

EFEITO DO ESTRESSE AGUDO SOBRE A SECREÇÃO DE PROLACTINA EM RATAS NULÍPARAS E PRIMÍPARAS¹

RENATO DUARTE ALVISI², ERICA ENGELBERG TEIXEIRA DA SILVA HUCKE³

¹ Projeto de Pesquisa – Bolsa de Iniciação Científica FAPESP (Proc. N° 08/50554-4)

² Graduando do 3º ano 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 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.

RESUMO: A prolactina é um importante hormônio responsável pelo desenvolvimento das glândulas mamárias durante a gravidez e pela produção de leite durante o pós-parto. Através de vários trabalhos realizados já se concluiu que a produção de prolactina pode sofrer interferência de vários fatores estressantes, resultando assim no aumento de sua produção. Fatores fisiológicos como a experiência reprodutiva também possuem influência sobre a prolactina, porém agem de forma a diminuir sua produção. Em estudos recentes realizados em ratas adrenalectomizadas observamos que a modulação da secreção da prolactina exercida pelos glicocorticóides adrenais não possuem o mesmo efeito modulatório em função da experiência reprodutiva, indicando assim que fêmeas primíparas não seriam tão sensíveis quanto fêmeas nulíparas aos níveis circulantes de glicocorticóides, o que poderia ser sugestivo de uma menor sensibilidade ao estresse. Outros experimentos realizados com ratas nulíparas e primíparas sobre a influência do estresse agudo e prolongado sobre a secreção de prolactina mostraram que a experiência reprodutiva parece não modificar a concentração sérica de prolactina em resposta ao estresse agudo e prolongado. Porém, a resposta aguda poderia ter ocorrido no período inferior à uma hora, sendo o objetivo deste trabalho estudar a secreção e concentrações de prolactina durante a primeira hora após a estimulação do estresse agudo em ratas primíparas e nulíparas.

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

INTRODUÇÃO

Já é bem conhecido que o estresse é um importante agente causador de modificações adaptativas no sistema nervoso central, assim como se observa sua relação com hormônios como os glicocorticóides e as catecolaminas, relacionadas ao estresse prolongado e agudo, respectivamente. Neste sentido, a presença de glicocorticóides circulantes modula a secreção de prolactina pela adenohipófise, possivelmente de maneira inibitória (DAVE et al., 2000). A modulação dos glicocorticóides sobre a secreção de prolactina não parece depender da neurotransmissão dopaminérgica (HOVÁRTH et al., 2001), pois se encontram receptores para glicocorticóides nos lactotrofos adenohipofisários (BÁNKY et al., 1994). Embora a exata contribuição dos glicocorticóides adrenais sobre a secreção de prolactina ainda não seja bem compreendida, o fato é que estes são necessários para a resposta adenohipofisária adequada.

A adrenalina é o hormônio responsável pelo estresse agudo, sendo liberada pela adrenal em momentos desconfortáveis para o animal. Sua liberação implica no aumento da frequência dos batimentos cardíacos (taquicardia) e aumento do volume de sangue por batimento cardíaco, eleva o nível de glicose no sangue (hiperglicemia), minimiza o fluxo sanguíneo nos vasos e no sistema gastrointestinal, enquanto que maximiza o mesmo para os músculos voluntários dos membros e estimula o metabolismo de lipídeos contidos nas células adiposas (BERTANI et al., 2003). Da mesma forma, o estresse atua sobre o sistema nervoso central (SNC), elevando a liberação do hormônio adrenocorticotrópico ou corticotropina (ACTH) que estimula o córtex adrenal a secretar glicocorticóides em resposta a vários tipos de agentes estressores (RANDALL et al., 1997). Vários hormônios têm atividade glicocorticoide, incluindo cortisol e corticosterona, sendo que a liberação de glicocorticóides atua retrogradamente numa alça de retroalimentação negativa sobre os neurônios secretores do hormônio liberador de corticotropina (CRH) do hipotálamo e as células secretoras de ACTH da adenohipófise (RANDALL et al., 1997). Já se sabe que a secreção deste glicocorticoide em consequência ao estresse prolongado interfere no aumento da produção de prolactina no rato, em outras

espécies (NEILL, 1970; MATT et al., 1977; GALA e HAISENLEDER, 1986) e no homem (NOEL et al., 1972).

A prolactina, por sua vez, é um hormônio polipeptídico, produzido pelas células lactotróficas na adenohipófise, responsável pelo desenvolvimento das glândulas mamárias e pela secreção do leite, sendo produzida em maior quantidade na gestação e no pós-parto (HAFEZ, 1988; GUYTON, 1992; CUNNINGHAM, 2004). Além disso, a prolactina desempenha outros papéis importantes como, por exemplo, estimula e participa da manutenção o cuidado materno (BRIDGES, 1990; BRIDGES, 1985), assim como atua sobre o comportamento sexual (CRUZ-CASALLAS et al., 1999; BANCROFT, 2005). O controle da secreção de prolactina é determinado pela liberação de dopamina que é secretada pelos neurônios que se projetam do núcleo arqueado para a eminência média no hipotálamo, formando o trato dopaminérgico túbero-infundibular (BEN-JONATHAN et al., 1979; BEN-JONATHAN, 1996). A atividade rítmica semi-circadiana dos neurônios dopaminérgicos do sistema túbero-infundibular determina os picos diurno e noturno de secreção de prolactina (TIMMERMAN et al., 1995). Além disso, diversas aminas biológicas, assim como neuropeptídeos centrais, são capazes de modular a secreção de prolactina pelos lactotrofos (SILVA e CASTRO, 2005). Sendo assim, a secreção de noradrenalina central provoca a inibição da secreção deste hormônio, enquanto que a adrenalina tem efeito oposto (SILVA e CASTRO, 2005). Esta atuação depende de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e $\beta 2$, respectivamente (SILVA e CASTRO, 2005). Recentemente também tem sido ainda descrito o peptídeo liberador de prolactina (PrRP) (FUJIWARA et al., 2003; SPUCH et al., 2007).

Por outro lado, já é conhecido o fato que após uma experiência reprodutiva os níveis circulantes basais de prolactina tendem a diminuir como é descrito na mulher por MUSEY (1987a,b) e em ratas por KINSLEY e BRIDGES (1988), MANN e BRIDGES (1992). A experiência reprodutiva consiste nos períodos de gestação, parto e lactação, sendo que uma fêmea experiente ou primípara tende a apresentar picos de prolactina diurnos e noturnos menos intensos (BRIDGES, et al., 1993; LEITE, 2004), além de modular diversas respostas neuroquímicas (HUCKE et al., 1998, SIDER et al., 2003) e comportamentais (HUCKE et al., 2001).

Anteriormente, resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que em ratas primíparas adrenalectomizadas em relação as nulíparas, observamos que a modulação da secreção da prolactina exercida pelos glicocorticóides adrenais sugerem um efeito modulatório em função da experiência reprodutiva. Desta forma, estes experimentos indicaram fêmeas primíparas não seriam tão sensíveis quanto fêmeas nulíparas aos níveis circulantes de glicocorticóides, o que poderia ser sugestivo de uma menor sensibilidade ao estresse (BOCHINI, 2004). Assim também, observamos anteriormente que embora não se revele a influência do estresse agudo e prolongado sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas (LEITE, 2004), já foi sugerido que fêmeas experientes são menos suscetíveis ao estresse (WARTELLA et al., 2003). No entanto, pelo menos a resposta aguda de secreção de prolactina frente a uma situação de estresse pode não ter sido observada, pois a mesma poderia ter ocorrido num período inferior à uma hora, período este utilizado para a indução do estresse imediatamente antes do sacrifício das ratas nulíparas e primíparas (LEITE, 2004). Este fato sugere, portanto, que são necessários mais estudos relacionados à modulação da secreção de prolactina pelos glicocorticóides em função da experiência reprodutiva, particularmente em relação ao estresse agudo, uma vez que possíveis modificações na secreção de prolactina podem ocorrer durante a primeira hora de indução do estresse, i.e., logo após o início da sessão de estresse. Para tanto, o presente estudo deverá avaliar a secreção de prolactina durante o período de indução do estresse, ou seja, na primeira hora.

MATERIAIS E MÉTODOS

Serão utilizadas ratas da linhagem Wistar obtidas no biotério do Curso de Medicina Veterinária da UNIFEOP. 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 às 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) permaneceu aguardando todo este período de preparação das primíparas.

Todos os procedimentos experimentais observaram as normas relativas ao uso de animais de experimentação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEQB.

Indução do Estresse. As fêmeas nulíparas e primíparas 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.

Técnica de Canulação da Jugular. Os animais serão sedados com uma associação anestésica preparada em água destilada com acepromazina (1mg/ml), xilazina (5 mg/ml) e quetamina (25mg/ml); comprovado o grau adequado da anestesia pelo pinçamento da cauda, será realizada a tricotomia da região cervical, dorsal e ventral do animal. A cirurgia iniciará com uma única incisão de cerca de 1 cm na região cervical ventral, os tecidos superficiais serão divulsionados, tornando possível a visualização e acesso à veia jugular externa direita. Será realizada a punção venosa para introdução de uma cânula de polietileno, que será então fixada à musculatura com o auxílio de fio de algodão, sendo a cânula exteriorizada na região dorsal do pescoço com o auxílio de um trocáter utilizando-se o espaço subcutâneo (SZAWKA et al., 2004; FRASÃO, 2004). Logo após a cirurgia, os animais serão mantidos em gaiolas individuais durante 4 dias. No quinto dia, os animais serão submetidos ao procedimento experimental de acordo com o descrito a seguir.

Quantificação das concentrações séricas de Prolactina. O sangue da jugular será colhido após a cirurgia de canulação, sendo centrifugado (CIENEC CT- 5000R) sob refrigeração (3 a 4°C, 914 a 1112 g/min) para obtenção do soro, o qual será armazenado em tubos eppendorf (duas alíquotas de 1,5 ml) a (-20°C) até as dosagens hormonais. Todas as colheitas de sangue serão realizadas entre 9:00 e 12:00 horas. O padrão, hormônio para iodação e o anti-soro que serão utilizados no radioimunoensaio da prolactina serão fornecidos pelo National Institute of Arthritis, Diabets and Digestive Diseases & Kidney (NIADDK) através da National Pituitary Agency (Baltimore, Maryland, USA). A preparação da prolactina de referência será a NIADDK-r-PRL-RP-3 (5µg/ml). Os ensaios de todas as amostras, em duplicata, serão realizados no Laboratório de Dosagens do Departamento de Fisiologia de Medicina da USP, campus de Ribeirão Preto, ao final dos procedimentos experimentais. O ensaio para a quantificação das concentrações séricas de prolactina por radioimunoensaio será realizado somente quando todas as amostras já estiverem coletadas, evitando-se assim a variação interensaios, além de uma significativa economia de material.

Citologia Vaginal. A determinação do ciclo estral será realizada com o objetivo de padronizar a fase do ciclo estral durante os procedimentos experimentais. O diagnóstico da fase do ciclo estral será realizado por observações microscópicas diárias do lavado vaginal. Este será realizado sempre no mesmo horário, pois o ciclo estral sofre influência de picos hormonais e dos ritmos circadianos, responsáveis pelas diferenças histológicas entre as fases e que ocorrem em intervalos regulares de tempo. Será utilizado 20µl de solução salina (NaCl 0,9%), aplicada com auxílio de pipeta na vulva das fêmeas previamente contidas. O líquido aplicado e aspirado logo em seguida será colocado sobre uma lâmina para ser avaliado sob microscópio óptico. Serão identificadas as células típicas de cada fase do ciclo estral: no proestro, observando-se uma grande quantidade de células epiteliais nucleadas globosas, leucócitos e células queratinizadas; no estro, grande quantidade de células de descamação queratinizadas anucleadas; no metaestro, uma grande quantidade de leucócitos.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO 1: Influência da experiência reprodutiva sobre a secreção de prolactina induzida pela injeção aguda de formalina. 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 5 dias, serão colhidas amostras de sangue (400 µl) inicialmente em intervalos de 5 min, durante os primeiros 15 min, e posteriormente após 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. As amostras assim colhidas serão centrifugadas e congeladas para posterior quantificação da prolactina sérica. Será registrada a fase do ciclo estral.

EXPERIMENTO 2: Influência da experiência reprodutiva sobre a secreção de prolactina durante a aplicação do estresse por contenção. após o período de recuperação pós-cirúrgico (5 dias), as fêmeas nulíparas (n= 10) e primíparas (n= 10), os mesmos animais serão submetidos 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. durante esse período serão colhidas 5 amostras de sangue da jugular (400 µl) como descrito no experimento 1 (figura 1). 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

- BANCROFT, J. The endocrinology of sexual arousal. *Endocrinol*, Sep;186(3):411-27, 2005.
- BÁNKY, Z.; NAGY, G. M.; HALÁSZ, B.; Analysis of Pituitary Prolactin and Adrenocortical Response to Ether, Formalin or Restraint in Lactating Rats: Rise in Corticosterone, but No Increase in Plasma Prolactin Levels after Exposure to Stress. *Neuroendocrinology*. v. 59, p. 63 – 71, 1994.
- BEN-JONATHAN, N. Editorial: dopamine and prolactin – an imperfect duo in circadian rhythmicity. *Endocrinology*, n. 137, p. 3619-3620, 1996.
- BEN-JONATHAN, N.; ARBOGAST, L. A.; HYDE, J. F. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Progress in Neurobiology*, n. 33, p. 399-477, 1979.
- BERTANI, A.C. et al.; Análise da influência do repouso na dosagem de prolactina sérica. Setor de Imunoquímica do Laboratório Médico Santa Luzia, 2003.
- 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, UNIFEOP, SP. *Fapesp Proc.* 03/01887-7, 2004.
- BRIDGES, R. S.; DIBIASE, R.; LOUNDES, D. D.; DOHERTY, P. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science*, n. 227, 782-784, 1985.
- BRIDGES, R. S.; FELICIO, L. F.; PELLERIN, L. J.; STUER, A. M.; MANN, P. E. Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. *Life Science*, n. 53, p. 439-445, 1993.
- CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; HUCKE, E. E. T. S.; FELICIO, L. F. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. *Psychoneuroendocrinology*, v. 24, p. 681-693, 1999.
- CUNNINGHAM, J. G.; Tratado de Fisiologia Veterinária. 3 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004.

- DAVE, J. R.; ANDERSON, S. M.; SAVIOLAKIS, G. A.; MOUGEY, E. H.; BAUMAN, R. A.; KANT, G. J. Chronic sustained stress increases levels of anterior pituitary prolactin mRNA. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, n. 67, p. 423-421, 2000.
- FRASÃO, R.; Envolvimento dos núcleos da rafe nas respostas adaptativas a alterações de volume sanguíneo em ratos, estudo através da expressão de Fos. Tese (Mestrado), Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2004.
- FUJIWARA, K; MARRUYAMA, M; USUI, K; SAKAI, T; MATSUMOTO, H; HINUMA, S; KITADA, C; INOVE, K; Appearance of prolactin-releasing peptide-producing neurons in the area postrema of adrenalectomized rats. *Neuroscience Letters*, v.338(2), p.127-30, 2003.
- GALA, R.R.; HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactina levels in females rats. Influences of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactina and corticosterone. *Neuroendocrinology*, n. 43, p. 115-123, 1986.
- GALA, R.R.; HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactina levels in females rats. Influences of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactina and corticosterone. *Neuroendocrinology*, n. 43, p. 115-123, 1986.
- GUYTON, A. C.; Tratado de Fisiologia Médica. 8 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1992.
- HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 4 ed. Zaragoza : Acríbia, 1988.
- 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, n. 16, p. 3589-3593, 1998.
- HUCKE, E. E. T. S.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; SIDER, L. H.; FELICIO, L. F. Reproductive experience modulates dopamine-related behavioral responses. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 68, n. 3, p. 575-582, 2001.
- 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, 2004.
- 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.
- MATT, K. S.; SOARES, M. J.; TALAMANTES, F.; BARTKE, A. Effects of handling end ether anesthesia on serum prolactin levels in the golden hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, n. 173, p. 463-466, 1984.
- 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*, n. 316, p. 229-234, 1987b.
- 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*, n. 64, p. 111-118, 1987a.
- NEILL, J. D. Effect of stress on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of rat. *Endocrinology*, n. 87, p. 1192-1197, 1970.
- NOEL, G. L.; SUH, H. K.; STONE, J. G.; FRANTZ, A. G. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, n. 35, p. 840-851, 1972.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Fisiologia Animal – Modificações e Adaptações. 4° ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.
- SIDER, L. H.; HUCKE, E. E. T. S.; FLORIO, J. C.; FELICIO, L. F. Influence of time of day on hypothalamic monoaminergic activity in early pregnancy: effect of a previous reproductive experience. *Psychoneuroendocrinology*, Estados Unidos, n. 28, v. 2, p. 195-206, 2003
- SILVA, E.C.; CASTRO, L. Regulação da secreção de prolactina, Antunes-Rodrigues, J.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. (eds.). Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brasil, 2005, p. 341-354.
- SPUCH, C.; et al. Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo.

- SZAWKA, R. E.; ANSELMO-FRANCI J. A.; A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. *Life Science*. Jul 9;75(8):911-22, 2004.
- TIMMERMAN, W.; POELMAN, R. T.; WESTERINK, B. H. C.; SCHUILING, G. A. Semicircadian rhythm of dopamine release in the mediobasal hypothalamus in awake rats during pseudopregnancy: evidence that a thyrotropin-releasing hormone analogue stimulates dopamine release and thereby inhibits prolactin secretion. *Neuroendocrinology*, n. 62, p. 434-443, 1995.
- 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.