

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PARA ESTEROIDES OVARIANOS NA
AÇÃO DA KISSPEPTINA SOBRE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS E
SECREÇÃO DE PROLACTINA.**

NAYARA SOARES SENA AQUINO

Belo Horizonte – MG

Março -2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PARA ESTERÓIDES OVARIANOS NA
AÇÃO DA KISSPEPTINA SOBRE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS E
SECREÇÃO DE PROLACTINA.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Mestranda: Nayara Soares Sena Aquino

Orientador: Dr. Raphael Escorsim Szawka

Belo Horizonte – MG

Março - 2013

A minha mãe Ivani

Ao Samuel

Pelo amor e dedicação

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha base e força.

À minha mãe Ivani pela dedicação, renúncia e por nunca me deixar desistir.

Ao Samuel, pelo amor e apoio

Ao professor Raphael por compartilhar seus conhecimentos sempre de forma acessível e paciente.

Aos professores Cândido Celso Coimbra e Laura Hora Rios Leite por me abrirem as portas para a vida científica.

À professora Adelina Martha dos Reis pelos ensinamentos e ajuda.

Aos membros da banca examinadora, professoras Maristela de Oliveira Poletini e Grace Schenatto Pereira Moraes pelas contribuições na construção da dissertação.

Ao professor Celso Rodrigues Franci pela contribuição nas dosagens e à Marina Holanda pelo apoio técnico.

À Roberta pela paciência, cumplicidade e por tornar a “caminhada” mais divertida.

À Izadora pela imprescindível ajuda na execução dos experimentos.

À Juliana pelo auxílio nas dosagens do HPLC.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Paulo, Frederico, Daniela, Daniel, Henrique, Samuel, Fernanda, Carina, Luciana, Mauro, Cristina, Fernandinha, Talita, Sophia, Paula, Mauro Sérgio, Quézia, Iuri, Luiz e Roberta Magalhães pelas contribuições científicas e por tornarem meus dias mais felizes.

À Bruna e Flavinha pela amizade sincera.

Ao Sílvia, Marden e Leo pela prestabilidade e cuidado com os animais.

Ao CNPQ e FAPEMIG por financiarem este trabalho.

RESUMO

Demonstramos recentemente que a kisspeptina estimula a secreção de prolactina (PRL) de forma dependente do estradiol, efeito este, exercido através da redução da atividade de neurônios dopaminérgicos na eminência mediana (EM). A modulação exercida pelo estradiol poderia ocorrer através de receptores para estrógeno (ER) dos subtipos ER α ou ER β , no entanto, o papel de tais receptores neste mecanismo ainda não está elucidado. Semelhantemente, ainda não foi demonstrada a função exercida pela progesterona e seu receptor (PR) na ação da kisspeptina sobre a secreção de PRL e atividade dos neurônios dopaminérgicos. Assim, em um conjunto de experimentos, investigamos o papel dos ERs e PR no efeito da kisspeptina sobre a liberação de PRL e atividade dos terminais de neurônios dopaminérgicos na EM e no lobo neuro-intermediário da hipófise (LNI). Inicialmente, validamos o uso do tamoxifen, modulador seletivo de ER, como antagonista do efeito estimulatório do estradiol sobre a secreção de PRL em ratas. Em experimentos subsequentes, ratas ovariectomizadas (OVX) foram tratadas com estradiol (OVX+E), estradiol e tamoxifen (OVX+ET) ou com os agonistas seletivos para ER α e ER β , PPT (OVX+PPT) e DPN (OVX+DPN), respectivamente. Com o objetivo de investigar ainda a participação da progesterona na ação da kisspeptina, em experimentos adicionais ratas OVX+E foram tratadas com progesterona (OVX+EP) ou progesterona e RU-486 (OVX+EP+RU), antagonista seletivo do PR. Em todos os experimentos, as ratas receberam injeção i.c.v. de kisspeptina-10 ou veículo e tiveram o sangue colhido para análise das concentrações plasmáticas de PRL. Os resultados demonstraram que o tamoxifen inibiu o pico de PRL induzido por estradiol, e bloqueou o efeito estimulatório da kisspeptina sobre a liberação de PRL. O tamoxifen também preveniu o efeito da kisspeptina de reduzir os níveis do metabólito da dopamina (DA) ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) na EM. Ratas OVX+PPT apresentaram maior resposta

da PRL à kisspeptina em comparação a ratas OVX+E, resposta associada à redução de DOPAC na EM e LNI. Por outro lado, a kisspeptina não exerceu efeito nas ratas OVX+DPN. O tratamento com progesterona nas ratas OVX+EP potencializou a liberação de PRL induzida pela kisspeptina, efeito associado à redução nos níveis de DOPAC e DA na EM e LNI. Estes efeitos da kisspeptina foram bloqueados nas ratas OVX+EP+RU. Assim, os resultados deste trabalho demonstram pela primeira vez que o efeito permissivo do estradiol na ação da kisspeptina sobre o eixo DA-PRL é exercido através de ER α e não ER β . Adicionalmente, a ação da kisspeptina é potencializada pela progesterona via ativação do PR.

Palavras-chave: kisspeptina, prolactina, dopamina, estradiol, progesterona, receptor

ABSTRACT

We have shown that kisspeptin stimulates prolactin (PRL) secretion in an estradiol-dependent manner through inhibition of dopaminergic terminals in the median eminence (ME). The effects of estradiol may occur via estrogen receptor (ER) α or ER β , but the role of these receptors in this mechanism has not been elucidated. Likewise, the role played by progesterone and its receptor (PR) in kisspeptin regulation of dopamine function and PRL secretion has not been demonstrated so far. Thus, we performed *in vivo* experiments in female rats to investigate the role of ER and PR on the effect of kisspeptin on PRL secretion and activity of dopaminergic terminals in the ME and neuro-intermediate lobe of the pituitary gland (NIL). Initially, we validated the use of tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator (SERM) as an antagonist of the stimulatory effects of estradiol on PRL secretion. In subsequent experiments, ovariectomized (OVX) rats were treated with estradiol (OVX+E), estradiol and tamoxifen (OVX+ET), or the selective agonists for ER α and ER β , PPT (OVX+PPT) and DPN (OVX+DPN), respectively. Additionally, to investigate the involvement of progesterone on kisspeptin action, OVX+E rats were treated with progesterone (OVX+EP) or progesterone and RU-486 (OVX+EP+RU), a selective antagonist of PR. In all experiments, rats received i.c.v injections of kisspeptin-10 or vehicle and plasma PRL levels were determined in blood samples. Tamoxifen suppressed the estradiol-induced surge of PRL and blocked the stimulatory effect of kisspeptin on PRL release. Tamoxifen also prevented the kisspeptin-induced reduction of dopamine (DA) metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ME. OVX+PPT rats displayed higher PRL response to kisspeptin compared with OVX+E rats, which was associated with a reduction of DOPAC levels in both the ME and NIL. By contrast, kisspeptin had no effect on OVX+DPN rats. In OVX+EP rats, in turn, progesterone

treatment amplified PRL release induced by kisspeptin, which was associated with a marked decrease in both DA and DOPAC levels in the ME and NIL. These effects of kisspeptin were prevented in OVX+EP+RU rats. Thus, our data show for the first time that the permissive action of estradiol in the effects of kisspeptin on DA and PRL occur through ER α but not ER β . Moreover, the effects of kisspeptin are potentiated by progesterone via PR activation. These findings contribute to elucidation of the role played by ovarian steroids in kisspeptin regulation of DA and PRL.

Keywords: kisspeptin, prolactin, dopamine, estradiol, progesterone, receptor