

INFLUÊNCIA DA FASE DO CICLO ESTRAL SOBRE A SECREÇÃO DE
PROLACTINA INDUZIDA POR ESTRESSE AGUDO EM RATAS
NULÍPARAS E PRIMÍPARAS¹FLÁVIA MARTINS DA SILVA², ERICA ZIMBERKNOPF³¹ Projeto de Pesquisa – Bolsa de Iniciação Científica FAPESP (Processo n° 2010/17886-3)² Graduando do 4º ano do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.³ Docente da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

RESUMO: A prolactina é o hormônio classicamente relacionado ao desenvolvimento das glândulas mamárias durante a gestação e a produção de leite no pós-parto. A liberação desse hormônio adenohipofisário pode sofrer interferência do estresse, resultando assim no aumento de sua produção. Fatores fisiológicos como a experiência reprodutiva, soma de gestação, parto e lactação, e a fase do ciclo estral também tem ação sobre a secreção de prolactina, reduzindo sua concentração sérica. Em estudos anteriores, observamos que a experiência reprodutiva é capaz de modular a liberação de prolactina em resposta ao estresse agudo e que esse fato está relacionado ao tipo de estresse aplicado em ratas. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é estudar a influência do ciclo estral sobre as concentrações de prolactina séricas durante a primeira hora de indução ao estresse agudo em ratas primíparas e nulíparas.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse, Prolactina, Nulíparas, Primíparas, Canulação.

INTRODUÇÃO

A prolactina responde a estímulos estressantes, sendo que sua resposta possivelmente dependa de suas concentrações sanguíneas antes do estresse. Quando as concentrações pré-estresse estiverem reduzidas, ocorre um aumento na concentração de prolactina plasmática, porém se as concentrações pré-estresse estiverem elevadas, então se observa uma redução na concentração de prolactina plasmática (FREEMAN et al., 2000 apud DONADIO, 2005).

A secreção da prolactina é controlada tonicamente pela dopamina secretada pelos neurônios que se projetam do núcleo arqueado para a eminência média do hipotálamo, os quais formam o trato dopaminérgico túbero-infundibular. A dopamina é uma catecolamina precursora da noradrenalina que inibe a secreção da prolactina adenohipofisária ao ser carregada pelo sistema sanguíneo porta-hipofisário e atingir as células especializadas denominadas lactotófos (BEN-JONATHAN, 1996; CUNNINGHAM, 2004). Para que ocorra uma resposta adequada dos lactotófos a ação inibitória da dopamina, é necessária a presença de glicocorticóides do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo que essa ação modulatória não depende de neurotransmissão dopaminérgica, já que os lactotófos possuem receptores para glicocorticóides (HORVÁTH et al., 2001).

Sendo assim, o sistema dopaminérgico é o principal fator de inibição da secreção de prolactina, considerando ainda que a *noradrenalina central atua no receptor adrenérgico α 1* com efeito inibitório deste hormônio, enquanto que a *adrenalina tem efeito oposto atuando no receptor adrenérgico β 2* (SILVA e CASTRO, 2005). Os picos diurnos e noturnos de secreção prolactina ocorrem em consequência da atividade rítmica semi-circadiana dos neurônios dopaminérgicos do sistema túbero-infundibular (ANDERSON et al., 2008). Além disso, a secreção de prolactina sofre alteração durante as fases do ciclo estral, sendo regulada por mecanismos diferentes durante o proestro e o estro, o que pode ser relacionado a alterações na secreção de esteróides. Na tarde do proestro, observa-se um aumento, na forma de pico, na secreção de prolactina (GALA e HAISENLEDER, 1986; SMITH e GALA, 1977). Esse pico já foi descrito há algum tempo (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005), sendo que mais recentemente descreveu-se um pico secundário, que ocorre no início do estro (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005). Na manhã do proestro, os níveis de estradiol se elevam e mantêm-se altos até a tarde do proestro, antecedendo os picos de progesterona, LH, FSH e prolactina (UZUELLI, 2006). Dessa forma, para uma fêmea submetida ao estresse durante a manhã do proestro, não havendo coincidência com pico diurno de secreção de prolactina, esperar-se-ia

um aumento nos níveis séricos desse hormônio, uma vez que a prolactina é um hormônio altamente sensível ao estresse (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005; GALA e HAISENLEDER, 1986; SMITH e GALA, 1977). Este fenômeno parece depender, pelo menos em parte, da secreção de corticosteróides adrenais (SMITH e GALA, 1977).

Assim, observa-se que existe uma interação complexa entre vários tipos de hormônios, como a prolactina, os corticosteróides adrenais, e os esteróides que resulta em uma modulação da resposta ao estresse (GALA e HAISENLEDER, 1986; PAN e GALA, 1985 apud Alvisi, 2010; SMITH e GALA, 1977).

Durante o ciclo estral, a prolactina é estimulada pelo estradiol e pelo hormônio liberador de tireotrofina (*tirotrrophine release hormone* – TRH), sendo inibida pela dopamina (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005). O estradiol estimula a secreção de prolactina por inibir os neurônios da via dopaminérgica, isso ocorre no momento em que o estradiol estimula o gene NOS III na área pré-óptica medial e no núcleo medial do hipotálamo, levando, portanto à produção de óxido nítrico, inibindo assim a produção de dopamina na região tuberoinfundibular dopaminérgica na tarde do proestro o que leva a um aumento da prolactina nesse momento do ciclo. O pico de prolactina ocorre próximo ao pico do hormônio luteinizante (LH). A progesterona por sua vez, inibe essa ação do estrogênio sobre a prolactina, sem, no entanto ter ação alguma sobre a prolactina isoladamente (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005; UZUELLI, 2006).

Já se sabe também que a experiência reprodutiva, soma dos períodos de gestação, parto e lactação, altera as concentrações de prolactina circulante (KINSLEY e BRIDGES, 1988), observando-se uma redução dos níveis circulantes basais da mesma como já descrito na mulher (MUSEY et al., 1987 a, b) e em ratas (KINSLEY e BRIDGES; 1988; MANN e BRIDGES, 1992; BRIDGES et al., 1993). Estudos anteriores em nosso laboratório revelaram que as fêmeas primíparas não são tão sensíveis aos níveis de glicocorticóides circulante quando comparada as nulíparas, o que pode ser um sugestivo que essas fêmeas possuem uma menor sensibilidade ao estresse, sendo possivelmente mais resistentes aos efeitos adversos causados pelo ele (BOCHINI, 2004) e, portanto, menos “ansiosas” também, como descrito anteriormente (LEITE et al., 2007).

Assim, além de alterar as concentrações basais de prolactina e possivelmente a sensibilidade ao estresse e a ansiedade (WARTELLA et al., 2003), a experiência reprodutiva leva a uma redução na intensidade dos picos diurnos e noturnos de prolactina (BRIDGES et al., 1993) e modifica respostas neuroquímicas (HUCKE et al., 1998,; HUCKE et al., 2008) e comportamentais (HUCKE et al., 2001).

Esses fatos somados revelam um efeito modificador do sistema nervoso central exercido pela experiência reprodutiva e sua relação com estresse e ansiedade. Nesse sentido, mostramos recentemente que a secreção de prolactina em resposta ao estresse está aumentada em fêmeas experientes e que esse fato é dependente do tipo de estresse aplicado (HUCKE et al., 2010). Ainda, como descrito anteriormente, a secreção de prolactina pode ser modulada pela fase do ciclo estral (GALA e HAISENLEDER, 1986; SMITH e GALA, 1977; STERN e VOOGT, 1974; ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005). Sendo assim, o presente estudo deverá dar continuidade ao estudo anterior e pretende avaliar a secreção de prolactina durante a primeira hora de indução de estresse em ratas em função da fase do ciclo estral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Serão utilizadas ratas da linhagem Wistar obtidas no biotério do Curso de Medicina Veterinária da UNIFEOB. Tais animais serão alojados em biotério de temperatura controlada (20 a 23°C) por meio de aparelhos de ar condicionado, com ciclos de luz de 12 horas de claro/escuro, com luz ligada a partir das 6:00 h. Água e comida *ad libitum*. No experimento serão utilizadas ratas nulíparas e primíparas da mesma idade, obtidas a partir de um grupo inicial de animais, que será dividido em dois, sendo um deles acasalado, passando por uma experiência reprodutiva (gestação, parto, lactação, desmame) e finalmente um período de descanso de 15 dias antes do início do procedimento experimental. O outro grupo (nulíparas) permanecerá aguardando todo este período de preparação das primíparas. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas relativas ao uso de animais de experimentação da *Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB*.

As fêmeas serão submetidas a 2 tipos de estresse de acordo com o delineamento experimental. O primeiro tipo de estresse será realizado por meio de uma injeção subcutânea

de formalina diluída a 4% (0,2 ml formalina 4%/100 g peso, s.c.). No segundo tipo de estresse, o animal será contido colocando-o dentro de um tubo de PVC de 6,5 cm de diâmetro e 13 cm de comprimento de maneira que o animal fique imóvel, sendo suas extremidades fechadas e com orifícios para permitir a respiração dos animais. Amostras de sangue serão colhidas durante o período de 1 hora após o início da sessão de estresse.

Dois dias antes da realização dos experimentos será realizada a cirurgia da canulação da jugular externa esquerda para permitir a coleta de sangue.

O sangue da jugular será colhido após a cirurgia de canulação, sendo centrifugado (CIENTEC CT- 5000R) sob refrigeração (3 a 4°C, 914 a 1112 g/min) para obtenção do soro, o qual será armazenado em tubos *ependorf* (duas alíquotas de 1,5 ml) a (-20°C) até as dosagens hormonais. Todas as coletas de sangue serão realizadas entre 9:00 e 12:00 horas. **DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. FORAM REALIZADOS DOIS EXPERIMENTOS:** Influência da experiência reprodutiva sobre a secreção de prolactina induzida pela injeção aguda de formalina no metaestro

Delineamento experimental

Experimento 1: Influência da Experiência Reprodutiva Sobre a Secreção de Prolactina Induzida Pela Injeção Aguda de Formalina no Metaestro

Após a obtenção de fêmeas nulíparas (n= 10) e primíparas (n= 10), estes 2 grupos experimentais serão submetidos à cirurgia para implantação das cânulas jugulares como descrito anteriormente. Após um período de recuperação pós-cirúrgica de 2 dias será realizado o acompanhamento do ciclo estral diariamente até que seja observado a fase do metaestro. Nesse dia, serão colhidas amostras de sangue (400 µl) 10 min antes da aplicação do estresse e aos 1, 2, 5, 10, 15, 30 e 60 min após a injeção única de solução de formalina (0,2 ml formalina 4%/100 g peso, s.c.) entre 10:00 e 12:00 h da manhã (Figura 1). As amostras assim colhidas serão centrifugadas e congeladas para posterior quantificação da prolactina sérica.

Experimento 2: Influência da experiência reprodutiva sobre a secreção de prolactina durante a aplicação do estresse por contenção no Metaestro

Após o período de recuperação pós-cirúrgico (2 dias), as fêmeas nulíparas (n= 10) e primíparas (n= 10), serão submetidas ao estresse por contenção durante 1 hora, entre 10:00 e 12:00 h da manhã, após a avaliação da fase do ciclo estral, como descrito anteriormente. No dia do metaestro serão colhidas 8 amostras de sangue da jugular (400 µl) como descrito no experimento 1 (Figura 1). Será colhida também uma amostra basal 10 min antes do início da aplicação do estresse. As amostras também serão centrifugadas e congeladas para posterior quantificação da prolactina sérica.

Análise estatística

As médias da concentração sérica de prolactina das amostras seriadas dos grupos de nulíparas e primíparas, obtidas nos experimentos 1 e 2 serão comparados utilizando-se uma ANOVA de Medidas Repetidas (SAS Statistical Analysis System) para observar-se possíveis modificações da resposta da prolactina induzida pelo estresse em função da experiência reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, GM.; KIESER, D.C.; STEYN, F.J.; GRATTAN, D.R. Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. **Endocrinology**, 149(4):1562-70, 2008.
- ANSELMO-FRANCI, J. A.; SZAWKA, R. E. Controle Neuroendócrino da Reprodução Feminina. In: **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 318-340, 2005.
- BEN-JONATHAN, N. Editorial: dopamine and prolactin – an imperfect duo in circadian rhythmicity. **Endocrinology**, n. 137, p. 3619-3620, 1996.
- BOCHINI, J. C.; *Efeito da adrenalectomia sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas. Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina Veterinária,*

- UNIFEOB, SP. Fapesp Proc. 03/01887-7, 2004.*
- CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- FREEMAN, M.E.; KANYUSKKA, B.; LERANT, A. & MAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80: 1523 – 1631, 2000 in DONADIO, M. V. F. Efeitos do stress agudo e a participação do sistema angiotensinérgico sobre a função reprodutiva em ratas: comportamento sexual, ovulação, lactação. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. **Tese** (Doutorado), 2005.
- GALA, R.R.; HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats. Influences of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterone. **Neuroendocrinology**, n. 43, p. 115-123, 1986.
- HORVÁTH, K. M.; BÁNKY, Z.; TÓTH, B. T.; HALÁSZ, B.; NAGY, G. M. Effect of adrenalectomy and dexamethasone treatment on prolactin secretion of lactating rats. **Brain Research Bulletin**, v.56, n. 6, p. 589-592, 2001.
- HUCKE, E.E.T.S.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; FLORIO, J. C.; FELICIO, L.F. Reproductive Experience reduces striatal dopaminergic responses in freely moving female rats. **Neuroreport**, v.9, p.3589 - 3593, 1998.
- HUCKE, E.E.T.S.; CRUZ-CASALLAS, P.E.; SIDER, L.H.; FELICIO, L.F. Reproductive Experience modulates dopamine-related responses. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.68, p.575 - 582, 2001.
- HUCKE, E.E.T.S.; FELICIO, L.F. Effects of prolactin on *in vivo* striatal monoaminergic activity are modulated by a previous reproductive experience. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44 (supl.), p. 71-80, 2008.
- HUCKE, E.E.T.S.; ALVISI, R.D.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; FELICIO, L.F. Effects of acute and restrained stress on prolactin secretion in nulliparous and primiparous rats. **Abstracts of The 7th International Congress of Neuroendocrinology**. Rouen, France. July, 11-15, 2010. P1-90, p. 123.
- KINSLEY, C. H.; BRIDGES, R. S. Parity-associated reduction in behavioral sensitivity to opiates. **Biology of Reproduction**, n. 39, p. 270-278, 1988.
- LEITE, C. B.; Efeito do estresse agudo e prolongado sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas. Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina Veterinária, **UNIFEOB, SP. Fapesp Proc. 04/15197-5R**, 2007.
- MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Neural and endocrine sensitivities to opioids decline as a function of multiparity in the rat. **Brain Research**, n. 580. p. 241-248. 1992.
- MUSEY, V. C.; COLLINS, D. C.; BROGAN, D. R.; SANTOS, V. R.; MUSEY, P. I., MARTINO-SALTZMAN, D.; PREEDY, J. R. K. Long term effects of the first pregnancy on the hormonal environment: estrogens and androgens. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, p. 111-118, 1987a.
- MUSEY, V. C., COLLINS, D. C.; MUSEY, P. I.; MARTINO-SALTZMAN, D.; PREEDY, J. R. K. Long-term effect of a first pregnancy on the secretion of prolactin. **New England Journal of Medicine**, v. 316, p. 229-234, 1987b.
- PAN, J-T.; GALA, R. R. Central nervous system regions involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge: II. Implantation studies. *Endocrinology*, n. 117, p. 388-395, 1985
- ALVISI, R. A. **EFEITO DO ESTRESSE AGUDO SOBRE A SECREÇÃO DE PROLACTINA EM RATAS NULÍPARAS E PRIMÍPARAS**, 2010
- SILVA, E.C.; CASTRO, L. Regulação da secreção de prolactina. In: **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Antunes-Rodrigues, J.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. (eds.). Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brasil, p. 341-354, 2005.
- SMITH, W.W.; GALA, R.R. Influence of restraint on plasma prolactin and corticosterone in female rats. **Journal of Endocrinology**, n. 74, p. 303-314, 1977.
- UZUELLI, F. H. P.; Metabolismo de radicais livres durante o ciclo estral de ratas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- WARTELLA, J.; AMORY, E.; MACBETH, A. H.; STEVENS, L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H.; Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. **Physiology & Behavior**, v. 79, p. 373-381, 2003.

