

Hiperprolactinemia e anovulação: efeitos diretos da PRL sobre a produção ovariana de beta-endorfina, prostaglandina E₂ e óxido nítrico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Obstetrícia e Ginecologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Aroldo Fernando Camargos
Co-Orientador: Prof. Fernando Marcos dos Reis

RESUMO:

A ovulação é um processo complexo que envolve gonadotrofinas, hormônios esteróides, e vários mediadores comuns às reações inflamatórias, como as citocinas, as prostaglandinas (PG), os leucotrienos, os ativadores do plasminogênio e a histamina. Recentemente, várias observações sugerem um envolvimento do sistema óxido nítrico/ óxido nítrico sintase no processo ovulatório. A hiperprolactinemia é uma causa bem estabelecida de infertilidade e desordens gonadais, mas os mecanismos periféricos pelos quais a hiperprolactinemia determina a anovulação permanecem pouco explorados. Além disto, as possíveis interações da prolactina (PRL) com os peptídeos envolvidos no controle parácrino da ovulação ainda são pouco conhecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar se a PRL poderia influenciar o processo ovulatório de ratas imaturas submetidas a estimulação da ovulação, através de um mecanismo intra-ovariano envolvendo a beta-endorfina, as PGs e os derivados do óxido nítrico. Setenta e duas ratas Wistar imaturas foram submetidas a superovulação com injeção PMSG e 48h após, receberam 20 UI de gonadotrofinas coriônica humana (hCG). Para o primeiro experimento *in vivo*, 4 horas após a injeção de hCG as ratas foram divididas em 4 grupos que receberam: soro fisiológico 0,9% (controle), 100 µg de PRL, 200µg de PRL, ou 200 µg de PRL mais 200µg de naloxone. Neste experimento, as ratas foram decapitadas na manhã seguinte, as trompas removidas e examinadas em microscópio para determinação do número de oócitos em seu interior. No segundo experimento *in vivo*, quatro horas após a injeção de hCG, as ratas foram divididas em dois grupos que receberam: solução salina (controle), ou 200µg de PRL via

intra-peritoneal. Na manhã seguinte as ratas foram decapitadas e os ovários removidos e fixados em formaldeído para posterior coloração por imunohistoquímica para determinação da distribuição ovariana da beta-endorfina imunorreativa, ou congelados e armazenados em -80°C para posterior análise do RNA mensageiro (mRNA) da proopiomelanocortina (POMC), pela técnica de RT-PCR. Para os experimentos *in vitro* as ratas foram superovuladas como descrito anteriormente e, 4 horas após a injeção de hCG, foram sacrificadas e os ovários removidos e incubados em meio de cultura contendo PRL nas concentrações de 100ng/ml ou 200ng/ml. O meio de cultura foi utilizado para dosagem, por radioimunoensaio, de beta-endorfina, PGE_2 e determinação das concentrações dos metabólitos do óxido nítrico através da reação com o reagente Griess, medida pela absorbância espectrométrica a 540nm. Para avaliação da atividade da óxido nítrico sintase utilizou-se o homogenato dos ovários incubados utilizando-se a técnica da conversão de $\text{L-[}^{14}\text{C]-arginina}$ em $\text{L-[}^{14}\text{C]-citulina}$. A PRL inibiu significativamente o número de oócitos no interior das tubas, tanto na dose de 100 μg ($p<0,05$), quanto na dose de 200 μg ($p<0,01$). O naloxone reverteu, parcialmente, o efeito da PRL. As principais diferenças observadas na distribuição de beta-endorfina nos ovários entre os dois grupos foi a imunocoloração mais intensa nas células da granulosa dos folículos antrais, corpo lúteo e estroma do grupo de ratas tratadas com PRL. O mRNA da POMC foi detectado tanto no grupo controle como no grupo tratado com PRL. A dosagem de beta-endorfina no meio de incubação evidenciou um aumento significativo da produção do peptídeo quando 200ng/ml foram utilizados em relação ao grupo controle. A produção ovariana da PGE_2 foi significativamente menor quando 200ng/ml de PRL foram utilizados em relação ao grupo controle. A concentração de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ e a atividade da óxido nítrico sintase não foram modificadas pela presença da PRL. Os dados demonstram que a PRL inibe o processo ovulatório no ovário de ratas submetidas a hiperestimulação por gonadotrofinas exógenas. Este efeito anti-ovulatório parece ser, localmente, mediado por um aumento da beta-endorfina ovariana e redução na liberação de PGE_2 , sem envolver a via do óxido nítrico.