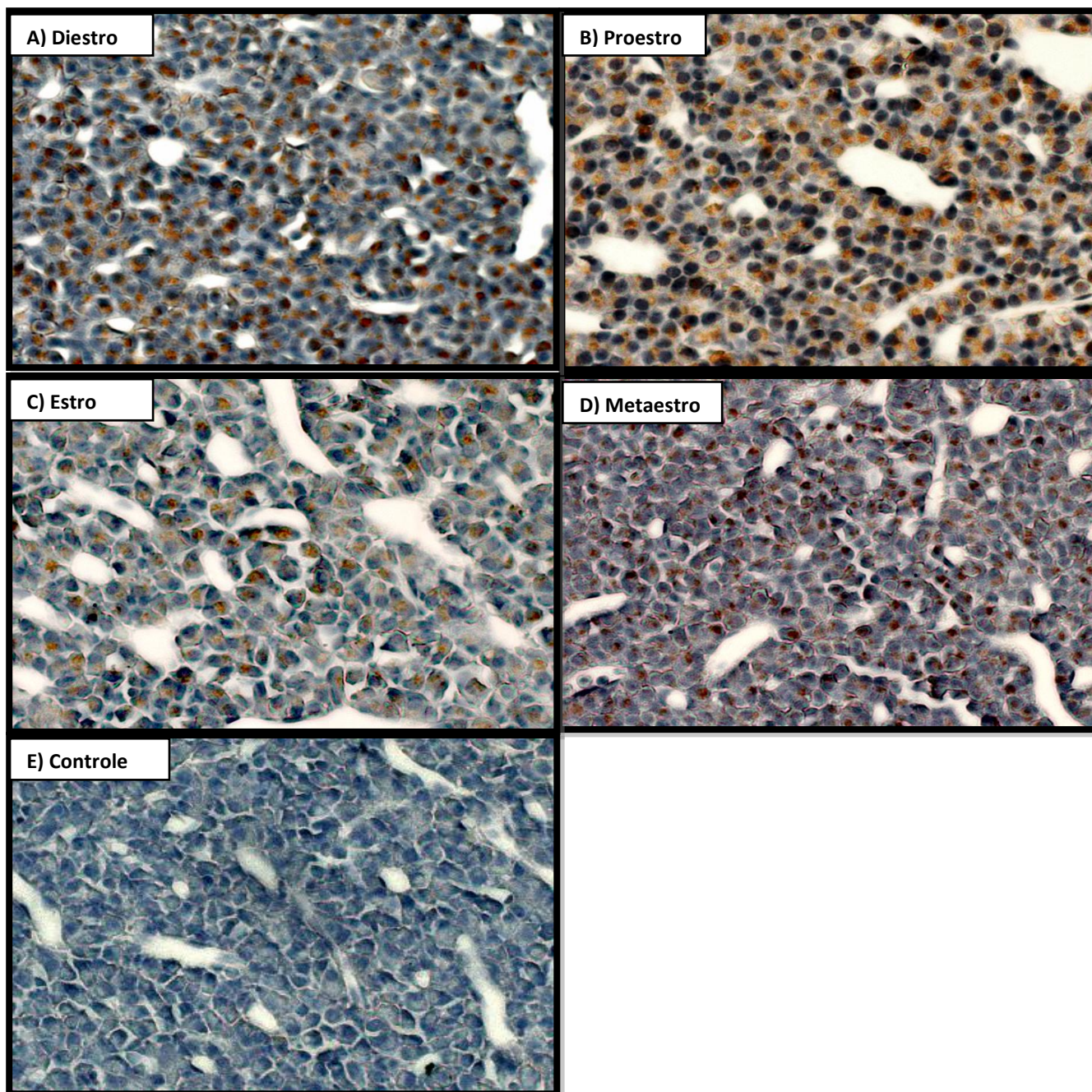


Figura 11: Fotomicrografias de imunohistoquímica para GPER1 na hipófise anterior. As figuras representam células de ratas nas fases de: A) diestro; B) proestro; C) estro; D) metaestro e E) ausência de anticorpo primário, controle. A área analisada das quatro fases corresponde a 0,15mm² em objetiva de aumento de 20x. Foi utilizada contracoloração com hematoxilina de Gômory para identificação da morfologia hipofisária.

A densidade óptica foi calculada com o programa ImageJ software (*National Institute of Health_ NIH USA*) a partir da conversão as imagens em preto e branco de 8-bit e detecção do limiar óptico (*threshold*). Os resultados mostraram que na hipófise anterior, tecido alvo para ocitocina, há maior expressão de GPER1 na tarde de proestro (figura 12).

Hipófise Anterior - Expressão protéica de GPER1

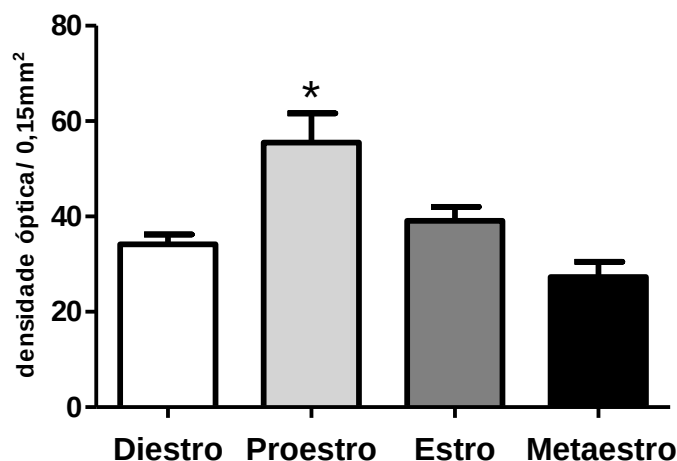


Figura 12: Análise da expressão proteica de GPER1 na hipófise anterior por densidade óptica ao longo do ciclo estral de ratas. Valores são reportados como média±erro padrão da densidade óptica. (*) indica diferença estatística, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

Com o propósito de avaliar a quantidade de células positivamente marcadas para GPER1, foi necessária a execução de imunohistoquímica e contra coloração com hematoxilina de Gômori que possui bom contraste para tecidos glandulares em organização de ácinos como exemplo da glândula hipófise e pâncreas (de Groot & Hartfield, 1960).

Os resultados demonstraram as células positivas para GPER1 possuíram uma tendência de aumento durante a fase de proestro, mas não estatisticamente significante. Na fase de estro, no entanto, observou-se um declínio considerável de células que expressam o receptor de estradiol na hipófise anterior como mostra a figura 13.

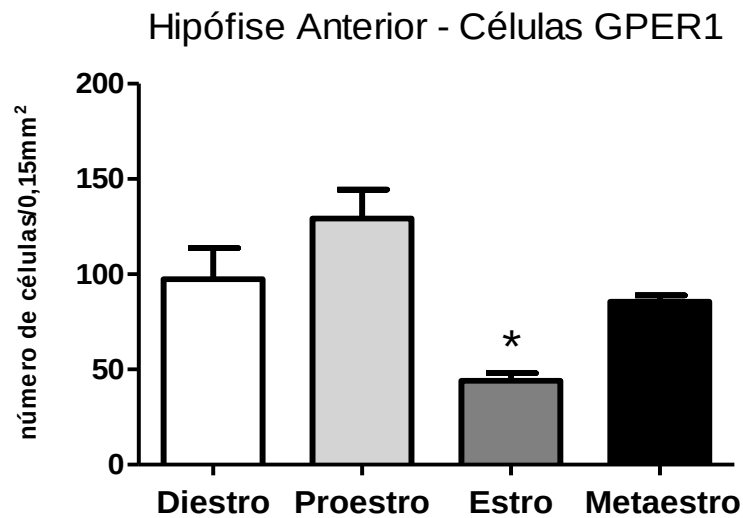


Figura 13: Análise da quantidade de células hipofisárias que expressam o receptor GPER1 durante o ciclo estral de ratas. Valores são reportados como média±erro padrão do número de células. (*) indica diferença estatística, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

Os resultados apresentados até o momento indicam variação da expressão do receptor estrogênico durante a ciclo hormonal feminino em um tecido alvo para ocitocina, a hipófise anterior. Sabe-se também que o útero é um órgão classicamente caracterizado como alvo do hormônio ocitocina. Realizamos, assim, a análise de expressão gênica em tecido uterino de ratas ao longo do ciclo estral. No presente estudo mostramos que, similar ao perfil de variação hipofisário, ocorreu um aumento significativo da transcrição de RNAm para GPER1 durante a tarde de proestro (figura 14).

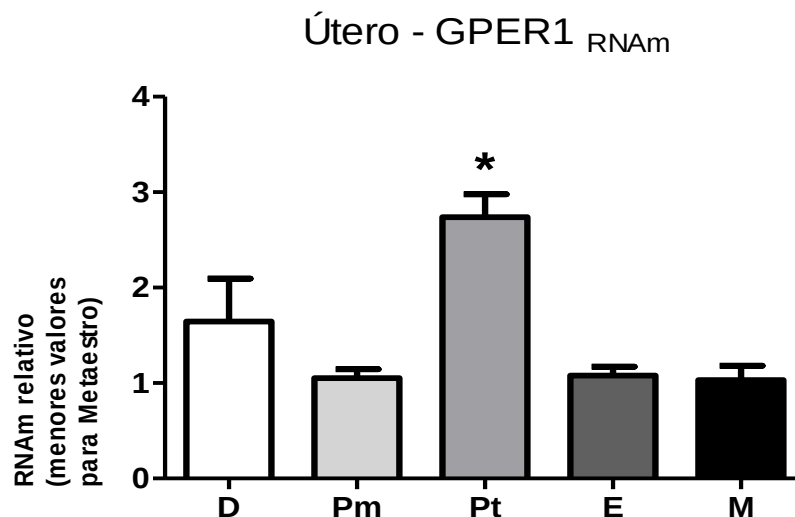


Figura 14: Expressão de GPER1_{RNAm} durante o ciclo estral de ratas no útero. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNA_m. (*) indica diferença estatística, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

6.2. Efeito da administração de esteroides ovarianos na expressão de GPER1 e OTR.

No segundo desenho experimental fez-se a ovariectomia das ratas e tratamento hormonal por 4 dias. Ratas receberam apenas óleo de milho no grupo OVX; cipionato de estradiol (10µg/0,2mL/rata) no grupo E2; cipionato de estradiol na mesma concentração já citada e progesterona (2,5mg/0,2mL/rata) apenas no quarto dia sendo o grupo E2+P4; e no quarto grupo receberam óleo por 4 dias e progesterona (2,5mg/0,2mL/rata) na manhã do quarto dia, sendo o grupo P4.

De maneira oposta ao encontrado durante o ciclo, a administração de estradiol diminuiu significativamente a expressão de RNA_m para *gper1*. A administração concomitante de estradiol e progesterona ou de somente progesterona não alterou a expressão de *gper1* em relação aos grupos E2 e OVX, respectivamente (figura 15).

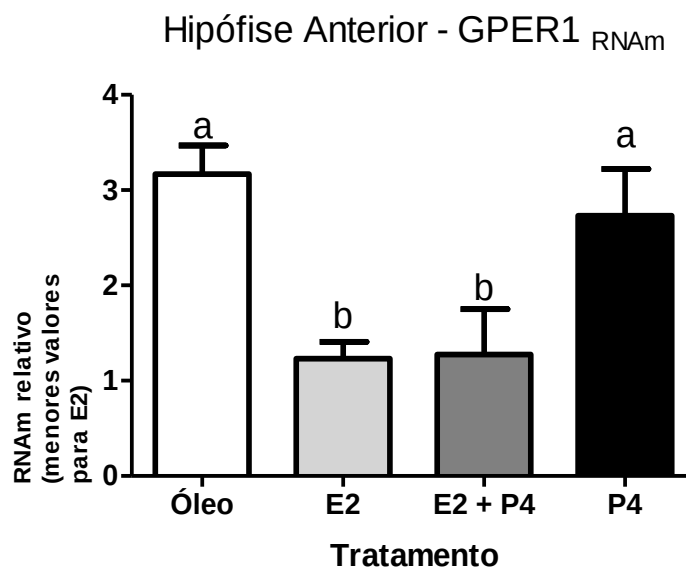


Figura 15: Expressão de GPER1_{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

A comparação entre a expressão de GPER 1 durante o ciclo estral e do segundo grupo experimental mostrou que nos animais do grupo OVX há uma maior expressão de GPER1 em valores similares aos observados na tarde de proestro. Além disso, estes animais apresentaram maior expressão de GPER1 em relação ao grupo E2 (figura 16).

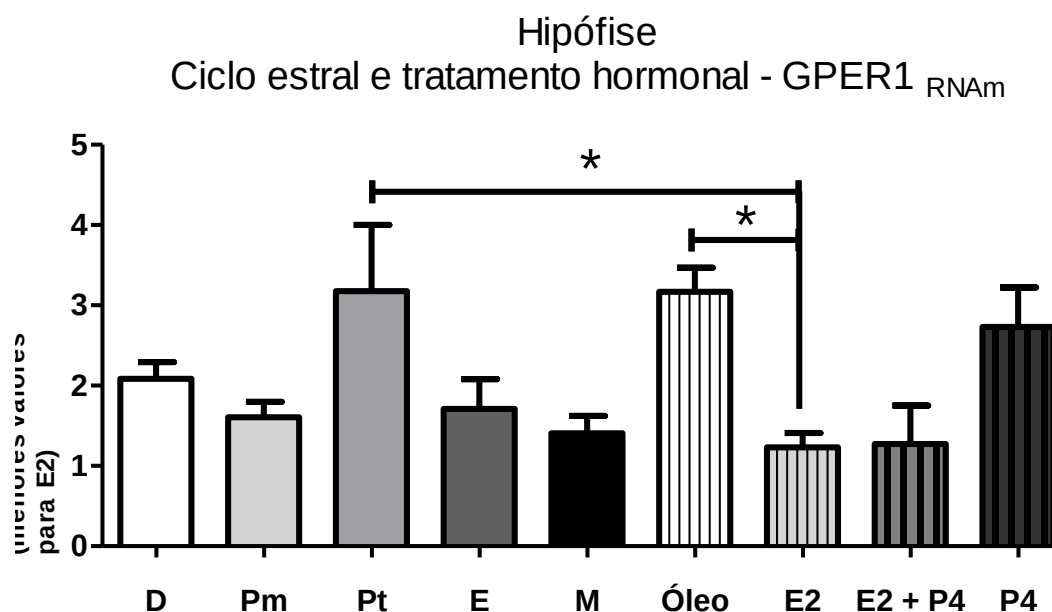


Figura 16: Expressão de GPER1_{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. (*) indica diferença estatística, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

A fim de responder a questão sobre a susceptibilidade do OTR_{RNAm} em resposta à terapia hormonal, esta expressão foi analisada nos grupos de animais OVX, E2 e E2+P4 e P4. Como indicado na figura 16, a expressão de OTR aumentou após administração de estradiol e é potenciada, significativamente, após a administração de progesterona no quarto dia de injeção. No entanto, a administração unicamente de progesterona não aumentou os níveis de OTR em comparação aos animais OVX (Figura 17).

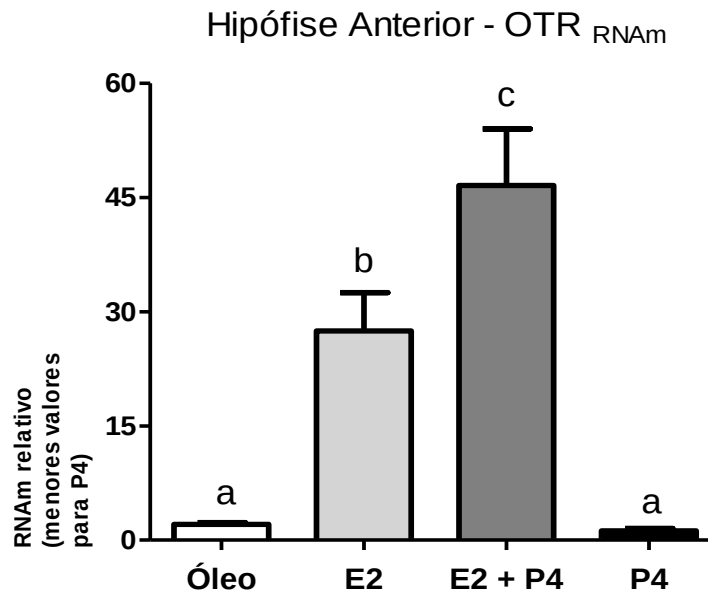


Figura 17: Expressão de OTR_{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

Foi feita a análise conjunta dos dados de expressão de RNAm para OTR do ciclo estral e tratamento com esteroides ovarianos. Observou-se que sua expressão é maior na tarde de proestro comparado com os grupos E2 e E2+P4. Não há diferença estatística entre os valores encontrados durante o período da manhã de proestro e após reposição unicamente de estradiol (figura 18). Ratas na fase de estro e do grupo P4 apresentaram níveis de expressão gênicos similares (figura 18). Os resultados demonstraram um perfil similar aos encontrados para a glândula hipófise.

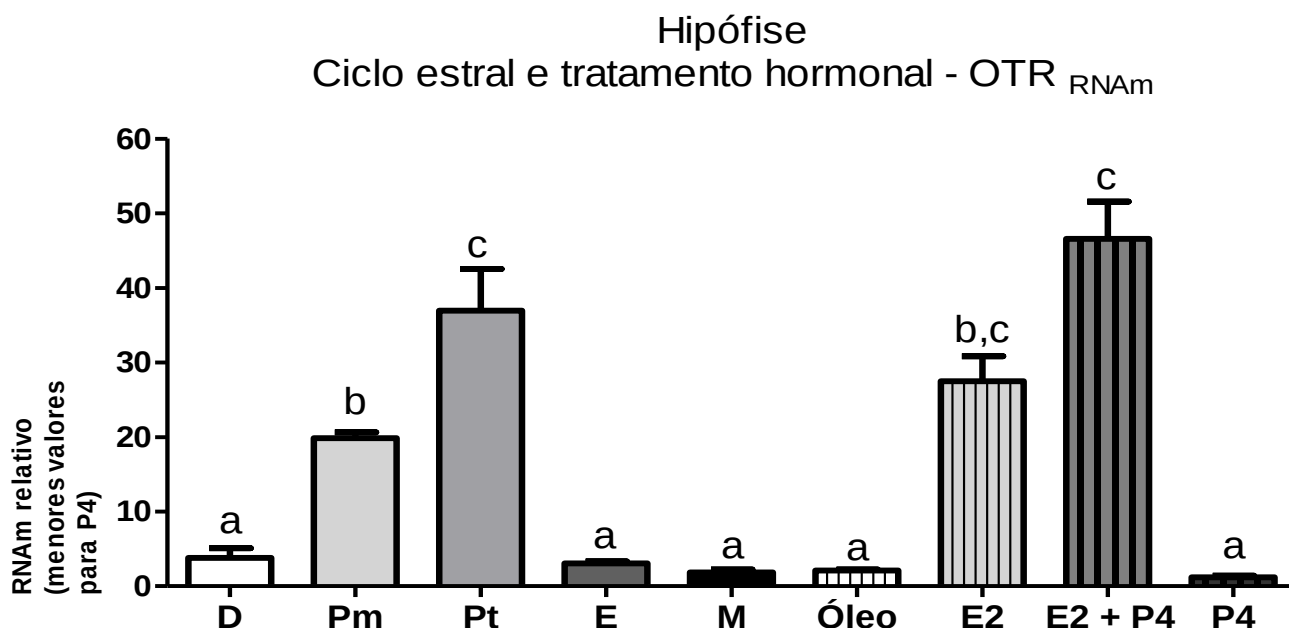


Figura 18: Expressão de OTR_{RNAm} na hipófise anterior após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

A expressão de RNAm para o receptor de estradiol diminui significativamente nos grupos E2 e E2+P4 (figura 19).

A análise comparativa dos valores de RNAm encontrados no tecido uterino durante o ciclo estral e no tratamento com esteroides ovarianos também foi realizada (figura 20).

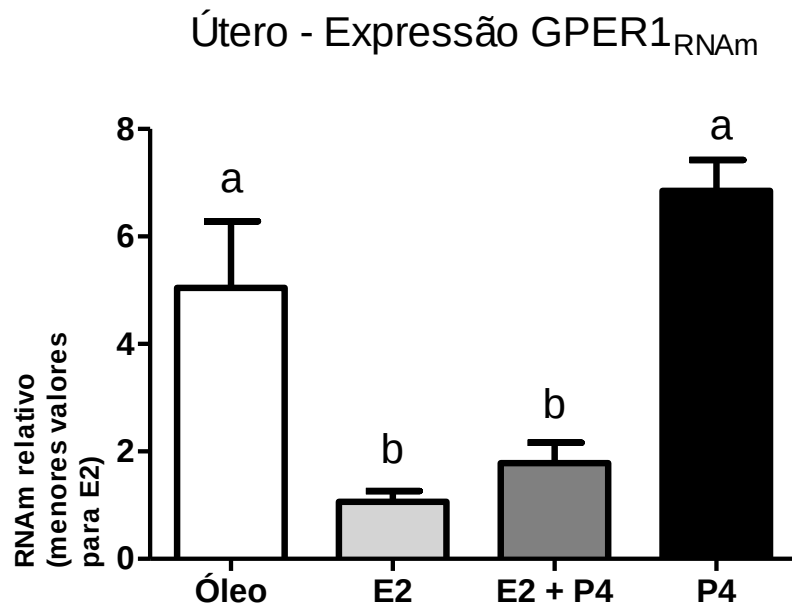


Figura 19: Expressão de GPER1_{RNAm} no útero após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, P<0,05, One-way ANOVA.

Os dados mostraram que os maiores valores foram encontrados na fase de proestro (tarde) e similares àqueles encontrados após tratamento apenas com progesterona. Animais ovariectomizados que receberam óleo apresentaram valores de expressão gênica para *gper1* menores em comparação com a tarde de proestro, todavia não apresentaram diferenças significativas com as demais fases do ciclo. De maneira interessante, ratas tratadas com estradiol por 4 dias apresentaram os menores valores de expressão quando comparados a todos os demais grupos analisados (figura 20).

E em contrapartida, a administração E2 ou de E2+P4 aumentou significativamente a expressão de RNAm para OTR no tecido uterino (figura 21).

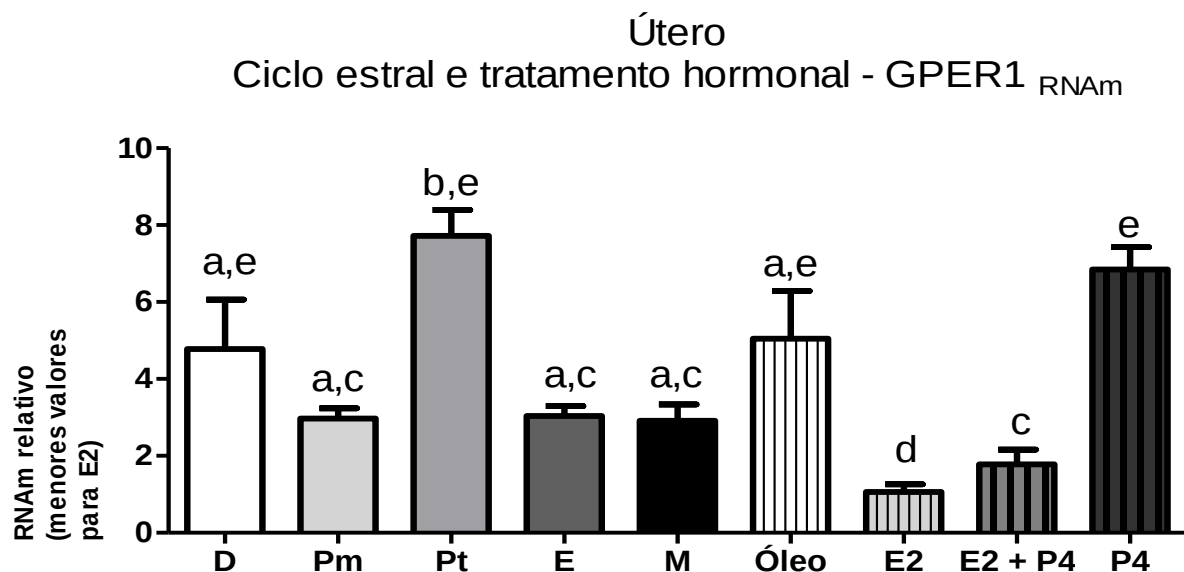


Figura 20: Expressão de OTR_{RNAm} no útero após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene *18S*. As fases analisadas são indicadas como: diestro (D), proestro manhã (Pm), proestro tarde (Pt), estro (E) e metaestro (M). Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNAm. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$, One-way ANOVA.

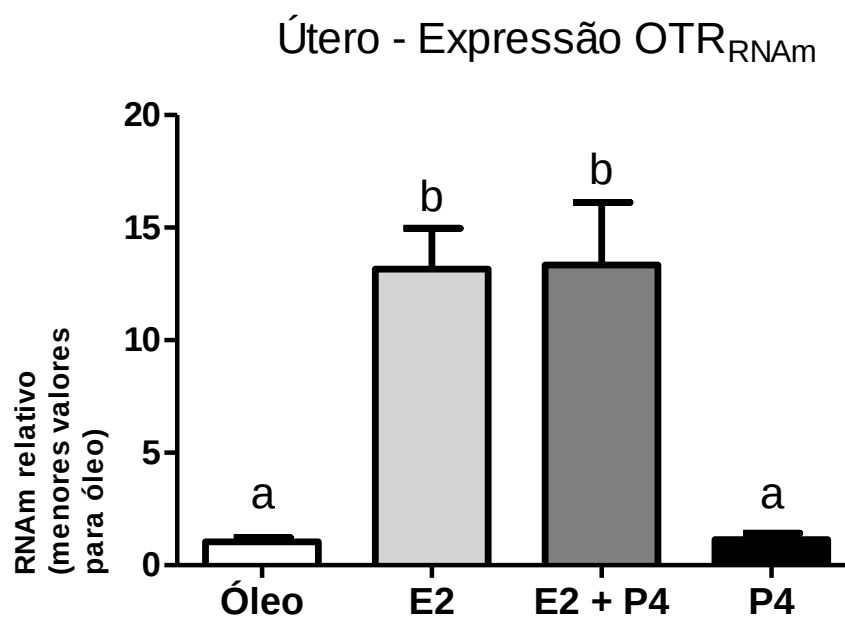


Figura 21: Expressão de OTR_{RNAm} no útero após tratamento hormonal com esteroides ovarianos em ratas ovariectomizadas. O perfil de variação gênica foi feito por PCR de tempo real. A expressão gênica relativa foi normalizada com gene 18S. Os tratamentos são indicados como: óleo; E2 (cipionato de estradiol 10 µg/rata durante quatro dias); E2+P4 (cipionato de estradiol 10 µg/0,2mL/rata durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia) e P4 (tratamento com óleo durante quatro dias e injeção única de progesterona 2,5 mg/rata no quarto dia). Valores são reportados como média±erro padrão dos níveis de RNA_m. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, P<0,05, One-way ANOVA.

7. Discussão

A versatilidade dos estrogênios por diferentes mecanismos de ação depende da distribuição dos seus receptores e da natureza tecidual em questão. É de longa data, a conhecida ação genômica estrogênica através dos receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$ via mecanismos clássicos que levam a alteração da maquinaria transcricional celular. De maneira mais recente o receptor GPER1 (anteriormente denominado GPR30) tem demonstrado novos mecanismos de ação do estradiol seja por vias metabólicas de resposta rápida ($\uparrow$ AMPc, mobilização de cálcio, fosforilação de MAPK, etc) ou mediando efeitos genômicos indiretos. Dentro desse cenário foi possível a realização do presente estudo no qual objetivou a análise da expressão do receptor GPER1 em tecidos secretores e alvos para ocitocina.

Nossos resultados demonstraram que, durante o ciclo estral, as ratas apresentaram um perfil de variação nas concentrações de estradiol e progesterona plasmáticas como descrito pela literatura endocrinológica (Smith et al 1975).

O ciclo estral dos roedores é dividido em quatro fases bem definidas segundo a morfologia das células coletadas durante a prática do esfregaço vaginal. A variação hormonal de cada fase foi descrita no trabalho clássico de Smith e colaboradores, em 1975, no qual foi detectado que durante a fase do proestro ocorre elevada concentração de estrogênios culminando em seu ápice durante o período da tarde. Elevadas concentrações de estrogênios no plasma são responsáveis por ativar o eixo hipotálamo-hipófise a fim de elucidar o pico pré-ovulatório de LH e de prolactina. As concentrações de progesterona plasmática são maiores na tarde de proestro e após o pico de LH, uma vez que é formado o corpo lúteo ovariano. Em adição aos efeitos advindos da ativação e secreção de gonadotrofinas e prolactina pela glândula hipófise, sabe-se que maiores concentrações de estrogênios plasmáticos estão correlacionadas à maior secreção de ocitocina ao nível central (Kumaresan et al., 1974). De modo interessante, foi demonstrado que a secreção de ocitocina, atuante na parte anterior da hipófise, é responsável pela secreção de prolactina pelos lactotrofos (McKee et al., 2007). Sendo assim, optamos por analisar, não apenas a fase de proestro, mas o período do dia no qual observa-se um pico de prolactina em ratas (Freeman et al, 1972).

A secreção de ocitocina é governada por vários estímulos fisiológicos, e a modulação dos tecidos secretores é essencial para a manutenção do sistema ocitocinérgico e dos efeitos mediados por esse peptídeo nos tecidos alvos. Neurônios do PVN são ativados durante atividade sexual em fêmeas (Flanagan et al., 1993) e as concentrações plasmáticas de ocitocina aumentam consideravelmente durante orgasmo masculino e feminino (Carmichael et al., 1987). Como já citado no presente trabalho, concentrações plasmáticas de estrogênios estão correlacionadas com a secreção de ocitocina pelos principais núcleos produtores de ocitocina. Sendo assim, maior responsividade tecidual via GPER1 ao estradiol aumentado poderia atuar como fator sensibilizador para maior secreção de ocitocina. A resposta esperada seria de maior mobilização de vesículas de ocitocina e mecanismos intrínsecos para sua secreção de maneira rápida, uma vez que ativação de GPER1 eleva concentração de cálcio intracelular e fosforilação de proteínas envolvidas na extrusão de grânulos de secreção (Wang & Morris 1995).

Nossos resultados mostraram que, durante a fase do proestro, onde maiores concentrações de estradiol e progesterona plasmáticas foram observadas, também detectou-se uma maior expressão de *gper1* no PVN, revelada por altos níveis de RNAm. A contagem do número de células imunopositivas ao GPER1 no PVN também mostrou-se elevada nesta fase do ciclo estral. O estradiol poderia assim ser um possível regulador da expressão do RNAm do próprio receptor a nível hipotalâmico modificando seu perfil proteico para modular a resposta do tecido via GPER1. No entanto, este não deve ser o único regulador dessa expressão, uma vez que a expressão tanto gênica quanto protéica encontram-se em níveis já elevados desde a fase do diestro no PVN.

Recentemente publicado, o trabalho de Spary e colaboradores demonstrou que a expressão de RNAm para GPER1 no PVN é significativamente maior em animais na fase de metaestro (menor concentrações plasmática de estrogênios) em comparação à animais ovariectomizados após 3 semanas. Animais com maior quantidade plasmática de estrogênios (manhã do proestro) possuem expressão intermediária de GPER1 em comparação aos dois outros grupos (Spary et al., 2013).

Em contrapartida aos resultados apresentados por Spary e colaboradores, nossos dados propõem que a expressão de GPER1 é maior na fase de proestro e menor

durante as fases da manhã de proestro, estro e metaestro. A técnica de coleta de tecidos no outro trabalho é similar a técnica usada por nosso grupo exceto pelo uso de agulhas de microdissecção utilizadas nos nossos experimentos. No presente estudo, nós analisamos cinco momentos distintos do ciclo estral, possibilitando uma janela temporal de análise da variação de expressão do RNAm de GPER1 diferente da trabalho de Spary (2013). Nesse trabalho, os animais nas fases de diestro e proestro agrupados e considerados em conjunto como um grupo único que apresenta altas concentrações estrogênicas. Segundo nossos resultados (figura 3), é nítida a variação entre a fase de diestro e proestro, e mais ainda quando esta última é analisada nos períodos da manhã e tarde. O sacrifício do trabalho publicado ocorreu entre 11h e 13h, ao passo que, em nosso estudo, a tarde de proestro foi analisada entre 17h e 18h, horário mais provável para os picos de gonadotrofinas e de prolactina em resposta ao mecanismo de retroalimentação positiva exercida pelo estradiol sobre a hipófise e sistema nervoso central. Tais variações de metodologia entre os dois estudos poderiam, assim, justificar as diferenças encontradas quanto à expressão do receptor de estradiol ao longo do ciclo estral.

O perfil de expressão proteica de GPER1 no PVN confirma o aumento durante as fases de diestro e proestro (tarde) da expressão gênica. Os dados de PCR em tempo real revelaram, entretanto, uma diminuição significativa da expressão de *gper1* durante a manhã de proestro. Tal variação poderia refletir a ação de um mecanismo pós-transcricional e anterior à tradução proteica capaz de regular os níveis de RNAm para GPER1 a fim de evitar um maior aumento dos níveis proteicos na tarde do proestro. Maior avaliação da regulação de GPER1 no PVN será necessária em trabalhos futuros.

A contagem de células ocitocinérgicas do PVN mostrou um aumento significativo na fase do proestro. O número de neurônios que colocalizam GPER1 e ocitocina também está elevado nesta fase. No entanto, uma alta colocalização de GPER1 e ocitocina também foi observada na fase de metaestro. Interessantemente, o número de células que expressam GPER1 já encontra-se elevado na fase de diestro, precedendo o aumento do número de células que expressam ocitocina, estes neurônios, no entanto, são possivelmente de outro fenótipo, uma vez que o número de *irGPER1*+ocitocina não aumenta nesta fase. Esta relação temporal de aumentos em diferentes fases do ciclo, indica que, uma ação estrogênica pode ser necessária tanto

para um aumento de ocitocina plasmático (dados da literatura) quanto central (dados deste estudo, Van et al, 1998) observado durante o proestro, via ativação de neurônios do PVN. De fato, dos neurônios produtores de ocitocina estudados, observamos esta relação temporal somente no PVN. Tanto os níveis de RNAm quanto o número de células que expressam GPER1 do SON não variam durante o ciclo estral.

O impacto desse aumento de ocitocina pode abranger, o efeito desse peptídeo sobre a regulação da liberação de prolactina hipofisária. De fato, propõe-se que os neurônios do PVN sejam a fonte de ocitocina que estimula a adenohipófise à liberar prolactina (Arey et al 1992). Ou, por outro lado, abranger a participação da ocitocina na regulação do comportamento reprodutor. Sabe-se que neurônios ocitocinérgicos do PVN são a principal fonte central de ocitocina liberada, por exemplo, no hipotálamo ventromedial (VMH), sendo capaz de atuar como facilitador do comportamento sexual (Bale et al., 1995). A sensibilização por estrogênios via GPER1 no PVN poderia ser crucial para maior produção/liberação de ocitocina pelos terminais axonais em regiões que são capazes de auxiliar para manutenção do comportamento reprodutivo durante cópula. No entanto, é preciso que ocorra diminuição sexual após período fértil da fêmea o que seria explicado pela queda significativa de neurônios GPER1 que expressam ocitocina.

Para SON não foi encontrada variação da expressão gênica ou proteica para o receptor de estradiol em questão durante as fases do ciclo estral nos nossos resultados. No entanto, demonstramos claramente que praticamente todos os neurônios ocitocinérgicos do SON expressam GPER1 e que ocorre um pico de expressão protéica de ocitocina neste núcleo. Assim, sugerimos que este aumento de ocitocina seja via estrogênica, sinalizada via GPER1. Os achados aqui apresentados mostram que no SON, núcleo o qual possui dois tipos neuronais bem caracterizados (ocitocinérgicos e vasopressinérgicos), possui maior porcentagem de células positivas para ocitocina que expressam GPER1 na tarde de proestro. Trabalhos mais antigos já haviam demonstrado que há um efeito dissociado entre a regulação da expressão de ocitocina e vasopressina por esteroides ovarianos no ciclo estral, no qual, a ocitocina parece ser mais sensível a tal variação (Van Tol et al., 1988).

A secreção de ocitocina via lobo neural da hipófise ocorre principalmente por neurônios magnocelulares do SON pelas terminações axonais. Esses neurônios são

capazes de secretar ocitocina por meio de dendritos e assim levar à maior plasticidade local em resposta aos estados específicos onde a liberação de ocitocina precisa ser potenciada como, por exemplo, no período pré-copulatório (Theodosios et al., 1986). Observamos que o número de neurônios que expressam ocitocina do SON aumenta durante o proestro, fase precedente ao momento mais provável para cópula. Desse modo o que definiria o aumento da secreção de ocitocina pré-cópula não é a variação da quantidade de GPER1 presente no SON, mas sim da quantidade de células produtoras de ocitocina da fase do ciclo estral. Os resultados também mostram que neurônios de outra natureza neuroquímica (ex.: neurônios vasopressinérgicos e glia) também expressam GPER1 e este poderia modular a resposta de tais células segundo demanda de outros estados fisiológicos.

A glândula hipófise tem participação fundamental para manter os níveis de ocitocina periférico. Sendo assim, a regulação da expressão de um receptor de estradiol para respostas rápidas de secreção ocitocinérgica seria de fundamental importância. Nossos resultados mostraram que, de maneira sinérgica, a expressão de GPER1 no PVN e na hipófise apresenta seu pico durante a tarde de proestro. Tais observações podem estar relacionadas com a maior propensão hipofisária de resposta à ocitocina via mecanismos estrogênicos, ativando receptor GPER1.

Com o objetivo de identificar o tecido com maior expressão de GPER1 durante a tarde de proestro, foi feita a análise comparativa da expressão relativa de RNAm em relação a todos os tecidos estudados (hipófise, PVN e SON) nesta fase. Como resultado, observamos que, de fato, a hipófise anterior é o tecido com maior expressão de GPER1. Com o objetivo de correlacionar os dados de maior expressão do receptor de estradiol em um tecido alvo de ocitocina, fez-se a expressão do receptor OTR nas mesmas amostras. Como observado, a expressão de OTR mostrou um pico durante a fase de proestro à tarde. Sendo assim, a glândula hipófise seria mais responsiva ao estrogênio, uma vez que concentração plasmática deste hormônio se encontra elevada, correlacionando com maior expressão de GPER1, bem como maior expressão de OTR, sugerindo que a sinalização à ocitocina possa estar aumentada.

Sabe-se que as células hipofisárias que respondem de maneira robusta aos efeitos da administração de estrogênios são os lactotrofos. Estrogênios são capazes de regular a síntese, armazenamento e secreção de prolactina (Freeman et al 2001).

Como já citado aqui, lactotrofos são células hipofisárias que respondem a secreção hipotalâmica de ocitocina, a fim de coordenar a liberação de prolactina. Como prática dos efeitos dos hormônios ovarianos, administração de estrogênios após ovariectomia eleva o peso relativo da glândula e, este efeito deve-se em parte ao aumento da produção de prolactina pelos lactotrofos (Tsukahara et al 1994). Dados da literatura mostram que, este efeito pode ser mediado pelo receptor ER- α (Sanchez-Criado et al 2004). Considerando os resultados obtidos em nosso trabalho, sugerimos que, somados a participação deste receptor de estradiol clássico, parte dos efeitos do estradiol nessas células hipofisárias, poderiam ser via GPER1. De fato, reforçando nossa hipótese, Sosa et al (2013) mostrou que este efeito proliferativo do estradiol sobre os lactotrofos pode ser obtido com a administração de estradiol conjugado com BSA (o que impede a entrada de esteroides para a célula), via ERK1/2 (Sosa et al 2013). A fosforilação de ERK1/2 é também ativada via GPER1 (Filardo et al 2000).

A expressão de GPER1 na hipófise também foi confirmada por imunohistoquímica na qual a contagem de células positivas para GPER1 não difere durante as fases de diestro, proestro ou metaestro, porém com uma tendência a ser maior na fase de proestro. Apesar disso, a expressão proteica de GPER1 é significativamente maior na tarde de proestro segundo nossos dados a partir da densidade óptica analisada após tratamento com anticorpo anti-GPER1. Como podemos observar nas imagens obtidas (figuras 7 e 9), muitos tipos celulares apresentam a expressão de GPER1 e, desse modo, a ação do estradiol possui maior espectro do que apenas as proposições da ação sobre lactotrofos para secreção de prolactina. É conhecida a ação dos estrogênios sobre grande parte dos tipos celulares encontrados na adeno-hipófise: lactotrofos, gonadotrofos, corticotrofos, somatotrofos (Wolinska-Witort et al., 2012) e tireotrofos (Sosić-Jurjević et al., 2006). A expressão dos receptores clássicos de estradiol, ER α e ER β , parece ser ubíqua nos lobos intermediário e anterior da glândula hipófise. A distribuição da expressão desses receptores na hipófise demonstra ser diferencial com maior quantidade de ER α nas células (Mitchner et al., 1998). O presente estudo mostra que grande parte das células da adeno-hipófise expressam GPER1 (mais de 95% das células de todas as lâminas analisadas), assim, em conjunto, propomos que os efeitos estrogênicos na hipófise podem ser mediados por todos os tipos de receptores identificados até o momento, refletindo o amplo espectro de funções que a hipófise participa.

O segundo desenho experimental foi proposto com o objetivo de mimetizar as variações estrogênicas e de progesterona que acontecem durante o ciclo estral. Para tal, foi utilizado um protocolo de reposição estrogênica para indução dos picos de LH, já bem caracterizado em estudos de neuroendocrinologia da reprodução. Sabe-se que a reposição com estradiol por 3 a 4 dias é capaz de induzir picos de LH e prolactina e a administração de progesterona no quarto dia eleva a secreção dos mesmos hormônios. Após a verificação de que muitos tipos celulares expressam GPER1, provavelmente inclusive gonadotrofos e lactotrofos, e que durante a tarde de proestro ocorre o pico de LH e prolactina, este protocolo foi indicado para testar nossa hipótese (Szawka et al 2009). Os resultados demonstraram que a administração de estradiol ou estradiol combinado com progesterona diminuíram consideravelmente a expressão de RNAm para GPER1 na adeno-hipófise. De maneira interessante, os resultados também mostraram que há um efeito da ovariectomia. Quando comparado com OVX+E2, animais OVX apresentaram valores de expressão de GPER1 similares àqueles encontrados para a tarde de proestro (figura 16).

O efeito da ovariectomia no aumento da expressão de GPER1 poderia ser compensatório à menor concentração plasmática de estradiol. Após ovariectomia os níveis estrogênicos plasmáticos caem consideravelmente, mas não desaparecem. Outros tecidos também são produtores de estrogênios como tecido adiposo, adrenais e o próprio cérebro. Com uma maior expressão de GPER1, poderia ocorrer uma maior probabilidade de ativação do receptor em uma situação, onde ocorre baixa concentração de seu principal ligante. A via pelo qual estradiol é capaz de diminuir a expressão de GPER1 não foi esclarecida no presente estudo. A administração de estradiol por 4 dias possivelmente atua sobre receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$, que são expressos na hipófise, e são capazes de, assim, diminuir a transcrição do gene codificador para GPER1. Mais estudos são necessários para o entendimento deste efeito. Por outro lado, a expressão de OTR na hipófise diminui consideravelmente após ovariectomia e é restabelecida com administração de estradiol e potenciada com administração de progesterona no quarto dia.

Os efeitos dos estrogênios na produção de ocitocina e aumento da expressão de seu receptor são conhecidos de longa data (Fuchs et al., 1983; Quiñones-Jenab et al., 1997). A administração de estradiol possui efeito diferencial sobre a expressão dos dois receptores em questão, GPER1 e OTR. Sendo assim, conclui-se que o receptor

de estradiol sofre *down-regulation* pelo seu próprio ligante, o que é uma ação independente da encontrada sobre o efeito de *up-regulation* para o receptor de ocitocina. Uma possibilidade seria a de que, após 7 dias da ovariectomia, os mecanismos de regulação da expressão de GPER1 apresentem-se diferentes daqueles observados durante o ciclo estral. Além disso, aventamos que a regulação de OTR depende apenas da presença de estradiol, em quantidades suficientes para aumentar sua expressão, não alterando seu mecanismo de controle na situação onde ocorre a diminuição de estradiol que é observada após a ovariectomia.

Um trabalho recentemente publicado demonstrou o efeito da administração de estradiol e G-1 (agonista seletivo para GPER1) em hipófise de bovinos. Os resultados dos estudos *in vitro* mostram que administração de estradiol ou G-1 a 10nM induz a secreção de LH, em níveis comparáveis aos encontrados em cultura de células adenohipofisárias estimuladas por GnRH. Em adição, administração de estradiol ou G-1 a 0,001 nM são capazes de inibir a secreção de gonadotrofinas. Baseado nestes resultados, propõe-se que a ativação de GPER1 parece necessária para os efeitos do estradiol sobre a hipófise sobre a secreção de gonadotrofinas (Rudolf FO & Kadokawa H, 2013). Nosso trabalho não analisou a secreção de LH, entretanto é possível observar que a maior expressão do receptor GPER1 ocorre na tarde de proestro, momento no qual, observa-se os efeitos de retroalimentação positiva do estradiol sobre o pico de LH, sugerindo a participação do GPER1 sobre este efeito.

A partir das observações dos resultados da expressão de GPER1 no útero, tecido alvo clássico da ocitocina, podemos observar características similares às aquelas encontradas na hipófise anterior. A presença de GPER1, no útero, tem sido confirmada na endométrio e miométrio de ratas e humanos e, bem caracterizada, na endometriose e câncer uterino. Sabe-se que ativação de GPER1 com administração de G-1 aumenta a contração do miométrio a partir do aumento da concentração intracelular de cálcio e, em mulheres, possui maior expressão gênica na fase proliferativa tardia e menores valores durante a fase secretória do ciclo menstrual (He et al., 2009; Tica et al., 2011; Plante et al., 2012).

Nosso trabalho caracterizou o perfil de expressão gênica de *gper1* durante o ciclo estral de ratas comprovando que, similarmente a humanos, ocorre maior expressão do receptor no período pré-ovulatório e uma queda significativa após a

formação de corpo lúteo. Em adição, a ovariectomia, por si só, já é capaz de elevar a transcrição gênica do receptor e administração estrogênica por 4 dias reduz significativamente sua expressão, bem como ocorre na glândula hipófise. Não foi realizada análise da expressão de OTR para útero durante o ciclo estral, mas outros trabalhos comprovaram que, ocorre aumento do receptor de ocitocina durante proestro bem como após administração de estradiol (Larcher et al., 1995).

O presente estudo conclui que a expressão de GPER1 apresenta variações nos núcleos produtores de ocitocina, bem como em tecidos alvos para este peptídeo de acordo com as diferentes fases do ciclo estral. Além disso, na hipófise a expressão desse receptor de estradiol é modulada pelos esteróides ovarianos. Estas variações de expressão de GPER1 acompanham alterações de expressão de ocitocina e seu receptor nos tecidos alvos para este hormônio.

8. Referências Bibliográficas

Akaishi T, Sakuma Y. Estrogen excites oxytocinergic, but not vasopressinergic cells in the paraventricular nucleus of female rat hypothalamus. *Brain Res.* 1985 Jun 3;335(2):302-5.

Al-Sweidi S, Morissette M, Di Paolo T. Effect of oestrogen receptors on brain NMDA receptors of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *J Neuroendocrinol.* 2012 Nov;24(11):1375-85

Argiolas A. Oxytocin stimulation of penile erection. Pharmacology, site, and mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Jun 12;652:194-203.

Arey BJ, Freeman ME. Activity of oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus mirrors the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology.* 1992 Jan;130(1):126-32.

Baudry M, Bi X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscience.* 2012 Nov 7. pii: S0306-4522(12)01075-5.

Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology.* 2005 Apr;146(4):1650-73.

Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, Brailoiu E & Dun NJ 2005 KiSS-1 expression and metastatin-like immunoreactivity in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 481 314–329.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 2007 May; 193(2):311-21.

Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of anterior pituitary hormones. *Science* 1980; 207: 373–378.

Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and

biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006;2:207–212.

Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med.* 2007 May;25(3):139-53.

Caldwell JD. Central oxytocin and female sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Jun 12;652:166-79.

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997 Nov 1; 45(3):607-17.

Carmichael MS, Humbert R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Jan;64(1):27-31.

Cocchetto D.M., Bjornsson T.D., Methods for vascular access and collection of body fluids from the laboratory rat, *J. Pharm. Sci.* 72.1983. 465–492.

Crowley WR, O'Donohue TL, George JM, Jacobowitz DM. Changes in pituitary oxytocin and vasopressin during the estrous cycle and after ovarian hormones: evidence for mediation by norepinephrine. *Life Sci.* 1978 Dec 25;23(26):2579-85.

Crowley RS, Insel TR, O'Keefe JA & Amico JA 1993 Cytoplasmatic oxytocin and vasopressin gene transcripts decline postpartum in the hypothalamus of the lactating rat. *Endocrinology* 133 2704–2710.

Damiano CR¹, Aloï J, Dunlap K, Burrus CJ, Mosner MG, Kozink RV, McLaurin RE, Mullette-Gillman OA, Carter RM, Huettel SA, McClernon FJ, Ashley-Koch A, Dichter GS. Association between the oxytocin receptor (OXTR) gene and mesolimbic responses to rewards. *Mol Autism.* 2014 Jan 31;5(1):7. doi: 10.1186/2040-2392-5-7.

de Groot J, Hartfield JE. Quantitative changes in rat pituitary neurosecretory material in altered adrenocortical function. *Acta Neuroveg (Wien).* 1961;22:177-83.

de Wied D¹, Diamant M, Fodor M. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol.* 1993 Oct;14(4):251-302.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak T, Bologna C, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TO, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol*. 2009 in press.

Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):358-66.

Dominguez R, Micevych P. Estradiol rapidly regulates membrane estrogen receptor alpha levels in hypothalamic neurons. *J Neurosci*. 2010 Sep 22;30(38):12589-96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1038-10.2010.

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of aminoacids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205: 949–957, 1953.

Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:335–376.

Everett JW. Central neural control of reproductive function of the adenohypophysis. 1964. *Physiol. Rev.* 44, 373.

Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. *J Endocrinol*. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. 2012 Jan;212(1):3-12.

Flanagan LM, Pfaus JG, Pfaff DW, McEwen BS. Induction of FOS immunoreactivity in oxytocin neurons after sexual activity in female rats. *Neuroendocrinology*. 1993 Sep;58(3):352-8.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000 Oct; 14(10):1649-60.

Filardo EJ, Thomas P (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* 16: 362-367.

Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 2007 Jul; 148(7):3236-45.

Filardo E, Neubig R, Prossnitz E. Estrogen (G protein-coupled) receptor, introduction. Last modified on 30/09/2009. Acessado em: 20/07/2014. IUPHAR database (IUPHAR-DB), endereço eletrônico: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=22>.

Freeman ME, Reichert LE, Jr., Neill JD Regulation of the proestrus surge of prolactin secretion by gonadotropin and estrogens in the rat. *Endocrinology* (1972) 90: 232-238.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* (2000) 80: 1523-1631.

Fu XD, Simoncini T. Non-genomic sex steroid actions in the vascular system. *Semin Reprod Med*. 2007 May;25(3):178-86.

Fuchs AR, Periyasamy S, Alexandrova M, Soloff MS. Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. *Endocrinology*. 1983 Aug;113(2):742-9.

Funakoshi T, Yanai a, Shinoda k, kawano MM, Mizukami Y (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 904-910.

Gingerich S, Kim GL, Chalmers JA, Koletar MM, Wang X, Wang Y, Belsham DD. Estrogen receptor α and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17 β -estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience*. 2010 Sep 29;170(1):54-66.

Gimpl G, Klein U, Reilaender H, Fahrenholz F. Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry* 34: 13794–13801, 1995.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):629-83.

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392: 509–512, 1998.

- Hadji P. The evolution of selective estrogen receptor modulators in osteoporosis therapy. *Climacteric*. 2012 Dec;15(6):513-23.
- Hawker RW, Robertson PA. Oxytocin in human female blood. *Endocrinology*. 1957 May;60(5):652-7.
- Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol*. 2009 Aug;202(2):223-36.
- He YY, Cai B, Yang YX, Liu XL, Wan XP. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Sci*. 2009 Jun;100(6):1051-61.
- Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1722-30.
- KhanDawood,F.S.,Yang,J.,Dawood,M.Y.Hormonal regulation of connexin-43 in baboon corpora lutea. *J. Endocrinol*. 157, 405–414. 1998
- Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Membrane-initiated actions of estradiol that regulate reproduction, energy balance and body temperature. *Front Neuroendocrinol*. 2012 Oct;33(4):376-87.
- Kennett JE, Poletini MO, Freeman ME. Vasoactive intestinal polypeptide modulates the estradiol-induced prolactin surge by entraining oxytocin neuronal activity. *Brain Res*. 2008 Feb 27;1196:65-73.
- Komisaruk BR, Sansone G. Neural pathways mediating vaginal function: the vagus nerves and spinal cord oxytocin. *Scand J Psychol*. 2003 Jul;44(3):241-50.
- Kumaresan P, Anandarangam PB, Dianzon W, Vasicka A. Plasma oxytocin levels during human pregnancy and labor as determined by radioimmunoassay. *Am J Obstet Gynecol*. 1974 May 15;119(2):215-23.

- Larcher A, Neculcea J, Breton C, Arslan A, Rozen F, Russo C, Zingg HH. Oxytocin receptor gene expression in the rat uterus during pregnancy and the estrous cycle and in response to gonadal steroid treatment. *Endocrinology*. 1995 Dec;136(12):5350-6.
- Lebesgue D, Reyna-Neyra A, Huang X, Etgen AM. GPR30 differentially regulates short latency responses of luteinising hormone and prolactin secretion to oestradiol. *J Neuroendocrinol*. 2009 Sep;21(9):743-52.
- Lebesgue D, Traub M, De Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ, Etgen AM. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One*. 2010 Jan 8;5(1):e8642.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Long, JA; Evans HM The oestrous cycle in the rat and its related-phenomena. *Mem. Univer. Calf.*, v.6. p.1-148, 1922.
- Lucio-Oliveira F, Franci CR. Effect of the interaction between food state and the action of estrogen on oxytocinergic system activity. *J Endocrinol*. 2012 Feb;212(2):129-38.
- Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andò S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25; 279(26):27008-16.
- Malyala A, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids*. 2005 May-Jun;70(5-7):397-406.
- Matsuzaki M, Matsushita H, Tomizawa K, Matsui H. Oxytocin: a therapeutic target for mental disorders. *J Physiol Sci*. 2012 Nov;62(6):441-4. doi: 10.1007/s12576-012-0232-9. Epub 2012 Sep 25.
- Mayes CR, Watts AG, McQueen JK, Fink G, Charlton HM. Gonadal steroids influence neurophysin II distribution in the forebrain of normal and mutant mice. *Neuroscience*. 1988 Jun;25(3):1013-22.

- McCall C, Singer T. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. *Nat Neurosci*. 2012 Apr 15;15(5):681-8.
- McKee DT1, Poletini MO, Bertram R, Freeman ME. Oxytocin action at the lactotroph is required for prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):4649-57. Epub 2007 Jul 5.
- Mecawi AS, Vilhena-Franco T, Araujo IG, Reis LC, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. Estradiol potentiates hypothalamic vasopressin and oxytocin neuron activation and hormonal secretion induced by hypovolemic shock. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Oct;301(4):R905-15.
- Mennin SP, Gorski RA. Effects of ovarian steroids on plasma LH in normal and persistent estrous adult female rats. *Endocrinology*. 1975 Jan;96(1):219-26.
- Micevych P.E. Kelly M.J. Membrane Estrogen Receptor Regulation of Hypothalamic Function *Neuroendocrinology* 2012;96:103–110
- Miescher K1, Scholz C, Tschopp E. The activation of female sex hormones: Mono-esters of alpha-oestradiol. *Biochem J*. 1938 Aug;32(8):1273-80.
- Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology*. 1998 Sep;139(9):3976-83.
- Moos F, Richard P. Level of oxytocin release induced by vaginal dilatation (Ferguson reflex) and vagal stimulation (vago-pituitary reflex) in lactating rats. *J Physiol (Paris)*. 1975 Nov;70(3):307-14.
- Moos F, Freund-Mercier MJ, Guerné Y, Guerné JM, Stoeckel ME, Richard P. Release of oxytocin and vasopressin by magnocellular nuclei in vitro: specific facilitatory effect of oxytocin on its own release. *J Endocrinol*. 1984 Jul;102(1):63-72.
- Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res*. 1993;27:1939–1942.
- Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2007 Aug 1;75(3):478-86. Epub 2007 Apr 4.

- Nissenson R, Fluoret G, Hechter O. Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr;75(4):2044-8. 1978.
- O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF, Jr, George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998;47:310–313.
- Oliet SH, Bourque CW. Properties of supraoptic magnocellular neurones isolated from the adult rat. *J Physiol*. 1992 Sep;455:291-306.
- Onaka T. Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 308–312.
- Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M. Roles of oxytocin neurones in the control of stress, energy metabolism, and social behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2012 Apr;24(4):587-98.
- Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzemeier KH. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*. 2008 Oct;149(10):4846-56.
- Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;228:285–292.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. 456 pp. Academic Press, New York.
- Perlow MJ, Reppert SM, Artman HA, Fisher DA, Self SM, Robinson AG. Oxytocin, vasopressin, and estrogen-stimulated neurophysin: daily patterns of concentration in cerebrospinal fluid. *Science*. 1982 Jun 25;216(4553):1416-8.
- Pierrehumbert B, Torrisi R, Laufer D, Halfon O, Ansermet F, Beck Popovic M. Oxytocin response to an experimental psychosocial challenge in adults exposed to traumatic experiences during childhood or adolescence. *Neuroscience* 2010; 166: 168–177.
- Plante BJ, Lessey BA, Taylor RN, Wang W, Bagchi MK, Yuan L, Scotchie J, Fritz MA, Young SL. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) expression in normal and abnormal endometrium. *Reprod Sci*. 2012 Jul;19(7):684-93.

Pobbe RL1, Pearson BL, Blanchard DC, Blanchard RJ. Oxytocin receptor and Mecp2 308/Y knockout mice exhibit altered expression of autism-related social behaviors. *Physiol Behav.* 2012 Dec 5;107(5):641-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.02.024. Epub 2012 Mar 3.

Poletini MO, McKee DT, Szawka RE, Bertram R, Helena CV, Freeman ME. Cervical stimulation activates A1 and locus coeruleus neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res Bull.* 2012 Sep 1;88(6):566-73.

Quiñones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Adan RA, Burbach JP, Pfaff DW. Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology.* 1997 Jan;65(1):9-17.

Quinn JA, Graeber CT, Frackelton AR Jr, Kim M, Schwarzbauer JE, Filardo EJ. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30. *Mol Endocrinol.* 2009 Jul;23(7):1052-64.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005 Mar 11; 307(5715):1625-30.

Romano N, Lee K, Abraham IM, Jasoni CL, Herbison AE. Non-classical estrogen modulation of presynaptic GABA terminals modulates calcium dynamics in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *Endocrinology.* 2008 Nov;149(11):5335-44.

Rudolf FO, Kadokawa H. Expression of estradiol receptor, GPR30, in bovine anterior pituitary and effects of GPR30 agonist on GnRH-induced LH secretion. *Anim Reprod Sci.* 2013 Jun; 139 (1-4):9-17.

Sánchez-Criado JE, Martín De Las Mulas J, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A. Biological role of pituitary estrogen receptors ERalpha and ERbeta on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology.* 2004;79 (5):247-58

Sanders G, Freilicher J, Lightman SL. Psychological stress of exposure to uncontrollable noise increases plasma oxytocin in high emotionality women. *Psychoneuroendocrinology* 1990; 15: 47–58.

- Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, Kawata M. Expression of GPR30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology*. 2007;148:5842–5850.
- Senkus-Konefka E, Konefka T, Jassem J. The effects of tamoxifen on the female genital tract. *Cancer Treat Rev*. 2004;30:291–301.
- Sharma D, Handa RJ, Uht RM. The ER β ligand 5 α -androstane, 3 β ,17 β -diol (3 β -diol) regulates hypothalamic oxytocin (Oxt) gene expression. *Endocrinology*. 2012 May;153(5):2353-61. doi: 10.1210/en.2011-1002. Epub 2012 Mar 20.
- Shughrue PJ, Delovade TL, Merchenthaler I. Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor-beta. *Prog Brain Res*. 2002;139:15-29.
- Sladek CD, Song Z. Diverse roles of G-protein coupled receptors in the regulation of neurohypophyseal hormone secretion. *J Neuroendocrinol*. 2012 Apr;24(4):554-65.
- Smith HO, Leslie KK, Singh M, Qualls CR, Revankar CM, Joste NE, Prossnitz ER. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(386):e381–389.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975 Jan;96(1):219-26.
- Sosa Ldel V, Gutiérrez S, Petit JP, Vaca AM, De Paul AL, Torres AI. Cooperative effect of E₂ and FGF2 on lactotroph proliferation triggered by signaling initiated at the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Jul 1;305(1):E41-9.
- Sosić-Jurjević B, Filipović B, Milosević V, Nestorović N, Negić N, Sekulić M. Effects of ovariectomy and chronic estradiol administration on pituitary-thyroid axis in adult rats. *Life Sci*. 2006 Jul 24;79(9):890-7.
- Soma KK, Sinchak K, Lakhter A, Schlinger BA, Micevych PE. Neurosteroids and female reproduction: estrogen increases 3 β -HSD mRNA and activity in rat hypothalamus. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4386-90.

- Somponpun S, Sladek CD. Role of estrogen receptor-beta in regulation of vasopressin and oxytocin release in vitro. *Endocrinology*. 2002 Aug;143(8):2899-904.
- Spary EJ, Chapman SE, Sinfield JK, Maqbool A, Kaye J, Batten TF. Novel G protein-coupled oestrogen receptor GPR30 shows changes in mRNA expression in the rat brain over the oestrous cycle. *Neurosignals*. 2013;21(1-2):14-27
- Szego CM, Davis JS. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967 Oct;58(4):1711-8.
- Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA (2009) Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *JNeuroendocrinol* 21: 629-639.
- Tica AA, Dun EC, Tica OS, Gao X, Arterburn JB, Brailoiu GC, Oprea TI, Brailoiu E. G protein-coupled estrogen receptor 1-mediated effects in the rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Nov;301(5):C1262-9.
- Theodosis DT, Montagnese C, Rodriguez F, Vincent JD, Poulain DA. Oxytocin induces morphological plasticity in the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature*. 1986 Aug 21-27;322(6081):738-40.
- Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Dec; 102(1-5):175-9.
- Thrivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2002 Oct;10(2):84-94.
- Tsukahara S, Kambe F, Suganuma N, Tomoda Y, Seo H. Increase in Pit-1 mRNA is not required for the estrogen-induced expression of prolactin gene and lactotroph proliferation. *Endocr J*. 1994 Oct;41(5):579-84.
- Van Tol HH, Bolwerk EL, Lui B & Burbach JP. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*. 1988. 122 945–951.

Wang H, Ward AR & Morris JF 1995 Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* 68 1179–1188.

Watson CS & Gametchu B 2001 Membrane estrogen and glucocorticoid receptors – implications for hormonal control of immune function and autoimmunity. *International Immunopharmacology* 1 1049–1063.

Windle RJ, Kershaw YM, Shanks N, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary- adrenal activity. *J Neurosci* 2004; 24: 2974–2982.

Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Wasilewska-Dziubinska E, Bik W, Baranowska B. The evaluation of estradiol and leptin action on the activity of the somatotrophic and gonadotrophic axes in peripubertal female rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2012;33(2):138-48.

Xu H, Qin S, Carrasco GA, Dai Y, Filardo EJ, Prossnitz ER, Battaglia G, DonCarlos LL, Muma NA. Extra-nuclear estrogen receptor GPR30 regulates serotonin function in rat hypothalamus. *Neuroscience*. 2009 Feb 18;158(4):1599-607.