

MIRIAM DA COSTA OLIVEIRA

AÇÕES DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA E BROMOCRIPTINA
SOBRE A MORFOLOGIA E FUNÇÃO LACTOTRÓFICA DE HIPOFISES DE RATAS
COM HIPERPROLACTINEMIA INDUZIDA PELO ESTRADIOL

TESE SUBMETIDA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
DA UFRGS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
CLÍNICA MÉDICA

ORIENTADOR: PROF. DRA. POLI MARA SPRITZER

COORIENTADOR: PROF. DRA. LIGIA MARIA BARBOSA COUTINHO

PORTO ALEGRE - 1992

FACULDADE DE MEDICINA
UFRGS - UCPA
BIBLIOTECA



Aos idealistas e sonhadores.

Aos que trabalham com obstinação e paciência.

Aos que trabalham com obstinação e paciência
e, enquanto isso, sonham.

AGRADECIMENTOS

Ao final de um trabalho com as características desta Tese, é difícil avaliar qual a aquisição pessoal maior: se o ganho em conhecimento científico, ou se o aprendizado no relacionamento humano. Foram sucessivos os momentos de pedidos de ajuda, e certamente é impossível expressar de maneira adequada, nestas linhas, o agradecimento a todos que atenderam a esses pedidos. Alguns agradecimentos dispensam comentários, como o que é devido à minha família, que resistiu bravamente aos respingos (ou ao turbilhão de águas) consequentes ao desenvolvimento das atividades de pós-graduação mantendo as atividades profissionais na sua plenitude. É dispensável justificar o agradecimento à minha orientadora, Dra. Poli Mara Spritzer que, já dividida entre inúmeros orientandos, aceitou minha presença, talvez sobrecarregando seu trabalho intenso, produtivo, que está enriquecendo nosso meio e, certamente, criando Escola. Também não é necessário justificar o agradecimento à minha co-orientadora, Dra. Ligia Maria Barbosa Coutinho, mais que professora, uma amiga, a quem em inúmeros momentos de dificuldade recorri, em busca de sua opinião ou apoio.

Estas, enfim, são situações públicas, a exemplo de outras comentadas no decorrer da Tese, como o agradecimento aos Drs. José Antunes Rodrigues e Ana Lúcia Favaretto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, pela realização da dosagem da prolactina.

equipe que colaborou no trabalho experimental foi formada por acadêmicos da Faculdade de Medicina. Alguns foram colaboradores ocasionais, outros de experimentos longos; alguns bolsistas de órgãos financiadores de pesquisa, outros não. Todos dedicaram um pouco deles mesmos às muitas horas de administração de drogas e leitura ao microscópio, e às prolongadas sessões de procedimentos cirúrgicos, que ocuparam incontáveis sábados, domingos e feriados. Meu reconhecimento à Jorgea Torres Moraes, Arnaldo Xavier Coronel, Ana Lucia Dieder, Henri Erni Scherer, Neusa Dahlem e Maira Poy. Agradeço igualmente ao Alexandre Serra pela assessoria na área da Informática.

Um lugar especialíssimo neste capítulo é dedicado ao meu professor e amigo Dr. Mario Tannhauser, que interrompeu suas prioridades como Professor Titular de Farmacologia e Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, e sentou comigo, frente ao seu computador, em inúmeras sessões de análise de dados e confecção de gráficos. Maior que a soma de todas essas horas é o tamanho de seu coração.

Agradeço também às Professoras Helena Maria Tannhauser Barros e Cláudia Ramos Rhoden que me auxiliaram pronta e desprendidamente sempre que bati em suas portas.

Muitas foram as pessoas com as quais convivi nos últimos anos, em várias Disciplinas da Faculdade à qual pertencço, a Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, na Disciplina de Fisiologia da UFRGS, e no Curso de Pós-Graduação em Medicina- Clínica Médica da UFRGS. A todas àquelas que

demonstraram respeito, simpatia ou apoio ao meu trabalho, e que assim deixaram suas marcas na minha memória, meu agradecimento.

Este trabalho foi realizado com o apoio da FAPERGS.

SUMARIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Regulação hormonal da função lactotrófica	2
1.2. Interação estrógeno-progesterona nos tecidos- alvo	6
1.3. Estrógenos e hipófise	8
1.3.1. O modelo experimental	8
1.3.2. Efeitos do hiperestrogenismo na espécie humana	14
1.4. Ações hipofisárias do tamoxifen	20
1.5. Ações da progesterona e progestágenos sobre a hipófise	27
1.6. Ações hipofisárias da bromocriptina	31
1.7. Objetivos	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1. Animais	38
2.2. Fármacos	38
2.3. Procedimentos	39
2.4. Medida do peso da hipófise	43
2.5. Estudo morfológico	43
2.6. Dosagem da prolactina	46
2.7. Análise estatística	47
3. RESULTADOS	49

4. DISCUSSÃO	78
4.1. Repercussões hipofisárias do estrógeno endógeno	78
4.2. Efeitos hipofisários do estrógeno exógeno	84
4.3. Efeitos hipofisários do tamoxifen	95
4.4. Efeitos hipofisários do acetato de noretisterona	99
4.5. Efeitos hipofisários da bromocriptina	102
4.6. Efeitos hipofisários das associações de tamoxifen, acetato de noretisterona ou bromocriptina	106
4.7. Analogia entre os resultados obtidos no modelo experimental e o efeito em humanos	108
5. CONCLUSÕES	112
6. RESUMO	115
7. ABSTRACT	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

TABELAS

	<u>Página</u>
TABELA 1	50
TABELA 2	54
TABELA 3	55
TABELA 4	56
TABELA 5	60
TABELA 6	61
TABELA 7	62
TABELA 8	67
TABELA 9	68
TABELA 10	69

FIGURAS

	<u>Página</u>
FIGURA 1	52
FIGURA 2	58
FIGURA 3	59
FIGURA 4	64
FIGURA 5	65
FIGURA 6	71
FIGURA 7	72
FIGURA 8	73
FIGURA 9	74

1. INTRODUÇÃO

A hipófise anterior compreende vários tipos celulares, que secretam diferentes hormônios. No homem, aproximadamente 15 a 25% dessas células são lactotrofos, células secretoras de prolactina (PRL). Estas células, embora dispersas no lobo anterior, predominam na sua região póstero-lateral (KOVACS e HORVATH, 1986).

A PRL tem ações sobre a glândula mamária, onde seu efeito é mamogênico, lactogênico e galactopoiético, e sobre a fertilidade. Há receptores específicos para PRL nas mamas, fígado, supra-renais, próstata, testículos e ovários.

Como a PRL é o hormônio hipofisário que se encontra aumentado com maior frequência, e os tumores produtores de PRL são os mais frequentes entre os tumores secretores hipofisários, reveste-se de importância o estudo de fármacos que potencialmente possam atuar sobre a secreção hormonal e a proliferação celular dos lactotrofos. Em roedores, o estrógeno é, classicamente, um estimulador da secreção da PRL e da hiperplasia de lactotrofos. No entanto, a interação de estrógenos com progestágenos ou antiestrógenos, extensivamente avaliada em outros órgãos-alvo para os esteróides sexuais, é pouco explorada em relação ao tecido hipofisário. Com a intenção de ampliar o conhecimento nesta área, a proposta básica deste estudo foi

a avaliação da interação do estrógeno com um antiestrógeno não-esteróide, o tamoxifen, e do estrógeno com um progestágeno, o acetato de noretisterona. Os parâmetros utilizados nesta avaliação foram o peso hipofisário, a secreção de PRL e a contagem celular de lactotrofos, identificados através da técnica imuno-histoquímica. A inclusão da bromocriptina, um agente antidopaminérgico, permite a comparação com um modelo bem estabelecido de inibição da secreção da PRL, e permite também a extensão do conhecimento sobre os efeitos celulares desta droga a nível da hipófise de ratos, que ainda apresenta alguma controvérsia. O uso combinado do tamoxifen, do progestágeno ou da bromocriptina, busca investigar a possibilidade de potenciação de efeitos, com vistas à utilização clínica em situações especiais. Inicialmente serão feitas considerações sobre a regulação hormonal da função lactotrófica, e a interação estrógeno-progesterona em outros tecidos-alvo que não a hipófise. A seguir será revisado o conhecimento atual quanto aos efeitos hipofisários do estrógeno, do tamoxifen, da progesterona e da bromocriptina, num primeiro momento em roedores, e logo após em humanos.

1.1. REGULAÇÃO HORMONAL DA FUNÇÃO LACTOTROFICA

Os lactotrofos são heterogêneos. Nas hipófises adultas de várias espécies, além de células que secretam apenas PRL, existem outras com capacidade de secretar PRL e

hormônio do crescimento (GH), chamadas mamossomatotrofos. O percentual dessas células é muito variável (FRAWLEY e cols., 1985; LEONG e cols., 1985), possivelmente devido à complexidade das técnicas de avaliação utilizadas para o seu reconhecimento. Além dessa heterogeneidade anatômica, existe uma heterogeneidade funcional, tendo em vista a existência de dois "pools" de liberação de PRL, um rápido e um lento. Até o momento não está esclarecido se estes estoques de PRL residem na mesma célula ou em células diferentes. A heterogeneidade funcional também se manifesta nas respostas a estímulos como o do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e da dopamina, que variam conforme a região da hipófise (BOOCKFOR e FRAWLEY, 1987).

A própria PRL, por sua vez, também é heterogênea, na medida em que apresenta variantes moleculares (ROGOL e ROSEN, 1974; SUH e FRANTZ, 1974).

A liberação da PRL ocorre de maneira pulsátil, e sofre oscilações na puberdade e gravidez, quando aumenta em consequência da elevação do estrogênio. Sua secreção está sob controle de mecanismos hipotalâmicos, de auto-regulação, e de interação com outras células e fatores hipofisários. Recentemente, a regulação dessa secreção foi extensamente revisada (LAMBERTS e MACLEOD, 1990).

A regulação hipotalâmica é exercida através de fatores inibidores e liberadores, sendo a inibição tônica prevalente. Entre os fatores inibidores sobressai a ação da dopamina, produzida por neurônios túbero-infundibulares do

núcleo arqueado. Estes neurônios terminam na eminência mediana, estrutura altamente vascularizada, onde a dopamina é transferida para a circulação porta-hipofisária. A dopamina igualmente é encontrada no lobo posterior da hipófise, oriunda principalmente de neurônios do núcleo arqueado, podendo a partir daí alcançar a hipófise anterior, através dos vasos portais curtos (BEN-JONATHAN, 1985). Na hipófise, a inibição da liberação da PRL se faz através da interação da dopamina com receptores D2. O ácido gama-aminobutírico (GABA) também pode atuar como inibidor da PRL, embora em situações específicas possua um componente estimulatório.

Os fatores implicados na liberação da PRL são muitos, destacando-se o TRH, a serotonina, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o peptídeo histidina-isoleucina (PHI). O VIP e o PHI são peptídeos análogos, sintetizados como parte de um pró-hormônio. Embora o aumento agudo dos níveis da PRL provocado por vários tipos de estresse e pela sucção possa resultar da diminuição de fatores inibidores, é mais provável que fatores estimuladores específicos estejam envolvidos. Enquanto a liberação aguda de PRL no estresse é provavelmente mediada pela secreção de VIP e PHI, vindos do sistema túbero-infundibular, a resposta à sucção está apenas parcialmente sob controle do VIP e PHI, e pode ser regulada por um hormônio do lobo posterior da hipófise (REICHLIN, 1988). A favor dessa teoria está o fato da liberação de PRL pós-sucção ser completamente abolida pela neurolobectomia

(MURAI e BEN-JONATHAN, 1987), enquanto essa intervenção não bloqueia a liberação pós-estresse. A estrutura química deste fator liberador de PRL ainda é desconhecida, bem como sua origem celular, porém está demonstrado que é tecido-específico e se localiza principalmente no lobo intermediário da hipófise, junto aos melanotrofos, onde são produzidos o alfa-MSH (hormônio melanócito estimulante) e a beta-endorfina (LAUDON e cols., 1990).

O principal mecanismo de auto-regulação se faz através de retroalimentação de alça-curta, envolvendo o sistema túbero-infundibular, por interferência com a dopamina hipotalâmica; um mecanismo de menor importância é o de alça ultra-curta, que não requer transporte vascular: a influência do hormônio é local.

O controle parácrino se faz especialmente através da interação entre gonadotrofos e lactotrofos (DENEFF e ANDRIES, 1983; CLARKE e CUMMINS, 1987). São vários os peptídeos e fatores de crescimento que, sintetizados no local, podem interferir com a regulação parácrina da PRL (ver revisão de JONES e cols., 1990).

Estrógenos e progesterona, por interferência com fatores hipotalâmicos e por ação direta no lactotrofo, tem participação definida como moduladores da secreção da PRL (FINK, 1988). Outros hormônios periféricos, como testosterona, tiroxina, glicocorticóides e insulina, desempenham um papel modulador.

1.2. INTERAÇÃO ESTROGENO-PROGESTERONA NOS TECIDOS-ALVO

O estrógeno e a progesterona são esteróides que atuam nos sistemas reprodutivo, hipotálamo-hipófise, hepático, renal e imunitário. É, no entanto, sobre os órgãos reprodutores femininos que seus efeitos biológicos são mais estudados.

No útero, o estrógeno promove alterações metabólicas, como a embebição aquosa, e alterações na biossíntese, que culminam com a hipertrofia e hiperplasia celular (CLARK e cols., 1992). Nesse órgão, a progesterona promove atividade secretora do endométrio, sendo mantida a proliferação do estroma na preparação para uma eventual gravidez.

Na mama, condicionado à presença de hormônios hipofisários, o estrógeno estimula a proliferação do epitélio ductal (FRANTZ e WILSON, 1992), enquanto o efeito da progesterona se expressa principalmente no desenvolvimento lóbulo-alveolar (TOPPER e FREEMAN, 1980), novamente num preparo do órgão para o exercício de sua função diferenciada na gravidez.

O estudo da interação estrógeno-progestágeno é complexo, já que a atividade da progesterona sobre a proliferação mediada pelo estrógeno é diversa, na dependência da espécie estudada, dos diferentes tipos celulares de um mesmo órgão e das oscilações no nível estrogênico (CLARKE e SUTHERLAND, 1990).

Classicamente, a progesterona e progestágenos inibem a proliferação celular mediada pelo estrógeno no endométrio (WHITEHEAD e cols., 1981; LANE e cols., 1986). Os principais mecanismos responsáveis por esta ação inibitória são o efeito de regulação negativa sobre receptores estrogênicos e os efeitos sobre a síntese e o metabolismo do estrógeno. Assim, os níveis celulares do receptor estrogênico são menores sob administração de progesterona (HSUEH e cols., 1976) ou progestágenos (TSENG e GURPIDE, 1975). Paralelamente, a progesterona interfere com a atividade da enzima 17-betahidroxiesteróide-desidrogenase, responsável pelo principal mecanismo de inativação do estrógeno, que é sua conversão a metabólitos com afinidade reduzida pelo receptor estrogênico. A atividade dessa enzima está aumentada na fase luteínica (TSENG e GURPIDE, 1974; SCHMIDT-GOLLWITZER e cols., 1979) e também com a administração de progesterona ou progestágenos, "in vitro" ou "in vivo" (TSENG e GURPIDE, 1975).

Embora o efeito inibitório da progesterona sobre a ação estrogênica não seja tão intenso na mama como no útero, em cultura de tecido mamário normal se observa efeito supressivo sobre a multiplicação celular e estímulo na diferenciação celular (GOMPEL e cols., 1985; GOMPEL e cols., 1986; MALET e cols., 1986).

Assim como no útero, na mama a progesterona diminui os níveis de receptores estrogênicos na fase luteínica (KUTTENN e cols., 1981). Nas mesmas condições é

observado aumento na atividade da enzima 17-betahidroxiesteróide-desidrogenase (FOURNIER e cols., 1982).

Embora até o momento tenha sido salientado o efeito da progesterona sobre receptores estrogênicos, é importante assinalar que a administração prévia de estrógeno, aumenta, por sua vez, os níveis de receptores de progesterona nas células-alvo (ECKERT e KATZENELLENBOGEN, 1981).

1.3. ESTROGENOS E HIPOFISE

1.3.1. O MODELO EXPERIMENTAL

Na hipófise de ratos, o estrógeno provoca aumento da atividade secretora e mitótica, afetando vários tipos celulares mas, principalmente, os lactotrofos (LLOYD e cols., 1975).

O mecanismo de ação através do qual o estrógeno expressa estes efeitos é complexo, englobando ações diretas e indiretas.

As ações diretas envolvem sítios de ligação específicos em tecidos-alvo para o estrógeno. Segundo a teoria clássica, o estrógeno, dissociado das proteínas plasmáticas, se difunde na célula e se liga com o receptor estrogênico citoplasmático. Esse complexo, após ser ativado, é translocado para o núcleo onde interage com aceptores, resultando em ativação da RNA polimerase e da DNA

polimerase, dando início, respectivamente, à síntese protéica e à proliferação celular. No entanto, a partir de estudos de localização de hormônios esteróides através da imuno-histoquímica, foram observados receptores estrogênicos primariamente nucleares (KING e GREENE, 1984; WELSHONS e cols., 1984).

A adição de estradiol, em níveis fisiológicos ou supra-fisiológicos, ao meio de cultura de células hipofisárias de ratos e ovinos, aumenta a liberação da PRL e reverte o efeito inibitório de agonistas dopaminérgicos, demonstrando uma ação direta (NICOLL e MEITES, 1962; RAYMOND e cols., 1978; VICIAN e cols., 1979).

As ações indiretas são secundárias às várias alterações hipotalâmicas, funcionais e morfológicas, provocadas pelo estrógeno. Neurônios na região do núcleo arqueado, periventricular e zona incerta, os quais contêm tirosina-hidroxilase, enzima-chave na síntese de dopamina, acumulam altas concentrações de 3H-estradiol, como determinado por técnica de autorradiografia e imuno-histoquímica (SAR, 1984). A atividade dessa enzima decresce acentuadamente com a administração crônica de benzoato de estradiol por 7 dias (LUINE e cols., 1977), efeito mantido durante 8 semanas de tratamento (NAFTOLIN e cols., 1988). Em estudo recente, observou-se que a intensidade da imunorreatividade para tirosina-hidroxilase está quase ausente com 30 dias de implante de dietilestilbestrol, e que, após 60 dias de tratamento, não há mais reversão desse

processo (EL-AZOUZI e cols., 1990). Em acordo com esses achados, após administração crônica de estradiol se constata níveis suprimidos de dopamina tissular na eminência média (CASANUEVA e cols., 1982), bem como no sangue porta-hipofisário (CRAMER e cols., 1979). Não apenas os níveis absolutos de dopamina estão diminuídos, mas também a transmissão dopaminérgica está alterada, gerando respostas inadequadas a agonistas dopaminérgicos como a nomifensina, e antagonistas como a domperidona (CASANUEVA e cols., 1982).

Ao microscópio óptico e eletrônico, o hipotálamo de ratos que receberam tratamento estrogênico prolongado apresentam alterações patológicas na região do núcleo arqueado (CASANUEVA e cols., 1982). A observação de SARKAR e cols. (1982) sobre o efeito neurotóxico da própria hiperprolactinemia nessa região não foi posteriormente confirmada (EL-AZOUZI e cols., 1990).

A interferência com outros fatores reguladores poderiam ainda mediar o efeito estrogênico. Assim, o estrógeno provoca aumento do VIP na hipófise e eminência média, peptídeo este que estimula a PRL no rato e no homem (PRYSOR-JONES e cols., 1988).

Recentemente, a partir do conhecimento da existência de um fator liberador de PRL na hipófise posterior (REICHLIN, 1988), tentou-se identificar o principal sítio de ação estrogênica na liberação de PRL: se no hipotálamo, na hipófise anterior ou posterior. A infusão aguda de estradiol, em ratos submetidos à secção da haste

hipofisária, não provocou aumento nos níveis da PRL, demonstrando falta de resposta da hipófise anterior, enquanto em ratos submetidos à lobectomia posterior da hipófise, o aumento da PRL foi pequeno, sugerindo ação parcial hipotalâmica (MURAI e BEN-JONATHAN, 1990). Os autores concluíram sobre a importância da hipófise posterior na mediação do efeito agudo do estrogênio na liberação da PRL, seja por ação direta nesta região, ou via neurônios hipotalâmicos que aí terminam (MURAI e BEN-JONATHAN, 1990). Ainda em relação à hipófise posterior, a administração de estradiol sob a forma de implante, não afetou o conteúdo de dopamina aí liberada por terminais nervosos, enquanto se observou redução de 60% na dopamina da eminência média, mostrando resposta diferencial ao estrogênio nesses dois sistemas dopaminérgicos (BURGETT e cols., 1990).

O estímulo na síntese de PRL envolve aumento da atividade do RNA mensageiro da PRL (mRNA PRL) (STONE e cols., 1977; RYAN e cols., 1979), recentemente também demonstrada através da análise da hibridização *in situ* (NOGAMI e cols., 1985). O acúmulo do mRNA PRL reflete alterações ao nível transcricional, possivelmente por ligação do receptor estrogénico a sequências de DNA próximas do gen da PRL (MAURER e cols., 1990). Aumento na atividade do mRNA PRL já é detectado 6 a 12 horas pós-estrogênio (SEO e cols., 1979; MAURER, 1982). A transcrição do gen da PRL é continuamente estimulada 24-48 horas após uma única

administração de estradiol, com doses de 1 a 100 mcg/animal (SHULL e GORSKI, 1989). Dois dias após a descontinuação do estrógeno, essa atividade diminui a 50% do estímulo máximo (STONE e cols., 1977) e, aos 13 dias, há retorno aos níveis pré-estímulo (SEO e cols., 1979). Aumento no conteúdo de PRL hipofisária é observado 30 horas após administração de dietilestilbestrol (JACOBI e cols., 1977).

Além do acúmulo de mRNA PRL em células individuais, contribui para o aumento do total de hormônio sintetizado, a multiplicação das células produtoras de PRL, via estímulo mitogênico do estrógeno.

Outro efeito do estradiol é o aumento no conteúdo de PRL intracelular, que envolve, além do aumento da síntese desse hormônio, diminuição na degradação ou aumento na capacidade celular de armazenamento (KIINO e DANNIES, 1981). Este efeito é acompanhado pelo aumento de volume das células que contém PRL, diminuição no tamanho dos grânulos de armazenamento e aumento do retículo endoplasmático (RER) e aparelho de Golgi (McCOMB e cols., 1981).

As primeiras alterações histopatológicas, isto é, aumento das células acidofílicas, com aumento no número de vacúolos, são vistas no segundo dia após o início do tratamento com estrógeno (VAN NESSELROOIJ e cols., 1991), sendo observada uma hipertrofia celular acentuada com 4 semanas de uso de ésteres do estradiol (CASANUEVA e cols., 1982).

As células imunorreativas para PRL, na hipófise

do rato adulto, são classificadas em quatro tipos, de acordo com a forma celular e o diâmetro dos grânulos nelas contidos (NOGAMI e YOSHIMURA, 1982). A relação entre esses tipos pode ser alterada pelo uso do estrógeno, talvez refletindo diferentes estágios funcionais (NOGAMI, 1984; VAN PUTTEN e KILIAAN, 1988; TONG e cols., 1990). No entanto, do ponto de vista histológico, o dado que mais chama a atenção é o aumento na população total de lactotrofos.

O aumento na atividade mitótica é constatado através da contagem do número de células em mitose, ou do número de lactotrofos, tanto em secções hipofisárias coradas com hematoxilina-eosina (LLOYD e cols., 1975) como em secções tratadas com o processo imuno-histoquímico (PÉREZ e cols., 1986; McCOMB e cols., 1986; PRYSOR-JONES e cols., 1988; OLIVEIRA, 1989), ou células hipofisárias em cultura tratadas pelo mesmo método (LLOYD, 1983). É possível igualmente observar um aumento no número de mitoses através da estimativa da incorporação de ³H-timidina em DNA "in vitro" (JAHN e cols., 1982) ou "in vivo" (LLOYD e cols., 1978), ou ainda através de alteração na atividade da DNA polimerase (JAHN e cols., 1980).

A proliferação celular precede a formação de adenomas (KOVACS e cols., 1980), que às vezes podem ser demonstrados já a partir de 10 semanas de estímulo estrogênico (CASANUEVA e cols., 1982). Sabe-se, no entanto, que a hiperplasia dos lactotrofos varia em intensidade de acordo com as cepas, sendo os ratos Fischer

344 mais sensíveis que os Sprague-Dawley (ELIAS e WEINER, 1984; SCHECHTER e cols., 1987), que os Holtzman (WICKLUND e cols., 1981), e que os Wistar-Furth (PRYSOR-JONES e cols., 1988). O fator responsável pelas diferentes respostas proliferativas é hipofisário, sendo sugerida a perda de um mecanismo de controle de proliferação nos ratos sensíveis (WICKLUND e GORSKI, 1982).

O uso crônico de estrógeno também é acompanhado de uma proliferação vascular na hipófise (NIWA e cols., 1987). Nas cepas sensíveis a tumores essa arteriogênese com circulação direta para a hipófise é mais acentuada (ELIAS e WEINER, 1984; SCHECHTER e cols., 1987). A angiogênese pode estar relacionada ao aumento do fator de crescimento de fibroblastos, observado em ratos Fischer 344 com implante de estradiol (SCHECHTER e WEINER, 1991). A sensibilidade ao tumor é, portanto, fortemente influenciada por fatores genéticos.

1.3.2. EFEITOS DO HIPERESTROGENISMO NA ESPÉCIE HUMANA

Os efeitos da administração de estrógeno sobre a hipófise humana foram estudados em diferentes situações fisiológicas e patológicas.

O uso crônico tanto de etinilestradiol, como de estradiol, promove um aumento nos níveis médios de PRL em relação a grupos controle. Essa observação foi feita em várias situações, como em homens usando estrógeno em altas

doses, portadores de carcinoma de próstata (FRANTZ e cols., 1972) ou transexuais (ASSCHEMAN e cols., 1988 a e b); em mulheres ciclando normalmente (VEKEMANS e ROBYN, 1975); em menopáusicas (YEN e cols., 1974; HELGASON, 1982); em hipogonádicas (EHARA e cols., 1976; JUDD e cols., 1979); e em meninas normais usando estrógeno como terapêutica para altura excessiva (HANKER e cols., 1979). Contudo, a elevação da PRL é moderada, na maioria dos casos não caracterizando uma hiperprolactinemia real. Entre os fatores determinantes da ocorrência da hiperprolactinemia estão a concentração absoluta do estrógeno, a duração da exposição e ainda a alteração dos níveis da globulina ligadora de hormônios esteróides (SHBG), da qual depende o nível de estrógeno livre (GOH e RATNAN, 1990).

Com relação à elevação da PRL associada ao uso de anticoncepcionais orais (ACO), a revisão de vários estudos mostra resultados controversos (REYNIAK e cols., 1980). Trabalhos recentes reforçam a idéia de aumento na concentração da PRL causada pelos ACO (LUCIANO e cols., 1985). A falta de uma conclusão clara sobre o tema pode ser justificada com base nas inúmeras variáveis que fazem parte das observações publicadas, como por exemplo, o número de amostras utilizado para representar o valor da PRL, a hora da coleta, a idade da paciente e fase do ciclo em que foi realizada a coleta (sabe-se que a prolactinemia é significativamente maior nas mulheres mais jovens (VEKEMANS e ROBYN, 1975) e na fase luteínica do ciclo (PANSINI e

cols., 1983)), as diferentes dosagens dos ACO e o número de pacientes observadas. Além do mais, é questionável a definição de "hiperprolactinemia", se não for levado em conta que a distribuição de seus valores na população não é normal (DAVIS e cols., 1984; HWANG e cols., 1986). Estas questões têm um peso fundamental na análise, considerando-se que a elevação nos níveis da PRL, quando presente, mesmo sendo significativa, é modesta.

Como não foi observada associação entre elevação da PRL e dose do estrógeno por pílula, ou tempo de uso dos ACO (SCOTT e cols., 1978; REYNIK e cols., 1980; LUCIANO e cols., 1985), mulheres que desenvolvem hiperprolactinemia com ACO seriam mais sensíveis aos efeitos do estrógeno exógeno. Esta teoria encontra respaldo no fato de que mulheres que tiveram aumento da PRL com ACO no passado apresentam ampliação da resposta da PRL a um teste agudo com estradiol (LUCIANO e cols., 1985).

Um segundo ponto a ser considerado diz respeito à proliferação celular na hipófise humana com o uso de estrógeno exógeno.

Já em 1969, estudando as variações entre os subtipos de células acidofílicas em pacientes com diferentes condições estrogênicas, GOLUBOFF e EZRIN observaram que um paciente masculino, tratado por 3 anos com dietilestilbestrol, apresentava aumento no percentual de células secretoras de PRL. Como os achados não se repetiam em outros pacientes nas mesmas condições, foi postulada

diferença individual na suscetibilidade ao efeito estimulador do estrógeno.

Posteriormente, foi demonstrado aumento hipofisário em 5 de 15 pacientes masculinos que realizaram estudo tomográfico por apresentarem hiperprolactinemia relacionada ao uso de estrógenos (ASSCHEMAN e cols., 1988 a e b).

O estrógeno foi implicado na etiologia de prolactinomas em pelo menos 3 outros casos, embora em nenhum deles possa ser excluída a existência de um microadenoma previamente não diagnosticado (GOOREN e cols., 1988; PANTEON e cols., 1988; BEVAN e cols., 1989). Conhecendo-se, no entanto, a evolução natural dos microprolactinomas, que crescem raramente e vagarosamente, ou não crescem (MARCH e cols., 1981; SISAM e cols., 1987; SCHLECHTE e cols., 1989), o estrógeno poderia ter interferido na evolução destes casos.

A associação do uso de ACO e desenvolvimento de prolactinomas foi avaliada tanto do ponto de vista da incidência de adenomas em população fazendo uso de ACO (WINGRAVE e cols., 1980), como analisando as usuárias de ACO numa amostra de portadoras de adenomas hipofisários (SHERMAN e cols., 1978; MAHEUX e cols., 1982; Pituitary Adenoma Study Group, 1983; HULTING e cols., 1983). Nos estudos caso-controle, o número de usuárias de ACO não é maior no grupo portador de prolactinomas. Quando o ACO foi indicado para controle da natalidade, o risco relativo de prolactinoma foi 1,3, passando a 7,7 quando indicado por irregularidade

menstrual (SHY e cols., 1983). Novamente, a associação ACO-prolactinoma poderia refletir casos previamente não diagnosticados.

Finalmente devem ser consideradas as possíveis consequências do estrógeno sobre adenomas hipofisários comprovados. O aumento acentuado nos níveis de estrógeno endógeno durante a gravidez normal, leva à hiperplasia de lactotrofos, congestão vascular e conseqüente aumento no volume hipofisário (PEILLON e cols, 1970). Em mulheres com prolactinomas, este estímulo pode promover a expansão do tumor. O risco de expansão tumoral sintomática na gravidez é da ordem de 1,6% para microadenomas e 15,5% para macroadenomas (MOLITCH, 1985). Em trabalhos recentes, utilizando o estudo comparativo com a tomografia computadorizada no período pós-parto, os achados não são uniformes. Enquanto uns não observaram progressão no tamanho do adenoma (BRICAIRE e cols., 1988), outros observaram aumento do volume tumoral, embora nunca maior que 2,5 mm de diâmetro, em todas as pacientes observadas, com microadenomas e ovulação induzida pela bromocriptina (TOFFLE e cols., 1988). Apesar da expansão tumoral poucas vezes ter expressão clínica significativa, ela justifica o emprego de um tratamento preventivo para esta complicação, como por exemplo, o uso de bromocriptina por um período mínimo de 6 a 12 meses antes da concepção (OLIVEIRA, 1991).

Com relação ao estrógeno exógeno, as ações parecem se expressar de maneira diversa nos micro e

macroprolactinomas. O estrogênio contido em anticoncepcionais quando usado por 3 meses em mulheres com hiperprolactinemia e/ou microprolactinoma, tratadas com bromocriptina, não ocasionou alteração nos níveis de PRL, nem alteração anatômica selar, embora esta tenha sido avaliada através de raio X simples de crânio (MOULT e cols., 1982). O uso de esteróides sexuais também não se associou a complicações nas pacientes com prolactinomas acompanhadas por BLACKWELL (1992). Essas observações, embora limitadas, fazem com que o uso do ACO seja permitido, por algumas escolas, em pacientes com microprolactinomas, uma vez mantida a terapêutica com agonista dopaminérgico (CUNNAH e BESSER, 1991). No entanto, algumas pacientes com macroprolactinomas apresentam aumento dos níveis de PRL em resposta a uma injeção de benzoato de estradiol, o que não ocorre em mulheres normoprolactinêmicas (WHITE e cols., 1981). Isso sugere que determinados adenomas sofrem influência deletéria do estrogênio.

Na observação de PEILLON e cols. (1970), de 13 pacientes com adenomas hipofisários que usaram estrogênio, em 7 casos foi observada ligação cronológica entre o agravamento da sintomatologia e o uso do hormônio, sendo demonstrado na histologia e microscopia eletrônica desses adenomas, aspecto proliferativo e hemorragias intersticiais, refletindo fragilidade capilar e crescimento rápido (PEILLON e cols., 1970).

LANDOLT e cols. (1984) observaram complicações agudas em paciente com prolactinoma, que incluíam paralisia

do terceiro par craniano, nos primeiros dias após administração de 4 mg de valerato de estradiol e 90 mg de enantato de testosterona. Os mesmos autores observaram quadro semelhante em outra paciente com prolactinoma, após uso de 10 mg de estradiol. Também está relatado o caso de um paciente masculino, com macroprolactinoma tratado com bromocriptina, que apresentou aumento na secreção de PRL e crescimento tumoral, após receber duas injeções de enantato de testosterona (PRIOR e cols., 1987). Esta reação foi explicada com base na aromatização da testosterona em estradiol, cujo nível sérico duplicou após a segunda injeção.

Um dos fatores implicados na variabilidade dos efeitos nos diversos pacientes, é o comportamento dos receptores estrogênicos nos adenomas. Proteínas ligadoras de estrógenos estão presentes nos prolactinomas, em baixas concentrações, existindo correlação entre sua presença e sinais histológicos de proliferação celular e crescimento tumoral (PICHON e cols., 1980). Como o estrógeno tem o potencial de aumentar a concentração de seus receptores em células-alvo, é possível que isso também ocorra em alguns tumores com a administração exógena do hormônio.

1.4. AÇÕES HIPOFISARIAS DO TAMOXIFEN

O tamoxifen (TAM) é um derivado trifeniletileno com atividade antiestrogênica, o que determina sua

utilização no tratamento do câncer de mama. As propriedades farmacológicas do composto são, no entanto, complexas, podendo o mesmo se comportar em relação ao estrógeno como agonista puro, agonista parcial ou antagonista, na dependência de vários fatores, como será discutido adiante.

O TAM age primariamente ocupando receptores estrogênicos, numa clássica inibição competitiva, diminuindo a concentração dos mesmos no citosol e aumentando a concentração nuclear (BOWMAN e cols., 1982). No momento não é possível definir o modo de ação molecular dos antiestrógenos, embora sejam reconhecidas diferenças entre os complexos receptor estrogênico-estrógeno e receptor estrogênico-antiestrógeno. Estas diferenças iniciam com possível diversidade conformacional no complexo, que compromete sua função (SUTHERLAND e MURPHY, 1982), talvez por ligação em diferentes regiões do receptor. A ação pode também depender de mudança na ligação do complexo a elementos dos genes-alvo, por exemplo, menor afinidade do complexo receptor-antiestrógeno pelo DNA, ou falhas no estímulo transcricional do receptor (JORDAN e MURPHY, 1990). A afinidade do TAM pelo receptor estrogênico, em relação à obtida com o estradiol, é muito variável, oscilando entre 0,01 a 30%, sendo a divergência explicada pelas diferentes fontes de obtenção dos receptores e condições do ensaio (FURR e JORDAN, 1984). Em tecido hipofisário, a afinidade relativa do TAM pelo receptor estrogênico é citada como sendo de 3% (LIEBERMAN e cols., 1983) a 10% (SPONA e cols.,

1980), enquanto a inibição da ligação do 3H-estradiol aos receptores hipofisários, induzidas pelo TAM, é da ordem de 71% (SKIDMORE e cols., 1972). A constante de associação do TAM com o receptor é mais lenta que a do estradiol, enquanto a constante de dissociação é muito mais rápida. As alterações em receptores induzidas pelo TAM são máximas 24 horas após sua administração, com retorno vagaroso às condições basais, de até 8 dias, na dependência das doses (BOWMAN e cols., 1982).

Também no hipotálamo basal medial o TAM compete com o estradiol pela ligação com o receptor, com afinidade de ligação relativa de 1,4%, afinidade similar à encontrada para receptores estrogênicos uterinos (TONEY e KATZENELLENBOGEN, 1986).

Outras ações centrais não mediadas por receptores estrogênicos, como por exemplo, uma possível ação sobre a membrana celular, também são postuladas. Recentemente demonstrou-se que o TAM altera propriedades elétricas da membrana, diminuindo a corrente de cálcio, na linhagem celular GH3-B6 (SARTOR e cols., 1988). Esse efeito não é revertido pelo estradiol, afastando a mediação de seus receptores. Além disso, existem sítios de ligação para antiestrógenos, conhecidos como "proteínas ligadoras de antiestrógenos" (AEBS), de significado funcional desconhecido, em vários tecidos-alvo de estrógenos (SUTHERLAND e cols., 1980). Foi sugerido que esses receptores não existam na hipófise (LIEBERMAN e cols.,

1983). Para verificar se receptores dopaminérgicos D2 poderiam representar os AEBS no tecido estriatal e hipofisário, foi examinada a competição entre antiestrógenos e spiroperidol pela ligação com esses receptores. Como se observou que a afinidade de ligação foi baixa, sugere-se que só ocupação limitada de D2 seja provável "in vivo" (TONEY e KATZENELLENBOGEN, 1987). A interação de antiestrógenos com D2 poderia ser uma maneira adicional de influência na liberação de PRL. Ainda com relação a esses receptores, foi demonstrado aumento de sítios dopaminérgicos hipofisários com o uso de TAM, seja por ação direta, ou através de bloqueio na modulação estrogênica desse receptor (FERRETTI e cols., 1988).

Foi também sugerido que em concentrações elevadas existam efeitos tóxicos do TAM, já que nessas condições o estradiol não antagoniza completamente os efeitos sobre a secreção de PRL, tanto em células hipofisárias em cultura (LIEBERMAN e cols., 1983) como num clone de células tumorais (LAMBERTS e VERLEUN, 1987).

Como ação indireta dos antiestrógenos, restam ainda os efeitos que dependem de alterações induzidas no ambiente hormonal local, por exemplo, nos níveis de PRL, fator de crescimento "insulin-like" I (IGF I) e estradiol.

A farmacologia do TAM depende da espécie, órgão e efeito estudado. Apresenta meia-vida biológica longa, a exemplo de outros antiestrógenos com ele relacionados

(KATZENELLENBOGEN e cols., 1978). Isso significa, tanto em ratos como em humanos, um acúmulo sérico progressivo da droga inalterada até atingir um nível estável (ADAM e cols., 1980). Há extenso metabolismo em derivados, como o 4'-hidroxitamoxifen, que possui afinidade de ligação pelo receptor estrogênico similar ao estradiol, sendo portanto um potente antiestrógeno.

Em roedores, a administração isolada de TAM provoca alterações variadas na síntese e secreção de PRL. Foi descrito em ratas adultas normais secreção inalterada (NAGY e cols., 1980; SPONA e cols., 1980), aumentada (PRYSOR-JONES e cols., 1983), ou diminuição do pico de PRL do proestro (JORDAN e cols., 1975). Em ratas imaturas há leve aumento da secreção (TONEY e KATZENELLENBOGEN, 1986), em concordância com os achados em ratas ooforectomizadas (SPONA e LEIBL, 1981). Em ratos machos não foi detectado aumento na secreção (GILNA e MARTIN, 1986). O efeito do TAM sobre a secreção de PRL em ratos com prolactinomas transplantados também é variável: não altera (NAGY e cols., 1980), diminui (DE QUIJADA e cols., 1980(b)), ou aumenta (PRYSOR-JONES e cols., 1983). A mesma variabilidade é observada em células tumorais "in vitro": a secreção não é afetada (NAGY e cols., 1980; DE QUIJADA e cols., 1980(b)), diminui (LAMBERTS e VERLEUN, 1987) ou aumenta (PRYSOR-JONES e cols., 1983; AMARA e DANNIES, 1986). É importante assinalar que os trabalhos citados são heterogêneos com

relação aos tumores estudados (espontâneos, MtTW15, 7315a, GH3, GH4C1) os quais podem apresentar sensibilidade diferente aos antiestrógenos. Outro fator que interfere na análise dos dados obtidos de estudos "in vitro", é a utilização habitual de vermelho de fenol no meio de cultura, como indicador de pH. Essa substância possui propriedades estrogênicas fracas, estimulando o aumento no conteúdo de PRL celular (HUBERTS e cols., 1986). Como o TAM inibe a liberação da PRL estimulada pelo vermelho de fenol, mas aumenta a liberação na ausência dele (HOFLAND e cols., 1987), estão comprometidos os resultados anteriores de efeito inibitório do TAM sobre a PRL em culturas "sem adição de estrógeno" mas com a presença do vermelho de fenol. Com relação ao crescimento dos tumores transplantados, o efeito é inibitório (NAGY e cols., 1980; DE QUIJADA e cols., 1980 (b); LAMBERTS e cols., 1981; PRYSOR-JONES e cols., 1983).

A interpretação dos resultados, muitas vezes opostos em relação a um mesmo efeito, é difícil. A origem desta variabilidade está no mecanismo de ação complexo que envolve os antiestrógenos, da espécie e da idade do animal utilizado no estudo, do tipo de procedimento experimental, da dose do fármaco e da sensibilidade ao estrógeno do tecido estudado. Além disso, a presença do estrógeno é muito importante para a definição da ação (LAMBERTS e MAC LEOD, 1990).

A ação do TAM sobre os níveis de PRL na vigência do estímulo estrogênico, com exceção dos relatos de GILNA e

MARTIN (1986) (administração aguda a ratos machos) e SPONA e cols. (1980) (3 a 5 dias de tratamento em ratas fêmeas) é inibitória.

Além dos efeitos hipofisários, o TAM apresenta uma ação independente no hipotálamo basal medial. Nesse local, ele aumenta o "turnover" da dopamina em níveis inferiores aos obtidos com estradiol (agonista parcial) e, quando administrado em associação ao estradiol, antagoniza seu efeito (TONEY e KATZENELLENBOGEN, 1986). A nível estriatal, a administração do TAM em associação ao estradiol inibe o aumento na densidade de receptores dopaminérgicos observado com o estrógeno isolado (FERRETTI e cols., 1988).

Os efeitos do TAM em humanos são também dependentes da idade, sexo, condições clínicas, dose e duração do tratamento.

Em relação à secreção de PRL, a administração de TAM (20 mg/dia) a mulheres normais na idade reprodutiva, por 5 dias, provoca redução no pico que ocorre normalmente ao redor do meio do ciclo, efeito esse que se acentua com o uso mais prolongado da droga (GROOM e GRIFFITHS, 1976). Em mulheres pós-menopáusicas, enquanto alguns autores não observam efeito, no relato de HELGASON (1982), 40 mg diários de TAM causam redução nos níveis de PRL, de aproximadamente 36% no primeiro mês e 71% em 3 meses. Quando o TAM foi utilizado no puerpério (40 mg/dia), mostrou-se efetivo em inibir a lactação e prevenir a liberação de PRL associada ao

estímulo mecânico da mama (MASALA e cols., 1978).

Já em prolactinomas humanos, o uso diário de TAM mostrou supressão dos níveis de PRL em 5 de 8 pacientes de uma série (LAMBERTS e cols., 1982). Nesse mesmo estudo, a administração combinada com bromocriptina mostrou efeito sinérgico sobre a PRL, resultado também observado na série de VOLKER e cols. (1982).

Em células tumorais humanas em cultura, o TAM não modifica a liberação de PRL, mas reverte a insensibilidade à bromocriptina induzida pelo estradiol (LAMBERTS e cols., 1986). "In vitro" não foi observado sinergismo entre bromocriptina e TAM (ARAFAH e cols., 1983).

1.5. AÇÕES DA PROGESTERONA E PROGESTAGENOS SOBRE A HIPOFISE

A progesterona (P), agindo através de proteínas receptoras específicas (CARSON-JURICA e cols., 1990), possui ações próprias, independentes, e ações que envolvem modulação dos efeitos estrogênicos. Esta modulação se faz através de alteração na secreção de estrógenos (via eixo hipotálamo-hipófise ou diretamente no local da síntese), de alteração na sensibilidade do tecido-alvo (interferindo com o metabolismo estrogênico ou com a concentração de receptores), de alteração nos fatores de crescimento induzidos pelo estrógeno, ou ainda antagonizando diretamente a ação do estrógeno a nível pós-receptor (CLARKE e SUTHERLAND, 1990).

Especificamente a nível hipofisário, dois mecanismos de ação da P têm sido estudados. Um deles, ainda controverso, é a ação sobre os receptores estrogênicos. No modelo em que a administração de estradiol a ratas ooforectomizadas é seguida pelo aumento no nível de receptores estrogênicos nucleares (ATTARDI, 1981; SMANIK e cols., 1983), a administração de P provoca diminuição no nível desses receptores (SMANIK e cols., 1983; BLAUSTEIN e BROWN, 1984). Outros autores, no entanto, não observaram efeito da P nos sítios estrogênicos livres nucleares, basais ou estimulados pelo estradiol (ATTARDI, 1981; WEISENBERG e cols., 1986; KREY e KAMEL, 1990). A dose de estrógeno utilizada na sensibilização é um dos fatores determinantes dessa variabilidade de achados (BLAUSTEIN e BROWN, 1984).

O segundo mecanismo envolve a enzima 17beta-hidroxiesteróide-desidrogenase, responsável pela conversão do estradiol em estrona, um metabólito menos ativo. Essa enzima tem sua atividade aumentada na hipófise, com a administração de P (EL AYAT e MAHESH, 1984). Esse estímulo já é evidente duas horas após a injeção, mesmo intervalo no qual foi observada diminuição nos receptores nucleares ocupados pelo estradiol (SMANIK e cols., 1983).

Em ratos, "in vivo", doses de 0,5 a 4 mg de P não alteram a secreção de PRL (CHEN e MEITES, 1970; CALIGARIS e cols., 1974). Com doses maiores os achados são conflitantes, existindo relatos tanto de aumento da liberação (CHEN e

MEITES, 1970), como diminuição (REIER e cols., 1974).

A P pode também prevenir a elevação da PRL provocada por vários estímulos, como o estresse (JAHN e DEIS, 1986), éter e laparotomia (REIER e cols., 1974).

Adição de P a células hipofisárias normais em cultura não altera a síntese de PRL (LIEBERMAN e cols., 1978). Já a adição de um progestágeno puro (R5020) resulta em inibição da liberação de PRL, num efeito parcialmente revertido pelo estradiol (GIGUÉRE e cols., 1982).

No entanto, é no estudo da inter-relação estrógeno-progestágeno que os efeitos da P sobre a hipófise são mais estudados. A exemplo do que ocorre em outros tecidos-alvo, na hipófise o estrógeno também influencia a indução de receptores de P (SPONA e cols., 1980). Assim, em ratas ooforectomizadas, a dose diária de 0,1 mg/Kg de estradiol, por 4 dias, é suficiente para elevar o nível de receptores citosólicos de P tanto na hipófise anterior como no hipotálamo (SMANIK e cols., 1983). Os níveis desses receptores na hipófise anterior mantêm-se estáveis por 12 a 18 horas após uma dose farmacológica única de estradiol (CALDERON e cols., 1987). Administração de P neste intervalo induz acúmulo nuclear máximo de seu próprio receptor em 1-2 horas.

É antiga a indicação de que a P se contrapõe à ação estimulatória do estradiol sobre a PRL. Assim, em ratos, a P antagoniza a liberação de PRL induzida pelo estrógeno "in vitro" (GIGUÉRE e cols., 1982) e "in vivo" (CHEN

e MEITES, 1970; BRANN e cols., 1988). Segundo BRANN e cols. (1988), esta ação é bloqueada por antagonistas da P.

A administração de um potente antagonista da P também aumenta os níveis da PRL no proestro de ratas (RAO e MAHESH, 1986), talvez como resultado de uma ação estrogênica sem oposição.

A progesterona ou progestágenos (acetato de megestrol) tem efeito inibitório na liberação de PRL em cultura de células tumorais 7315 a e b (tumores induzidos pelo estradiol) (LAMBERTS e VERLEUN, 1987). Este efeito é dose-dependente, e prevenido pelo estradiol. Também em células tumorais GH3, que secretam PRL indistinguível biológica e imunologicamente da PRL natural, a P causa diminuição dose-dependente na produção de PRL e inibe parcialmente o efeito estimulatório do estradiol (HAUG e GAUTVIK, 1976).

Em humanos, a administração de P ou progestágenos parece não influenciar os níveis basais de PRL em indivíduos normais (SITRUK-WARE e cols., 1985), embora provoque aumento na resposta da PRL ao TRH e insulina (MISHELL e cols., 1977).

Em mulheres ooforectomizadas e em mulheres normais, progestágenos reduzem o aumento da PRL causado pelo estradiol (SCHAISON, 1980).

Já em mulheres com hiperprolactinemia por microadenoma hipofisário, o tratamento com derivado da

19nortestosterona, por 3 meses, resultou em diminuição significativa dos níveis basais da PRL (SIJTRUK-WARE e cols., 1985).

1.6. AÇÕES HIPOFISARIAS DA BROMOCRIPTINA

A bromocriptina (BCP), sintetizada em 1967, é um alcalóide semi-sintético do ergot que atua através da estimulação direta e específica dos receptores dopaminérgicos (PASTEELS e cols., 1971). Embora o mecanismo de ação seja primariamente hipofisário (PAWLIKOWSKI e cols., 1978), ela possui também um sítio de ação hipotalâmico, via estímulo dos mesmos receptores (CORRODI e cols., 1973).

Na hipófise anterior de ratos normais, a BCP inibe a liberação de PRL (JACOBI e LLOYD, 1981; CASANUEVA e cols., 1982) e inibe a síntese de DNA (JACOBI e LLOYD, 1981;). Em células hipofisárias em cultura, a BCP igualmente inibe a liberação e a síntese da PRL (PASTEELS e cols., 1971; DANNIES e RUDNIK, 1980; MAURER, 1980(a)). Nas primeiras horas de tratamento, há um aumento da PRL intracelular, ocasião em que aumenta a degradação do hormônio, num processo de remoção do acúmulo da PRL, até que a síntese seja reduzida significativamente (DANNIES e RUDNIK, 1980; MAURER, 1980(a)). A inibição na síntese de PRL se correlaciona com a inibição nos níveis de mRNA PRL (MAURER, 1980(b)). Com a BCP, o acúmulo de mRNA sofre

redução de aproximadamente 50% em relação aos controles (DAVIS e cols., 1989). A inibição da transcrição do gene da PRL é rápida e antecede a alteração nos níveis do mRNA. Esse processo talvez seja mediado por diminuição nos níveis de AMPcíclico, já que a adição de monobutiril AMPcíclico a células pré-tratadas resulta no estímulo da transcrição do gene (MAURER, 1981). Em animais normais a BCP não provoca alteração no volume ou número de grânulos secretores (McCOMB e cols., 1981).

Quando a droga é administrada a ratas Long-Evans hiperprolactinêmicas, que apresentam hiperplasia espontânea de lactotrofos, se repetem os mesmos fenômenos inibitórios, associados a aumento no percentual de volume citoplasmático ocupado pelos lisossomos nos lactotrofos (McCOMB e cols., 1986).

A hipófise anterior estimulada por estrógenos representa, no entanto, o modelo mais utilizado para avaliação dos efeitos da BCP. Nessas condições é acentuada a inibição nos níveis séricos de PRL provocada pela droga (LLOYD e cols., 1975; LLOYD e cols., 1978; CASANUEVA e cols., 1982; PÉREZ e cols., 1986). Embora nesse modelo a inibição da síntese e liberação hormonal seja o efeito primário da BCP no lactotrofo, ela se acompanha de diminuição na proliferação celular, vista através de redução na síntese de DNA hipofisário (DAVIES e cols., 1974) e das células em mitose (LLOYD e cols., 1975; PÉREZ e cols., 1986).

Em cultura de tecido hipofisário de ratas tratadas com estradiol, a incidência de mitoses também é menor com a BCP (PAWLIKOWSKI e cols., 1978), embora para WEST e DANNIES (1980), o pré-tratamento de células em cultura com estrógeno diminua a inibição da BCP na produção de PRL.

A administração concomitante de estradiol e BCP pode também resultar na diminuição ou reversão do efeito obtido com o uso isolado de BCP (GALA e BOSS, 1975; LYLE e cols., 1984; PRYSOR-JONES e JENKINS, 1981). Assim, as alterações morfológicas observadas ao microscópio eletrônico, em ratos tratados com essa combinação de drogas, mostram efeito predominante do estrógeno em relação à BCP (McCOMB e cols., 1981).

Em lactotrofos adenomatosos, de tumores que ocorrem espontaneamente, se mantém o efeito supressor sobre a secreção de PRL (PRYSOR-JONES e JENKINS, 1981; McCOMB e cols., 1985), acompanhado de diminuição na síntese de DNA (PRYSOR-JONES e JENKINS, 1981), inibição do crescimento tumoral (PRYSOR-JONES e cols., 1983), ou diminuição no peso da hipófise, se o tratamento for prolongado (44 dias) (McCOMB e cols., 1985). Nos adenomas espontâneos, as alterações morfológicas induzidas pela BCP incluem aumento no diâmetro dos grânulos em formação e de armazenamento (refletindo o bloqueio na liberação de PRL), diminuição da área nuclear, de citoplasma e de organelas citoplasmáticas (refletindo a diminuição na síntese de PRL) e aumento dos lisossomos (representando aumento na crinofagia). Essas

alterações são, contudo, mais discretas que as encontradas nos tumores em humanos (McCOMB e cols., 1985).

Ação antiproliferativa também foi demonstrada "in vitro", através da inibição do número de colônias desenvolvidas a partir de células tumorais de linhagem GH3, e de redução no tamanho das colônias remanescentes (MELMED, 1981).

Redução na vascularização de tumores induzidos pelo estrógeno, também é um efeito postulado da BCP (ELIAS e WEINER, 1987; KEMENY e cols., 1987).

Em humanos, a BCP diminui a secreção de PRL tanto em mulheres normais (DEL POZO e cols., 1972) como em situações de hiperprolactinemia (BESSER e cols., 1972). Atualmente essa droga representa o tratamento de escolha nas síndromes hiperprolactinêmicas, aí incluídos os adenomas secretores hipofisários. Em microprolactinomas, a normalização dos níveis séricos de PRL é obtida na quase totalidade dos casos, enquanto nos macroprolactinomas, embora a frequência de normalização seja menor, pode alcançar 66 (MOLITCH e cols., 1985) a 90% dos casos (VAN'T VERLAAT e cols., 1986). Diminuição da massa tumoral induzida pela BCP foi demonstrada objetivamente a partir dos últimos anos 70 (SOBRINHO e cols., 1978; CORENBUM, 1978; GEORGE e cols., 1979; MCGREGOR e cols., 1979). Essa redução ocorre em aproximadamente 75% dos pacientes com prolactinomas (LAMBERTS e MAC LEOD, 1990), tanto portadores de

microadenomas (DEMURA e cols., 1985) como macroadenomas (CORENBLUM e HANLEY, 1981; WEISS e cols., 1983; MOSTER e cols., 1985; LESSER e cols., 1990).

Os processos de supressão da PRL e redução do volume tumoral podem ser independentes, já que não há correlação entre o grau de redução do tumor e o grau de alteração nos níveis prolactinêmicos (MOLITCH e cols., 1985). Se a arteriogênese alterada que existe nos tumores induzidos em ratos (ELIAS e WEINER, 1984; SCHECHTER e cols., 1987) se repete em adenomas de humanos, como recentemente sugerido (GORCZYKA e HARDY, 1988; SCHECHTER e cols., 1988), talvez a ação da BCP reduzindo essa vascularização (ELIAS e WEINER, 1987; KEMENY e cols., 1987) possa existir também no homem, justificando a ausência de correlação entre a diminuição da PRL e do volume do tumor.

As alterações histológicas induzidas pela BCP compreendem achados bem estabelecidos na literatura, e outros ainda controversos. Assim, o efeito básico inicial é, sem dúvida, a redução de volume celular, por redução nas áreas citoplasmáticas, nucleares e nucleolares, desencadeada a partir da regressão dos sistemas envolvidos na produção hormonal (RENGACHARY e cols., 1982; TINDALL e cols., 1982; BASSETTI, 1984; LANDOLT e cols., 1987). Essa redução ocorre em poucos dias de uso da droga e é reversível.

Além do efeito clássico na redução celular, o uso da BCP está associado à presença de células degenerativas e necróticas. Espaços celulares preenchidos por estas células,

substância hialina e fibrose foram relatadas pela primeira vez por GEN e cols. (1984), em 5 de 6 tumores de pacientes tratados com BCP por 14 a 36 semanas. Embora o achado sugerisse um efeito crônico, as mesmas alterações foram descritas após duas semanas de uso da droga (MORI e cols., 1988). O aumento no conteúdo de tecido fibrótico é correlacionado com a duração do tratamento (ESIRI e cols., 1986). O grau de contribuição da perda de células secundária à necrose no total de redução do tumor é variável (MORI e cols., 1988). Esta variabilidade deve estar implicada na retomada do processo tumoral que pode acompanhar a suspensão do tratamento. A interrupção do tratamento a longo prazo com BCP é acompanhada em mais de 50% dos casos por hiperprolactinemia (RASMUSSEN e cols., 1987). De 4 pacientes que apresentaram redução do tumor com BCP, a interrupção da droga após um ano de tratamento foi acompanhada de reexpansão em 3 casos (MOLITCH e cols., 1985). Assim, examinando 5 tumores de pacientes nos quais a BCP havia sido interrompida há uma semana, MORI e cols. (1988) observaram dois comportamentos histológicos distintos: progressão da destruição celular ou volta do crescimento, sugerindo a existência de duas populações celulares, sensíveis ou resistentes à ação citocida da BCP.

Como colocado no início da introdução, a avaliação do efeito de diferentes fármacos sobre os lactotrofos, além de ampliar o conhecimento a respeito da inter-relação entre função e morfologia desta população celular, possui fortes implicações clínicas.

O modelo experimental mais adequado para a avaliação dos fármacos aqui propostos é o da hipófise estimulada pelo estrógeno. Embora na literatura estejam bem estabelecidos os efeitos do estrógeno exógeno sobre alguns parâmetros da avaliação dos lactotrofos em ratos, informações fisiopatológicas mais amplas sobre o estrógeno endógeno não estão bem claras na cepa Wistar. Da mesma maneira, acrescentaria dados o estudo mais detalhado das curvas dose-tempo-resposta da secreção da prolactina e de alterações na morfologia hipofisária frente ao estrógeno exógeno.

Assim, antes dos experimentos envolvendo o acetato de noretisterona, o tamoxifen e a bromocriptina, vai ser objeto de estudo o comportamento de vários parâmetros hipofisários em ratas intactas (estabelecimento de padrões em ratas Wistar), em situações de hipoestrogenismo (avaliação dos efeitos hipofisários do estrógeno endógeno) e sob o efeito de diferentes doses e tempos de administração de estradiol (escolha das doses de estrógeno exógeno a serem administradas ao modelo que permitirá o estudo dos demais fármacos).

1.7. OBJETIVOS

Foram objetivos deste trabalho:

1. Estabelecer, em ratas Wistar, os padrões para o peso da hipófise, níveis de prolactina sérica e percentual de lactotrofos hipofisários, em diferentes condições estrogênicas.
2. Avaliar, em ratas castradas, os efeitos hipofisários do estrógeno, utilizado em diferentes doses e em administração aguda ou prolongada.
3. Avaliar, em ratas castradas, sob estímulo estrogênico de curta duração, os efeitos hipofisários de diferentes doses de um antiestrogênio - o tamoxifen, de um progestágeno - o acetato de noretisterona, e da bromocriptina. Avaliar, no mesmo modelo, os efeitos da associação de tamoxifen com progestágeno ou bromocriptina, e do progestágeno com bromocriptina.
4. Avaliar, em ratas castradas, tratadas a longo prazo com estradiol, os efeitos hipofisários do tamoxifen, do progestágeno e da bromocriptina, isolados ou em associação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Nos experimentos abaixo relacionados, foram utilizadas ratas adultas, com 52 a 112 dias de idade no início do experimento, exceto especificação em contrário, de linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, a 22 ± 4 graus C, em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas), recebendo dieta padrão para roedores e água à vontade. A manipulação dos animais, necessária para a limpeza das gaiolas, obedeceu à rotina de procedimentos do Biotério. Em todos os experimentos, com exceção do primeiro, os animais foram bilateralmente ooforectomizados, sob anestesia com éter.

2.2. FARMACOS

As drogas utilizadas foram valerato de estradiol (Primogyna-depot, BERLIMED, Brasil), tamoxifen (Nolvadex, ICI/WELLCOME, Brasil), acetato de noretisterona (Primolut-nor, BERLIMED, Brasil) e bromocriptina (Parlodel, SANDOZ, Brasil). Para diluição do estradiol utilizou-se óleo de milho, no volume de 0,2 ml por dose administrada. As demais

substâncias foram diluídas em etanol e solução salina 0,9g%, sendo o etanol utilizado na quantidade fixa de 0,1 ml/mg de tamoxifen; 0,02 ml/mg de noretisterona e 0,05 ml/mg de bromocriptina. A substância utilizada como controle de veículo oleoso foi óleo de milho, em volume equivalente à solução injetada de estradiol. O controle de veículo aquoso foi uma solução de etanol/salina, na proporção 0,15:1, em volume igual ao controle oleoso. Em todos os experimentos as drogas ou soluções controle foram administradas via subcutânea.

2.3. PROCEDIMENTOS

EXPERIMENTO 1 - Padrões para o peso da hipófise, prolactina sérica e percentual de lactotrofos na hipófise anterior de ratas, em diferentes condições estrogênicas.

Foram constituídos 3 grupos de ratas, num total de 24 animais. No primeiro grupo, os animais intactos foram sacrificados aos 26 dias de idade, ainda sexualmente imaturos; no segundo grupo, também de animais intactos, as ratas foram sacrificadas aos 80 dias de idade; no terceiro grupo, os animais foram sacrificados aos 82 dias de idade, 30 dias após terem sido ooforectomizados.

EXPERIMENTO 2 - Efeitos do estrógeno, em diferentes doses e duração de tratamento, sobre o peso da hipófise, a prolactina sérica e o percentual de lactotrofos na hipófise anterior de ratas.

Um total de 37 animais foram ooforectomizados e, 2 dias após a castração, separados em 3 grandes grupos, conforme a duração do tratamento. Os animais do primeiro grupo foram subdivididos, cada grupo recebendo dose única de 10, 50 ou 300 mcg de valerato de estradiol. Os animais foram sacrificados 7 dias após essa administração. O segundo grupo, também subdividido, recebeu valerato de estradiol nas mesmas doses, mas em duas ocasiões, com intervalo de 7 dias. Os animais foram sacrificados 14 dias após a primeira administração. No terceiro grupo, foram feitas 3 administrações das mesmas doses de valerato de estradiol, separadas por intervalo de 7 dias, com duração total de tratamento de 21 dias.

EXPERIMENTO 3 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina ou suas associações, sobre o peso da hipófise, prolactina sérica e percentual de lactotrofos hipofisários, em ratas estimuladas pelo estradiol.

Um total de 60 animais foram ooforectomizados e, 1 dia após a castração, subdivididos em 10 grupos. Todos os animais receberam 300 mcg de valerato de estradiol nesse dia. Esta dose foi repetida no sétimo dia de tratamento. Do sétimo ao décimo primeiro dia, 3 grupos receberam tamoxifen em diferentes doses, isto é, 20, 60 ou 120 mcg diários; 3 grupos receberam acetato de noretisterona, nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg diários; e outros 3 grupos receberam bromocriptina, nas doses de 0,05, 0,2 ou 0,6 mg diários. O décimo grupo recebeu, além do estrógeno, a substância controle de veículo aquoso, servindo como grupo controle.

Outro grupo, de 16 animais, 1 dia após a castração, foi subdividido em 3 subgrupos que receberam, respectivamente, combinação de tamoxifen, 120 mcg, e acetato de noretisterona, 0,5 mg; tamoxifen e bromocriptina, 0,6 mg; ou acetato de noretisterona e bromocriptina. Nesses 3 grupos, tanto o tratamento com o estradiol, como o tratamento com a combinação de fármacos, obedeceram ao protocolo dos 10 grupos iniciais.

Ao final dos tratamentos, 24 horas após a última administração do tamoxifen, acetato de noretisterona ou bromocriptina, isolados ou associados (5 dias após a última administração de estradiol), os animais foram sacrificados.

EXPERIMENTO 4 - Efeitos do estradiol sobre a hipófise, após tratamento por 50 dias.

Um total de 17 animais foram ooforectomizados e, 5 dias após a castração, divididos em 2 grupos. Num dos grupos, cada animal recebeu, semanalmente, 300 mcg de valerato de estradiol; no outro, que constituiu o controle, os animais receberam óleo de milho. Passadas 48 horas após a oitava e última administração de estradiol ou óleo de milho, os animais foram sacrificados.

EXPERIMENTO 5 - Efeitos hipofisários do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina ou suas associações, sob estímulo prolongado com estradiol.

Um total de 78 animais foram ooforectomizados e, após 5 dias, receberam a primeira de uma série de 10 administrações semanais de 300 mcg de valerato de estradiol. Quatro dias após a oitava dose, foram formados 7 grupos, que passaram a receber diariamente, por 12 dias, um dos seguintes tratamentos: tamoxifen, 120 mcg; acetato de noretisterona, 0,5 mg; bromocriptina, 0,6 mg; tamoxifen + acetato de noretisterona; tamoxifen + bromocriptina; acetato de noretisterona + bromocriptina; controle de veículo aquoso.

Entre 24 e 48 horas após a última administração de estradiol (24 horas após a última dose dos demais fármacos), os animais foram sacrificados.

Ao final dos tratamentos, as ratas foram levadas, uma a uma, para o local do sacrifício, e decapitadas em guilhotina para pequenos animais, sem anestesia. Foi recolhido o sangue troncular, sendo o soro armazenado a -20 graus C para dosagem da PRL. As hipófises foram rapidamente removidas. Cada procedimento foi sempre realizado pela mesma pessoa.

2.4. MEDIDA DO PESO DA HIPÓFISE

Imediatamente após a retirada, as hipófises inteiras foram umedecidas com uma gota de solução tampão de fosfato, sobre papel filtro, e daí removidas e pesadas em balança analítica Sartorius.

2.5. ESTUDO MORFOLOGICO

PREPARO E SELEÇÃO DE CORTES

As hipófises foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em blocos de parafina. Foram feitas secções seriadas, com espessura entre 4 e 6 micra, de todo tecido disponível. Respeitando-se a sequência natural dos cortes, uma lâmina de cada terço da hipófise foi separada e corada com hematoxilina-eosina.

Escolhida a melhor secção, em termos de celularidade, entre as 3 lâminas, as imediatamente anteriores e posteriores foram submetidas ao método imunohistoquímico. Esta técnica, que permite a visualização de

componentes celulares, foi aqui utilizada para identificação da PRL. O método empregado foi o da avidina-biotina-peroxidase (ABC).

SUBSTANCIAS UTILIZADAS NA IMUNO-HISTOQUIMICA

O anti-soro primário anti-PRL de rato utilizado (NIDDK-anti-rPRL-IC-4-Rabbit) foi gentilmente fornecido pelo National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, através do National Hormone and Pituitary Program (Maryland, USA). As diluições testadas do anti-soro foram 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:3000, sendo escolhida como mais adequada ao procedimento a de 1:2000. Foi utilizado, como anticorpo secundário, a imunoglobulina anti-imunoglobulina de coelho, biotinizada, do kit Avidina-biotina (ABC) (Vector Laboratories, Inc.). Do mesmo kit fazem parte o reagente avidina-biotina e o soro normal de cabra, usado para prevenir a ligação inespecífica da imunoglobulina às proteínas séricas. O cromógeno utilizado no substrato peroxidase foi o 3-3 diamino-benzidine-tetracloroeto (DAB) (Serva, Heidelberg).

Para diluição ou preparo das substâncias citadas foram utilizados solução tampão de fosfato (PBS), tampão TRIS-HCl e peróxido de hidrogênio. O preparo das soluções tampões, as diluições das substâncias e o preparo do substrato peroxidase seguiram orientação detalhada anteriormente (OLIVEIRA, 1989). Resumidamente, o anticorpo secundário e o reagente avidina-biotina foram diluídos na

relação 1:200 em PBS, e o soro normal de cabra em 4:100. Para o substrato peroxidase, foi feita inicialmente uma solução-mãe com 50 mg do cromógeno diluídos em 10 ml de TRIS HCl; na hora da utilização, foram retirados 1,2 ml dessa solução, e adicionados 20 microlitros de peróxido de hidrogênio a 30% e TRIS HCl em quantidade suficiente para completar 6 ml de substrato peroxidase.

PROCEDIMENTOS DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Previamente ao uso dos anticorpos, foi inibida a peroxidase endógena, utilizando-se metanol e peróxido de hidrogênio. Para prevenir a ligação dos anticorpos com elementos do colágeno e tecido conjuntivo, foi adicionada ao tecido outra solução protéica, isto é, soro normal de cabra. Uma vez realizados estes procedimentos, foi seguida a técnica de HSU e cols. (1981), modificada por COUTINHO (1988), onde se sucedem as incubações dos cortes com o anticorpo primário, anticorpo secundário, complexo avidina-biotina-peroxidase e DAB, seguidos por contra-coloração dos cortes com hematoxilina, desidratação dos cortes e montagem em bálsamo.

Como controles da especificidade do anticorpo, foram utilizados um corte de hipófise humana normal, processado de maneira idêntica aos cortes em estudo (controle positivo) e outro corte de hipófise humana que, durante a aplicação da técnica, não foi incubado com o anticorpo primário (controle negativo).

CONTAGEM CELULAR

A contagem foi realizada ao microscópio óptico, usando objetiva de 40 aumentos, à qual foi sobreposta uma lente reticulada com 100 espaços de 1 milímetro quadrado. Em áreas da lâmina escolhidas ao acaso, com população intensa de células contendo PRL, foram contadas no mínimo 200 células nucleadas, e registrado o número de células contendo PRL nesta população. As células foram contadas de maneira independente por 3 pessoas, permitindo o cálculo da média das contagens para cada hipófise. O resultado foi expresso como a porcentagem de células contendo PRL, em relação à contagem total.

2.6. DOSAGEM DA PROLACTINA

A PRL foi dosada por radioimunoensaio de duplo anticorpo, usando os seguintes materiais, gentilmente fornecidos pelo National Institute of Diabetes & Digestive, & Kidney Diseases (NIDDK): PRL de rato (rPRL-1-5), anti-soro para PRL de rato, produzido em coelho (anti-rPRL-S-9) e preparado de referência de PRL de rato (rPRL-RP-3).

A marcação dos traçadores e o ensaio foram realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, numa gentileza dos Doutores José Antunes Rodrigues e Ana Lúcia Favaretto.

Os traçadores foram marcados com ^{125}I , usando o método da cloramina-T e purificação em coluna de Sephadex

G-75.

No ensaio, cada amostra foi avaliada em duplicata e todas amostras correram ao mesmo tempo, para limitar a variação intra-ensaio. A cada tubo contendo 100 microlitros de plasma puro ou diluído, foram adicionados 100 microlitros de uma diluição de 1:4000 do anti-soro antiPRL. A curva padrão foi obtida adicionando-se quantidades de rPRL-RP-3 variando de 3,9 a 100 ng/ml à diluição do anti-soro.

As amostras foram incubadas por 24 horas à temperatura ambiente (15 a 20 grausC). Seguiu-se a adição de 200 microlitros (1:40) do anticorpo precipitante, anti-IgG de coelho, produzido pelo Dr. José Antunes Rodrigues em cabra, diluído em EDTA 0,05M em tampão fosfato 0,01M. Após duas horas, adicionou-se 500 microlitros de solução PEG 5% em água. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4 grausC durante 15 minutos, a 800 xg. A contagem do precipitado foi feita após aspiração do sobrenadante. A porcentagem de ligação das amostras foi comparada a das amostras da curva padrão, e o resultado expresso em termos de ng de rPRL-RP-3/ml de plasma.

A sensibilidade do ensaio foi 4 ng/ml. O coeficiente de variação intra-ensaio e interensaio foi, respectivamente, 8,6% e 12%.

2.7. ANALISE ESTATISTICA

Para comparação entre os vários grupos de

tratamento, utilizou-se análise da variância (ANOVA- one way). Os testes de Cochrans e Bartlett-Box foram utilizados para homogeneidade das variâncias, e o teste de múltipla amplitude de Duncan, para localização das diferenças entre elas. Para comparação de resultados entre dois grupos independentes foi utilizado o teste t de Student. Os estudos de correlação utilizaram o Coeficiente de Pearson. Em todas as análises considerou-se 5% como a maior probabilidade admissível para erro alfa (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

3. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 - Padrões de peso da hipófise, prolactina sérica e percentual de lactotrofos em diferentes condições estrogênicas.

Em ratas sexualmente imaturas, o peso da hipófise variou entre 1,5 e 3,0 mg; o nível da PRL sérica entre 3,69 e 49,37 ng/ml; e o percentual de lactotrofos entre 20,5 e 25,5.

Em ratas adultas, o peso da hipófise variou entre 3,7 e 9,3 mg; o nível da PRL sérica entre 24,42 e 112,4 ng/ml; e o percentual de lactotrofos entre 38,5 e 49.

Em ratas adultas ooforectomizadas, o peso da hipófise variou entre 3,6 e 8,8 mg; o nível da PRL sérica entre 1,16 e 6,68 ng/ml; e o percentual de lactotrofos entre 19,5 e 24.

Os valores médios e erros padrão de cada parâmetro, em cada grupo, constam na Tabela 1.

O peso da hipófise das ratas sexualmente imaturas é significativamente menor que o das adultas intactas ou ooforectomizadas. O nível da PRL sérica e o percentual de lactotrofos nas ratas sexualmente imaturas e nas ooforectomizadas é significativamente menor que nas adultas intactas. Nesses parâmetros, não há diferença significativa

TABELA 1
 PESO DA HIPOFISE, PROLACTINA SÉRICA E PERCENTUAL DE
 LACTOTROFOS HIPOFISARIOS DE RATAS EM DIFERENTES
 CONDIÇÕES ESTROGENICAS

RATAS	PESO DA HIPOFISE mg	PROLACTINA ng/ml	LACTOTROFOS %
1. SEXUALMENTE IMATURAS	2,38+/-0,21* (8)	24,52+/-6,85** (8)	23,50+/-0,77** (6)
2. ADULTAS	7,40+/-0,65 (8)	53,35+/-10,57 (8)	42,68+/-1,08 (8)
3. ADULTAS OOFORECTOMIZADAS	7,15+/-0,67 (7)	3,30+/-0,92** (7)	22,21+/-0,60** (7)

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação às adultas e ooforectomizadas ($p < 0,05$) ** Diferença significativa em relação às adultas ($p < 0,05$).

entre o grupo das imaturas e o das ooforectomizadas.

A Figura 1, que mostra secções da hipófise anterior tratadas com o anti-soro anti-PRL, de ratas em diferentes condições estrogênicas, ilustra as diferenças no número de lactotrofos.

EXPERIMENTO 2 - Efeitos do estrógeno, em diferentes doses e duração de tratamento, sobre o peso da hipófise, a prolactina sérica e o percentual de lactotrofos.

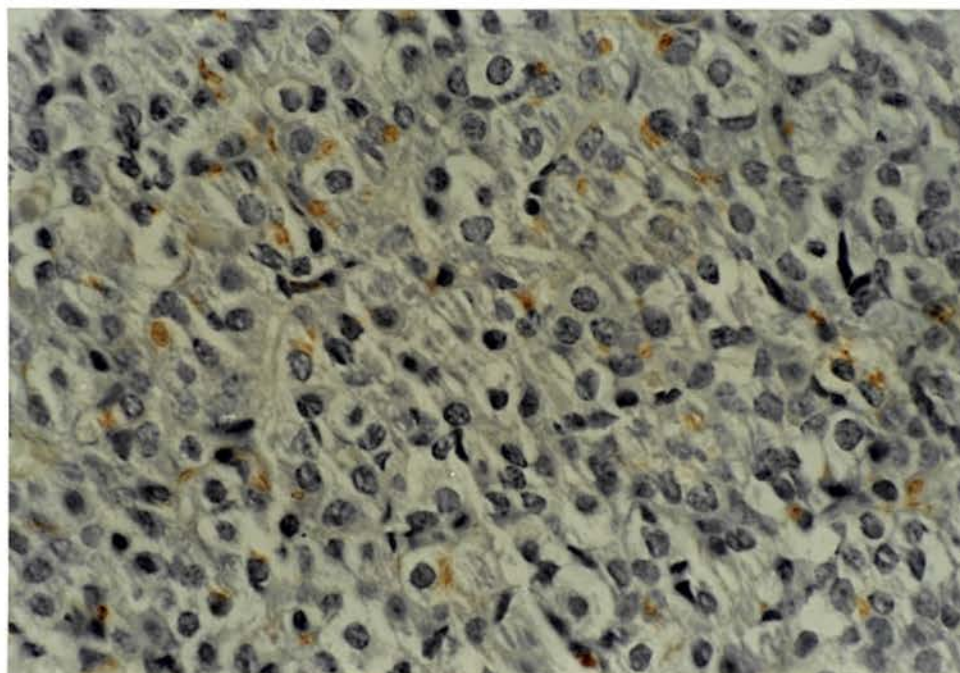
O resultado da avaliação desses parâmetros consta nas Tabelas 2, 3 e 4.

Com 7 dias de tratamento (uma administração de 10, 50 ou 300 mcg de estradiol) houve aumento significativo no nível de PRL sérica com a dose de 300 mcg, enquanto não se observou diferença no percentual de lactotrofos, em relação ao grupo controle.

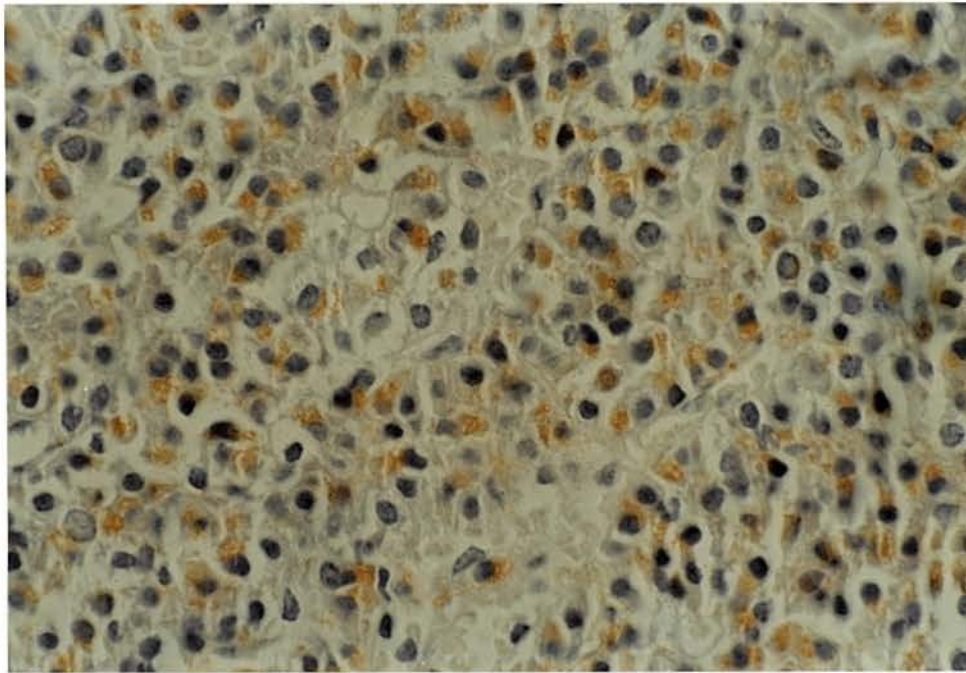
Com 14 dias de tratamento (duas administrações de 10, 50 ou 300 mcg de estradiol) não ocorreu alteração no peso da hipófise. Os níveis da PRL aumentaram em relação ao grupo controle, com as doses de 50 e 300 mcg. Quanto ao percentual de lactotrofos, houve aumento significativo nos grupos tratados com estrógeno, independente da dose. O efeito observado foi similar com as 3 doses utilizadas.

Com 21 dias de tratamento (três administrações de

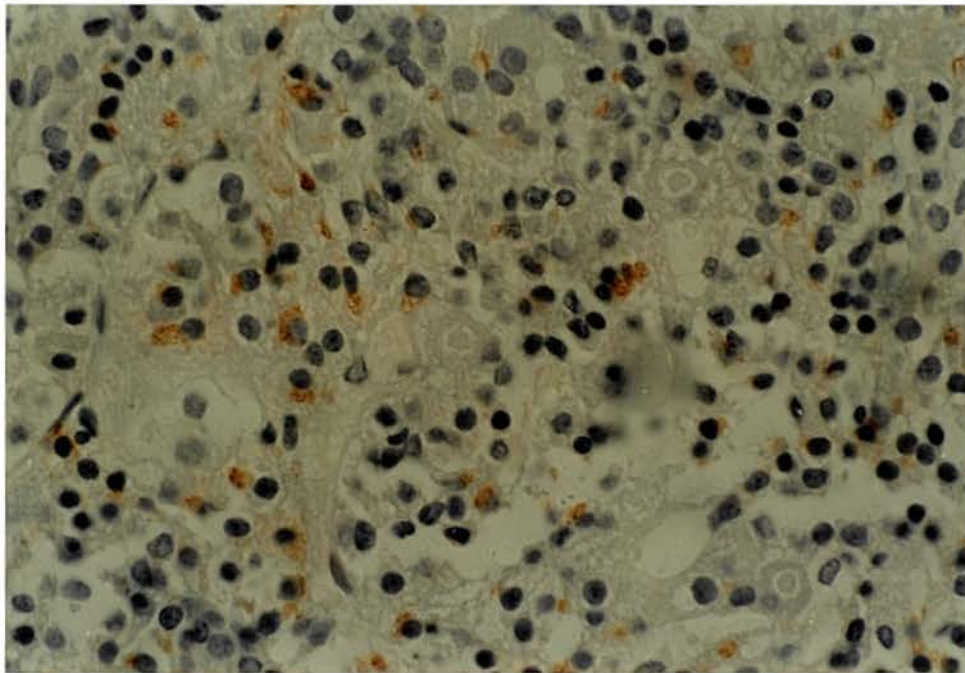
Figura 1 - Secções hipofisárias submetidas à técnica imuno-histoquímica para detecção de prolactina (coloração marrom), de ratas em diferentes condições estrogênicas, conforme especificado sob as fotos. (Objetiva 63x)



A. RATA COM 26 DIAS DE IDADE (SEXUALMENTE IMATURA)



B. RATA ADULTA INTACTA



C. RATA ADULTA OOFORECTOMIZADA

TABELA 2
 EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DE ESTRADIOL,
 EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES TEMPOS DE
 DURAÇÃO, SOBRE O PESO DA HIPOFISE, EM
 RATAS OOFORRECTOMIZADAS.

ESTRADIOL - mcg	PESO DA HIPOFISE - mg
14 dias de tratamento	
Controle	7,04 +/- 0,89 (3)
10	12,75 +/- 0,32 (3)
50	8,74 +/- 3,54 (2)
300	15,06 (1)
21 dias de tratamento	
Controle	7,85 +/- 0,93 (4)
10	5,88 +/- 2,05 (3)
50	8,86 +/- 1,81 (3)
300	9,26 +/- 2,14 (3)

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais.

TABELA 3

EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DE ESTRADIOL, EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES TEMPOS DE DURAÇÃO, SOBRE O NÍVEL DA PROLACTINA SÉRICA, EM RATAS OOFORRECTOMIZADAS.

ESTRADIOL - mcg	PROLACTINA - ng/ml
7 dias de tratamento	
Controle	4,78 +/- 0,19 (3)
10	4,12 +/- 0,52 (3)
50	22,73 +/- 16,47 (2)
300	23,16 +/- 8,17 (2)*
14 dias de tratamento	
Controle	7,04 +/- 2,33 (3)
10	8,74 +/- 2,87 (3)
50	16,60 +/- 2,39 (3)*
300	31,64 +/- 1,86 (2)*
21 dias de tratamento	
Controle	8,45 +/- 2,33 (4)
10	211,25 +/- 36,94 (3)*
50	551,37 +/- 56,49 (3)**
300	277,52 +/- 86,73 (3)*

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses o número de animais. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) ** Diferença significativa em relação ao controle e aos grupos tratados com 10 e 300 mcg. ($p < 0,05$).

TABELA 4

EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DE ESTRADIOL, EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES TEMPOS DE DURAÇÃO, SOBRE O PERCENTUAL DE LACTOTROFOS, EM RATAS OOFORECTOMIZADAS.

ESTRADIOL - mcg	LACTOTROFOS - %
7 dias de tratamento	
Controle	33,33 +/- 3,84 (3)
10	39,25 +/- 0,75 (2)
50	40,00 +/- 3,00 (2)
300	39,00 +/- 2,75 (3)
14 dias de tratamento	
Controle	30,00 +/- 0,57 (3)
10	43,16 +/- 0,92 (3)*
50	41,75 +/- 1,25 (2)*
300	45,75 +/- 1,25 (2)*
21 dias de tratamento	
Controle	32,12 +/- 2,72 (4)
10	46,83 +/- 2,96 (3)*
50	43,50 +/- 1,52 (3)*
300	45,33 +/- 0,92 (3)*

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

10, 50 ou 300 mcg de estradiol) também não foi observada alteração no peso da hipófise em relação ao grupo controle. O nível da PRL sérica foi significativamente maior nos animais tratados. Enquanto o aumento provocado pelas doses de 10 ou 300 mcg foi similar, a dose de 50 mcg determinou aumento significativamente maior que as demais. Quanto ao percentual de lactotrofos, as 3 doses induziram um aumento similar em relação ao grupo controle.

As Figuras 2 e 3 mostram, graficamente, o efeito do estrógeno sobre a PRL e os lactotrofos.

EXPERIMENTO 3 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina ou suas associações, sobre o peso da hipófise, prolactina sérica e percentual de lactotrofos, na vigência de estradiol.

O efeito das diferentes doses ou associações dos fármacos sobre o peso da hipófise, consta na Tabela 5; sobre o nível da PRL sérica na Tabela 6; e sobre o percentual de lactotrofos na Tabela 7. O tratamento ocorreu na vigência de 12 dias de estrógeno (duas administrações de 300 mcg, com intervalo de 7 dias). Os resultados dos tratamentos foram analisados em relação aos efeitos do estrógeno isolado.

O TAM, em todas as doses utilizadas, provocou redução significativa no peso da hipófise. As doses de 60 e 120 mcg reduziram significativamente a PRL sérica. O

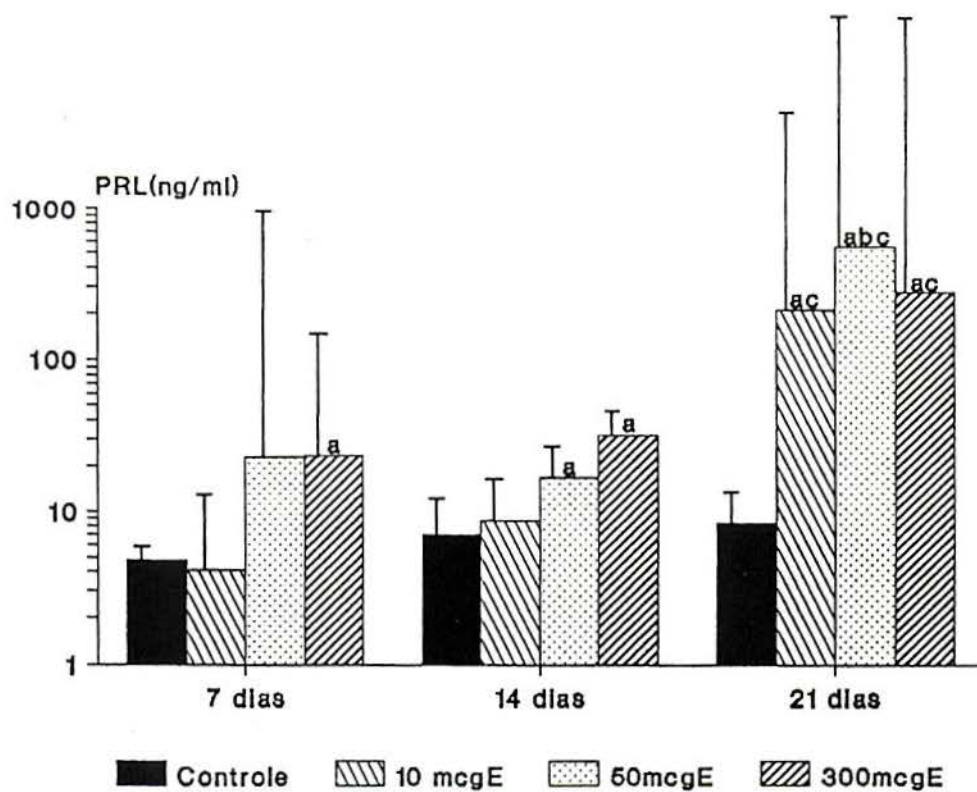


Figura 2 - Efeito de diferentes doses de estradiol sobre a prolactina sérica, em ratas ooforectomizadas. E = valerato de estradiol; a = $P < 0,05$ em relação ao controle; b = $P < 0,05$ em relação às doses de 10 e 300 mcg, 21 dias; c = $P < 0,05$ em relação a mesma dose, 7 e 14 dias. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

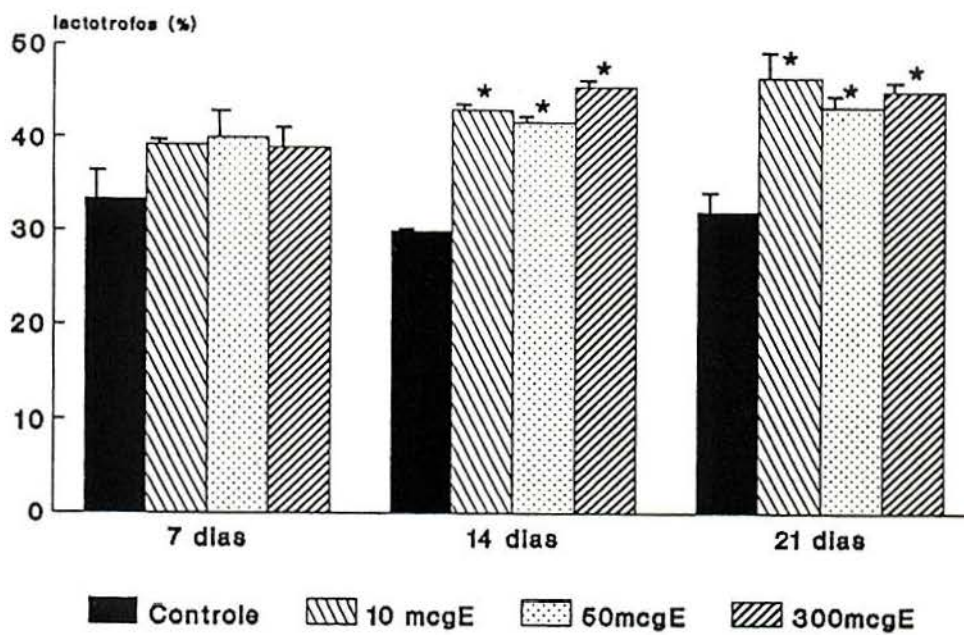


Figura 3 - Efeito de diferentes doses de estradiol sobre os lactotrofos, em ratas ooforectomizadas. E = valerato de estradiol; * $P < 0,05$ em relação ao controle. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

TABELA 5

EFEITOS DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA, BROMOCRIPTINA OU SUAS ASSOCIAÇÕES, SOBRE O PESO DA HIPOFISE, EM RATAS OOFORECTOMIZADAS, NA VIGÊNCIA DE ESTIMULO CURTO (12 DIAS) COM ESTRADIOL.

TRATAMENTO	PESO DA HIPOFISE - mg
ESTRADIOL (E)	16,51 +/- 1,73 (6)
E + TAMOXIFEN(TAM) 20 mcg	9,10 +/- 1,20 (6)*
E + TAM 60	6,30 +/- 1,24 (6)*
E + TAM 120	7,80 +/- 1,59 (6)*
E + NORETISTERONA(P) 0,1 mg	14,57 +/- 2,89 (4)
E + P 0,5	13,56 +/- 1,30 (6)
E + P 1,0	10,16 +/- 1,07 (6)*
E + BROMOCRIPTINA(BCP) 0,05 mg	11,35 +/- 1,61 (6)*
E + BCP 0,2	10,71 +/- 1,72 (6)*
E + BCP 0,6	8,78 +/- 1,44 (6)*
E + TAM 120 + P 0,5	11,23 +/- 1,52 (6)*
E + BCP 0,6 + TAM 120	8,15 +/- 0,70 (6)*
E + BCP 0,6 + P 0,5	10,96 +/- 0,81 (6)*

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação ao estradiol ($p < 0,05$).

TABELA 6

EFEITOS DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA, BROMOCRIPTINA OU SUAS ASSOCIAÇÕES, SOBRE A PROLACTINA SÉRICA, EM RATAS OOFORECTOMIZADAS, NA VIGÊNCIA DE ESTIMULO CURTO (12 DIAS) COM ESTRADIOL.

TRATAMENTO	PROLACTINA - ng/ml
ESTRADIOL (E)	335,88 +/- 96,12 (9)
E + TAMOXIFEN(TAM) 20 mcg	183,15 +/- 124,90 (5)
E + TAM 60	132,93 +/- 55,59 (5)*
E + TAM 120	133,02 +/- 10,38 (4)*
E + NORETISTERONA(P) 0,1 mg	116,78 +/- 41,17 (5)*
E + P 0,5	53,00 +/- 16,61 (7)*
E + P 1,0	171,46 +/- 37,11 (5)
E + BROMOCRIPTINA(BCP) 0,05 mg	28,95 +/- 12,64 (5)*
E + BCP 0,2	41,30 +/- 20,13 (3)*
E + BCP 0,6	54,83 +/- 1,22 (4)*
E + TAM 120 + P 0,5	57,17 +/- 23,92 (5)*
E + BCP 0,6 + TAM 120	20,16 +/- 5,47 (5)*
E + BCP 0,6 + P 0,5	7,59 +/- 0,77 (6)*

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação ao estradiol ($p < 0,05$).

TABELA 7

EFEITOS DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA, BROMOCRIPTINA OU SUAS ASSOCIAÇÕES, SOBRE O PERCENTUAL DE LACTOTROFOS HIPOFISARIOS, EM RATAS OOFORRECTOMIZADAS, NA VIGENCIA DE ESTIMULO CURTO (12 DIAS) COM ESTRADIOL.

TRATAMENTO	LACTOTROFOS - %
ESTRADIOL (E)	38,04 +/- 1,57 (5)
E + TAMOXIFEN(TAM) 120 mcg	39,50 +/- 0,72 (5)
E + NORETISTERONA(P) 0,5 mg	37,31 +/- 0,67 (5)
E + BROMOCRIPTINA(BCP) 0,6 mg	38,94 +/- 2,44 (5)
E + TAM + P	37,09 +/- 0,98 (5)
E + BCP + TAM	36,83 +/- 3,26 (4)
E + BCP + P	37,59 +/- 0,80 (5)

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais.

percentual de lactotrofos, avaliado com a dose de 120 mcg, não foi alterado.

O acetato de noretisterona diminuiu significativamente o peso da hipófise com a dose de 1,0 mg. Redução significativa nos níveis da PRL sérica foi observada com as duas menores doses (0,1 e 0,5 mg). Não foi observada alteração no percentual de lactotrofos com a dose utilizada de 0,5 mg.

A BCP reduziu significativamente o peso da hipófise com as doses de 0,05, 0,2 e 0,6 mg. Todas as doses provocaram também redução significativa nos níveis da PRL; não foi observada alteração no percentual de lactotrofos com a dose utilizada (0,6 mg).

Com relação à associação de fármacos (TAM + progestágeno/ BCP + TAM / BCP + progestágeno), todas foram eficazes em diminuir significativamente o peso da hipófise. O nível da PRL sérica foi igualmente reduzido por todos os tratamentos combinados, enquanto nenhum deles provocou alteração no percentual de lactotrofos.

Todas as associações que se mostraram eficazes em alterar significativamente algum dos parâmetros avaliados, o fizeram em grau similar entre si e em relação ao efeito observado com as drogas isoladas.

As Figuras 4 e 5 ilustram graficamente os efeitos dos tratamentos sobre o peso hipofisário e a PRL.

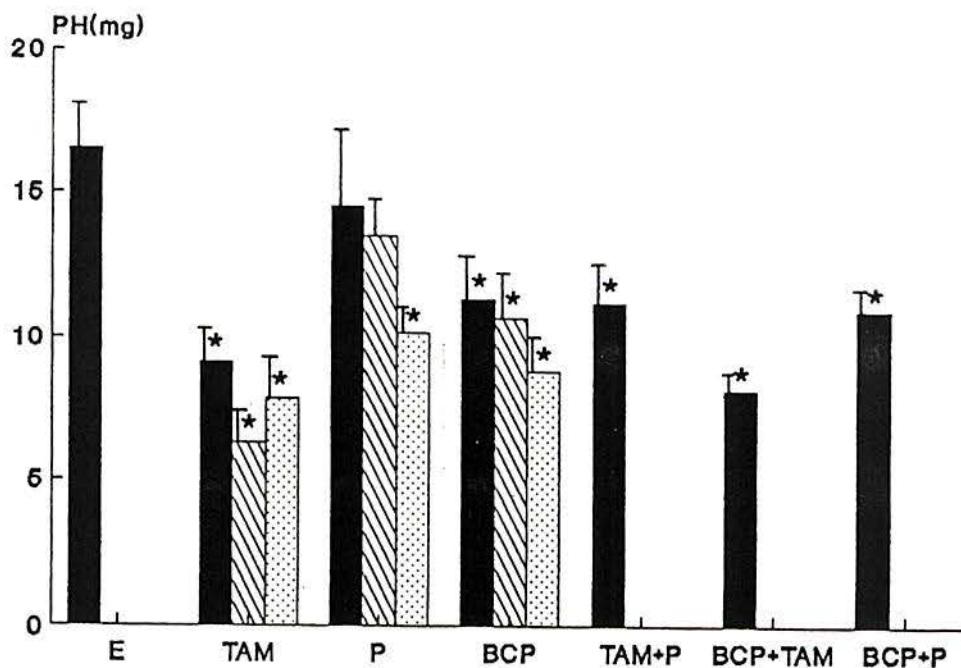


Figura 4 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina e suas associações, sobre o peso hipofisário, na vigência de estímulo estrogênico (12 dias), em ratas ooforectomizadas. E= valerato de estradiol; TAM= tamoxifen nas doses de 20, 60 e 120 mcg/dia; P = acetato de noretisterona nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/dia; BCP= bromocriptina nas doses de 0,05, 0,2 e 0,6 mg/dia; doses nas associações: TAM 120, P 0,5, BCP 0,6. * P<0,05 em relação ao controle. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

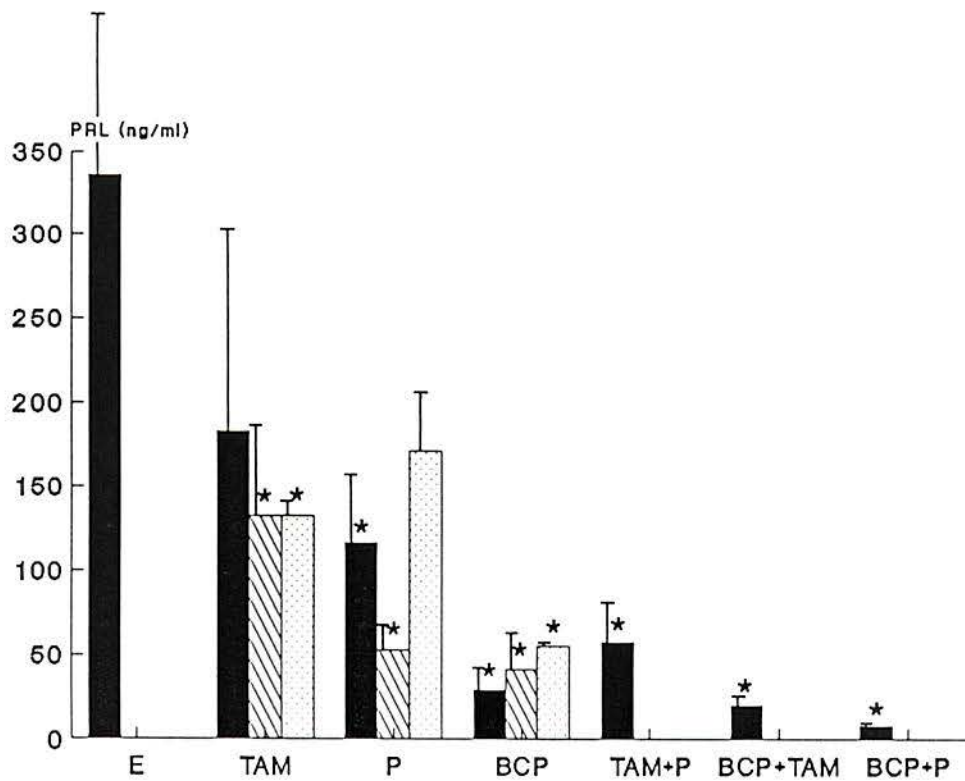


Figura 5 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina e suas associações, sobre a prolactina sérica, na vigência de estímulo estrogênico (12 dias), em ratas ooforectomizadas. Legendas e doses como na figura 4. * $P < 0,05$ em relação ao controle. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

EXPERIMENTO 4 - Efeitos hipofisários do tratamento prolongado com estradiol (50 dias).

A média do peso hipofisário nos animais ooforectomizados foi $10,04 \pm 1,41$ mg; o nível de PRL foi $3,52 \pm 0,61$ ng/ml e o percentual de lactotrofos $31,27 \pm 0,57$.

Nos animais tratados com estradiol o peso da hipófise foi $13,24 \pm 1,30$; o nível de PRL $100,97 \pm 30,04$ e o percentual de lactotrofos $40,66 \pm 0,89$.

A diferença entre os grupos foi significativa em relação aos níveis de PRL e o percentual de lactotrofos.

EXPERIMENTO 5 - Efeitos hipofisários do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina ou suas associações, sob estímulo prolongado com estradiol.

O efeito dos fármacos, isolados ou em combinação, sobre o peso da hipófise consta na Tabela 8; sobre os níveis da PRL sérica na Tabela 9; e sobre o percentual de lactotrofos na Tabela 10. O tratamento com estradiol totalizou 65 dias. Os resultados dos tratamentos foram analisados em relação aos efeitos do estrógeno isolado.

O TAM diminuiu significativamente o peso da hipófise, e não influiu nos níveis da PRL sérica nem no percentual de lactotrofos.

TABELA 8

EFEITOS DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA, BROMOCRIPTINA OU SUAS ASSOCIAÇÕES, SOBRE O PESO DA HIPOFISE, EM RATAS OOFORRECTOMIZADAS, SOB ESTIMULO PROLONGADO COM ESTRADIOL.

TRATAMENTO	PESO DA HIPOFISE - mg
ESTRADIOL (E)	14,26 +/- 1,35 (12)
E + TAMOXIFEN(TAM) 120 mcg	10,18 +/- 0,78 (10)*
E + NORETISTERONA(P) 0,5 mg	9,31 +/- 1,05 (8) *
E + BROMOCRIPTINA(BCP) 0,6 mg	9,58 +/- 0,80 (10)*
E + TAM + P	12,81 +/- 1,65 (10)
E + BCP + TAM	10,92 +/- 1,07 (9)
E + BCP + P	8,99 +/- 0,86 (10)*

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação ao estradiol ($p < 0,05$).

TABELA 9

EFEITOS DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA, BROMOCRIPTINA OU SUAS ASSOCIAÇÕES, SOBRE O NÍVEL DA PROLACTINA SÉRICA, EM RATAS OOFORRECTOMIZADAS, SOB ESTÍMULO PROLONGADO COM ESTRADIOL.

TRATAMENTO	PROLACTINA - ng/ml
ESTRADIOL (E)	66,94 +/- 12,88 (13)
E + TAMOXIFEN(TAM) 120 mcg	52,65 +/- 9,00 (10)
E + NORETISTERONA(P) 0,5 mg	30,27 +/- 8,58 (9) *
E + BROMOCRIPTINA(BCP) 0,6 mg	22,23 +/- 2,73 (10)*
E + TAM + P	53,27 +/- 18,24 (9)
E + BCP + TAM	16,31 +/- 2,43 (9) *
E + BCP + P	11,68 +/- 1,30 (10)*

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação ao estradiol ($p < 0,05$).

TABELA 10

EFEITOS DO TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA, BROMOCRIPTINA OU SUAS ASSOCIAÇÕES, SOBRE O PERCENTUAL DE LACTOTROFOS, EM RATAS OOFORECTOMIZADAS, SOB ESTIMULO PROLONGADO COM ESTRADIOL.

TRATAMENTO	LACTOTROFOS - %
ESTRADIOL (E)	41,10 +/- 1,24 (10)
E + TAMOXIFEN(TAM) 120 mcg	38,33 +/- 1,01 (6)
E + NORETISTERONA(P) 0,5 mg	35,00 +/- 0,97 (6) *
E + BROMOCRIPTINA(BCP) 0,6 mg	34,00 +/- 0,95 (6) *
E + TAM + P	37,77 +/- 0,72 (6) *
E + BCP + TAM	35,22 +/- 0,81 (6) *
E + BCP + P	34,22 +/- 0,91 (6) *

Os valores representam média e erro padrão. Entre parênteses, o número de animais. * Diferença significativa em relação ao estradiol ($p < 0,05$).

O acetato de noretisterona diminuiu significativamente o peso da hipófise, os níveis da PRL e o percentual de lactotrofos.

A BCP igualmente diminuiu de maneira significativa o peso da hipófise, os níveis da PRL e o percentual de lactotrofos.

Em relação às associações, a combinação de TAM com o progestágeno se contrapôs ao efeito estimulatório do estradiol sobre o percentual de lactotrofos; com BCP mais TAM houve redução significativa nos níveis da PRL sérica e no percentual de lactotrofos; e com a associação de BCP mais progestágeno houve redução em todos os parâmetros observados.

As Figuras 6, 7 e 8 representam graficamente o efeito desses diferentes tratamentos sobre o peso hipofisário, a PRL e os lactotrofos.

Na Figura 9, a fotomicroscopia de secções hipofisárias submetidas à imuno-histoquímica, mostra o resultado dos diferentes tratamentos prolongados sobre os lactotrofos.

A correlação entre a PRL sérica e os lactotrofos no grupo tratado com estrógeno foi fraca ($r = 0,52$), inexistente no grupo da BCP ($r = 0,02$) e fraca, negativa, no grupo do progestágeno ($r = -0,53$).

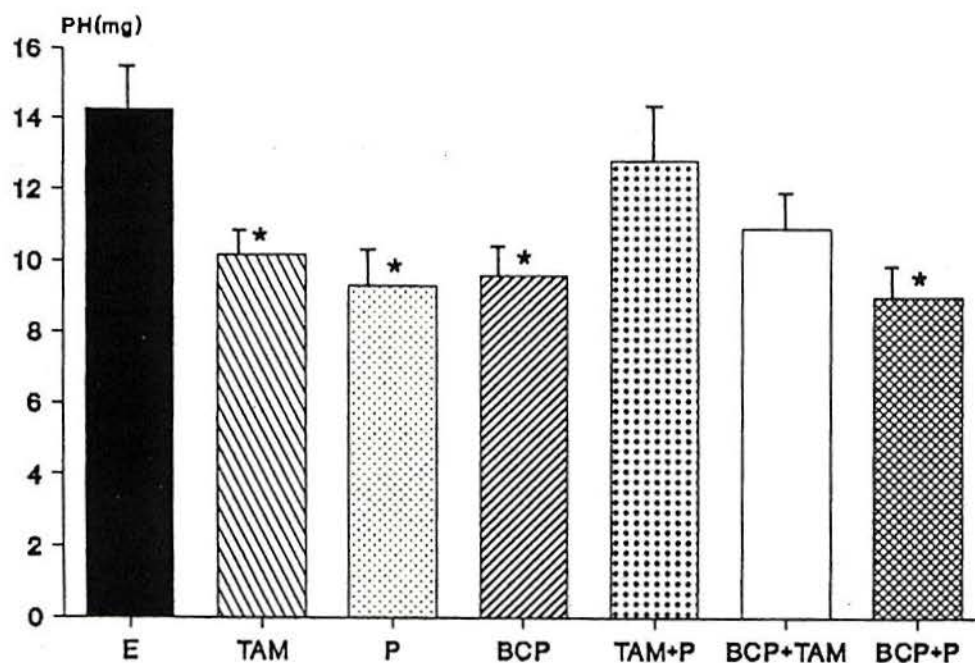


Figura 6 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina e suas associações na vigência de estímulo estrogênico prolongado (65 dias), sobre o peso da hipófise, em ratas ooforectomizadas. E= valerato de estradiol (300 mcg/ semana); TAM= tamoxifen (120 mcg/ dia); P= acetato de noretisterona (0,5 mg/ dia); BCP= bromocriptina (0,6 mg/ dia). *P<0,05 em relação ao controle. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

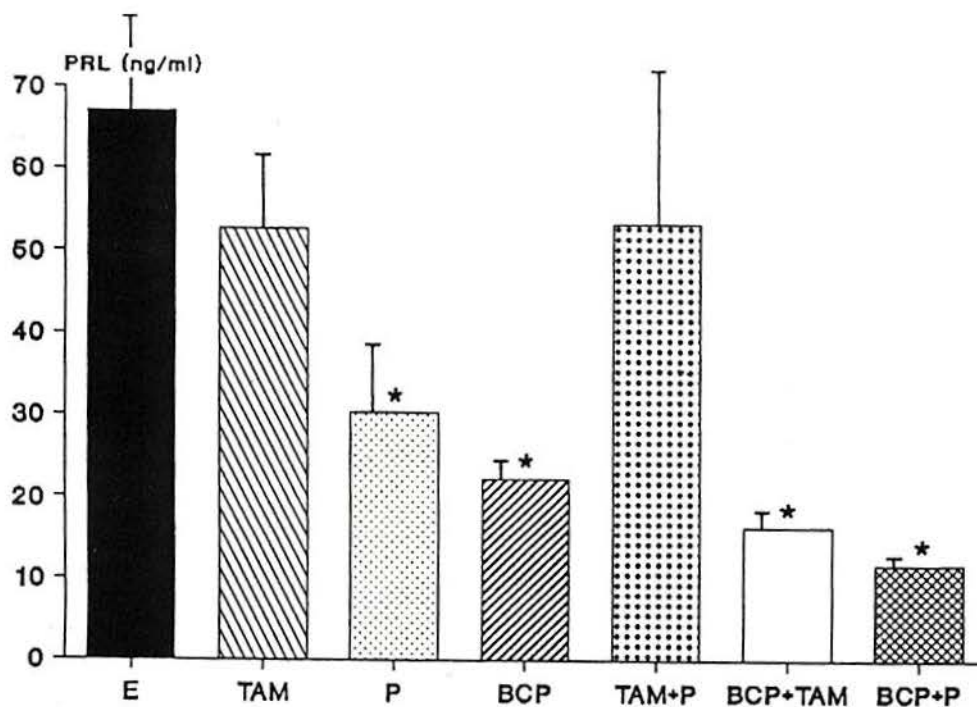


Figura 7 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina e suas associações na vigência de estímulo estrogênico prolongado (65 dias), sobre a prolactina sérica, em ratas ooforectomizadas. Legendas como na figura 6. * $P < 0,05$ em relação ao controle. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

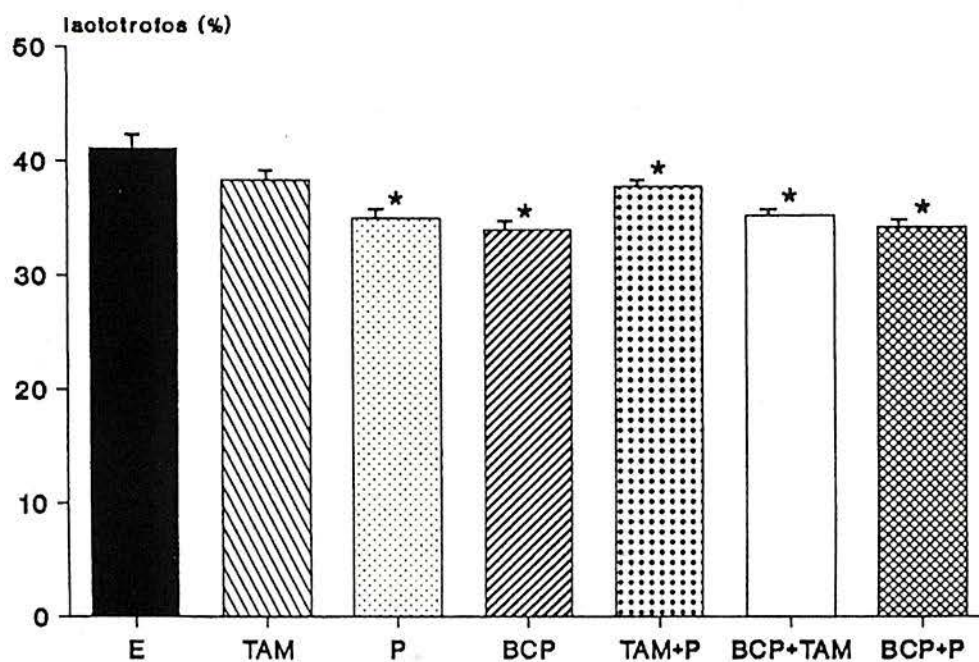
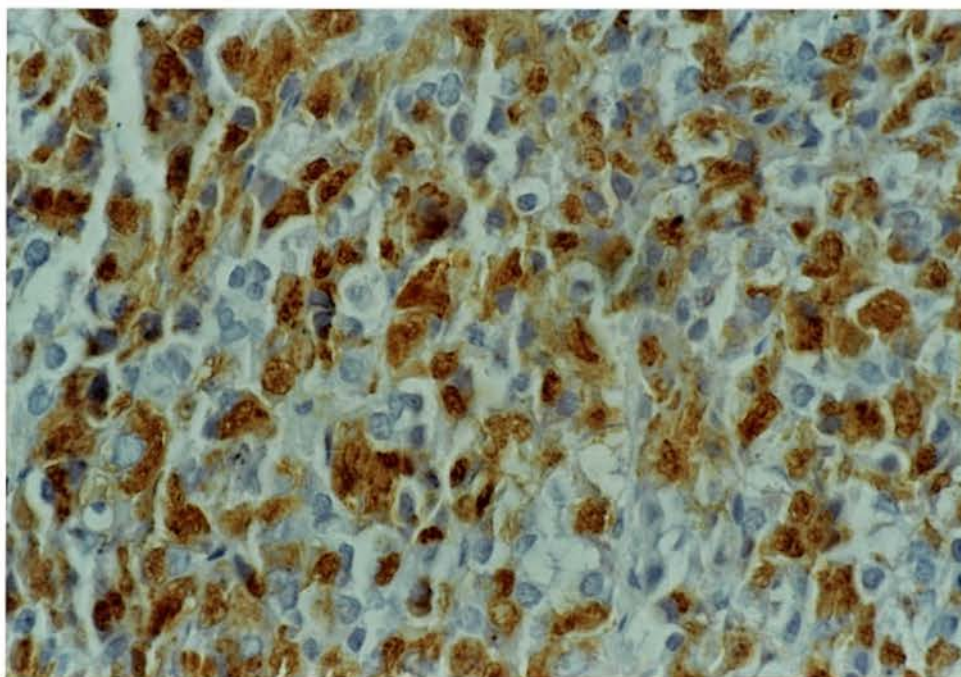
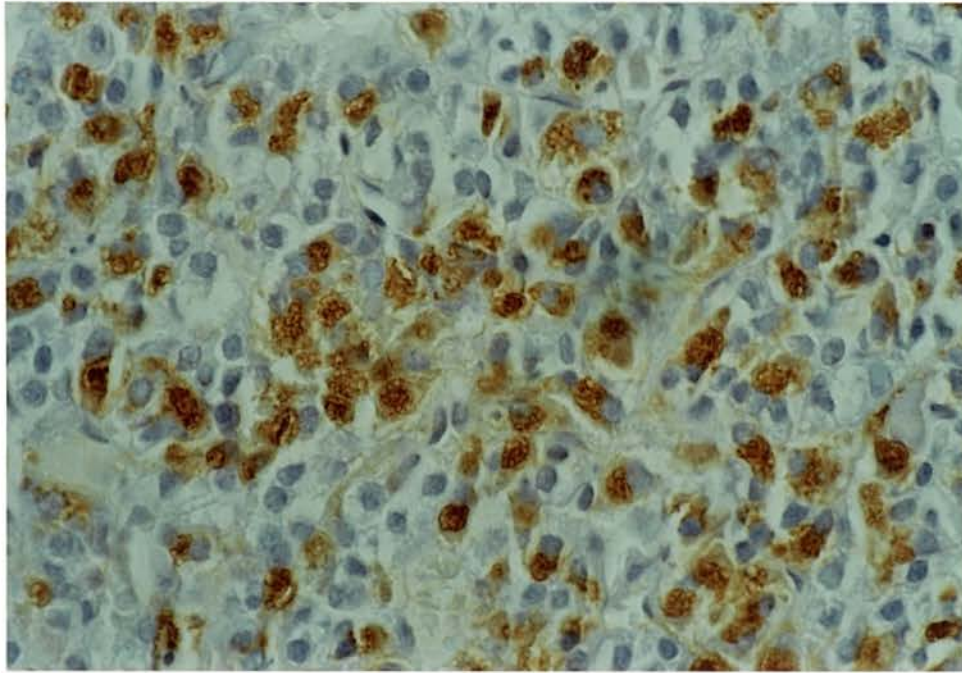


Figura 8 - Efeitos do tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina e suas associações, na vigência de estímulo estrogênico prolongado (65 dias), sobre os lactotrofos, em ratas ooforectomizadas. Legendas como na figura 6. * $P < 0,05$ em relação ao controle. A linha vertical sobre as barras representa a fração positiva do erro padrão.

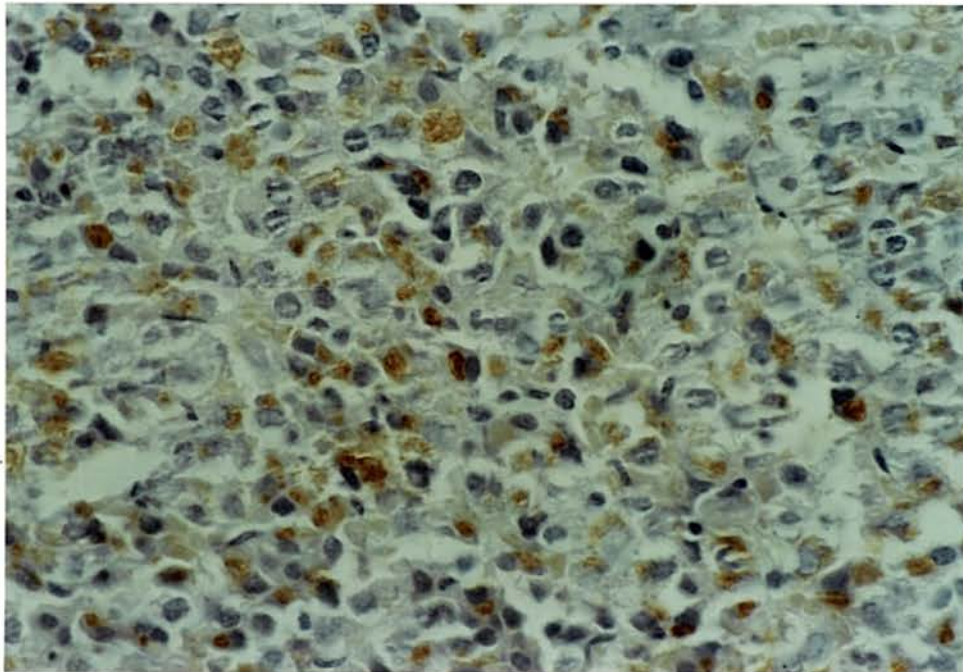
Figura 9 - Cortes hipofisários de ratas adultas ooforectomizadas, submetidos à técnica imuno-histoquímica para detecção de prolactina (coloração marrom). Objetiva 63x. A. Tratamento prolongado (65 dias) com estradiol. B,C,D,E,F e G. Tratamento concomitante de estradiol e tamoxifen, acetato de noretisterona, bromocriptina ou suas associações, conforme especificado sob as fotos.



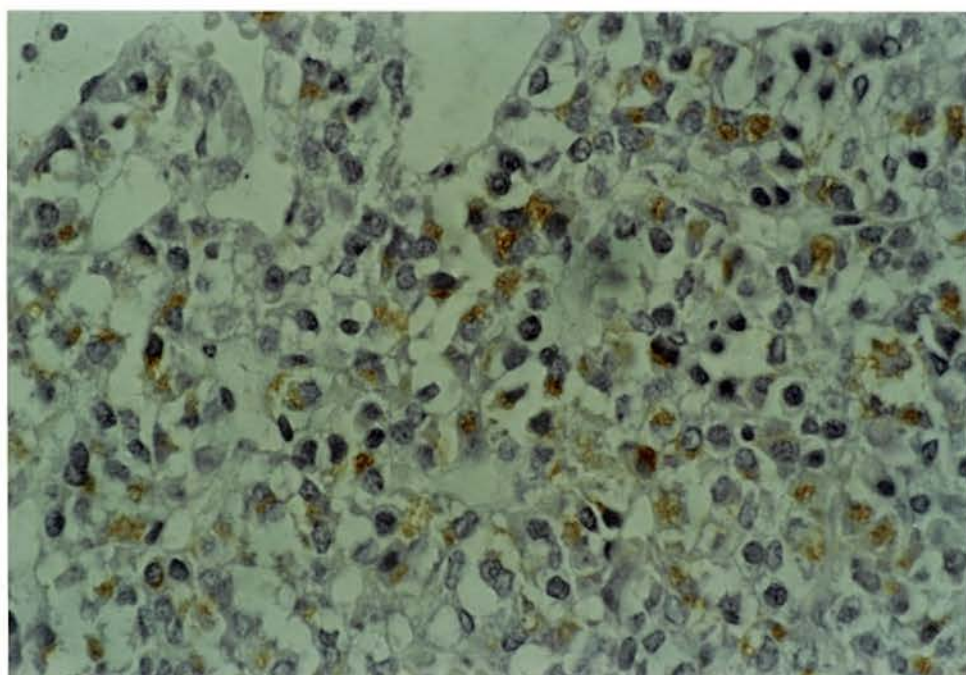
A. ESTRADIOL



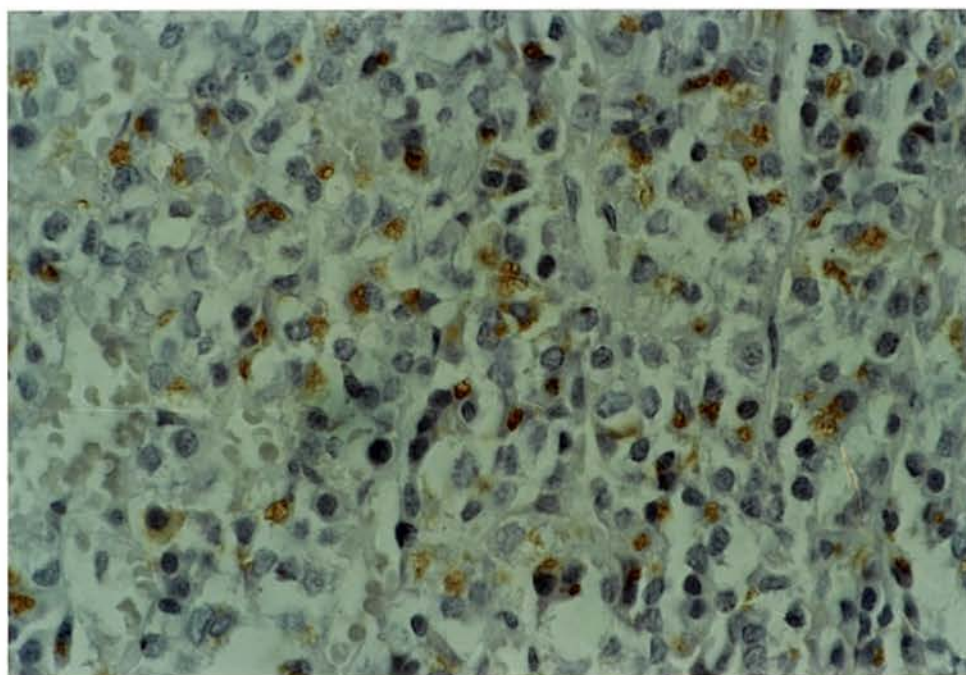
B. TAMOXIFEN



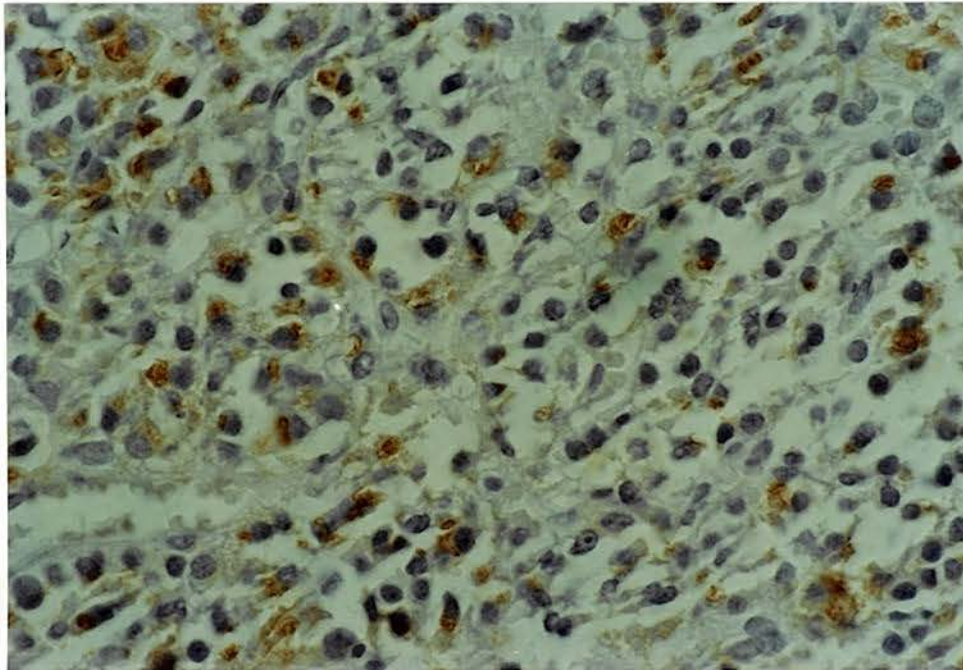
C. ACETATO DE NORETISTERONA



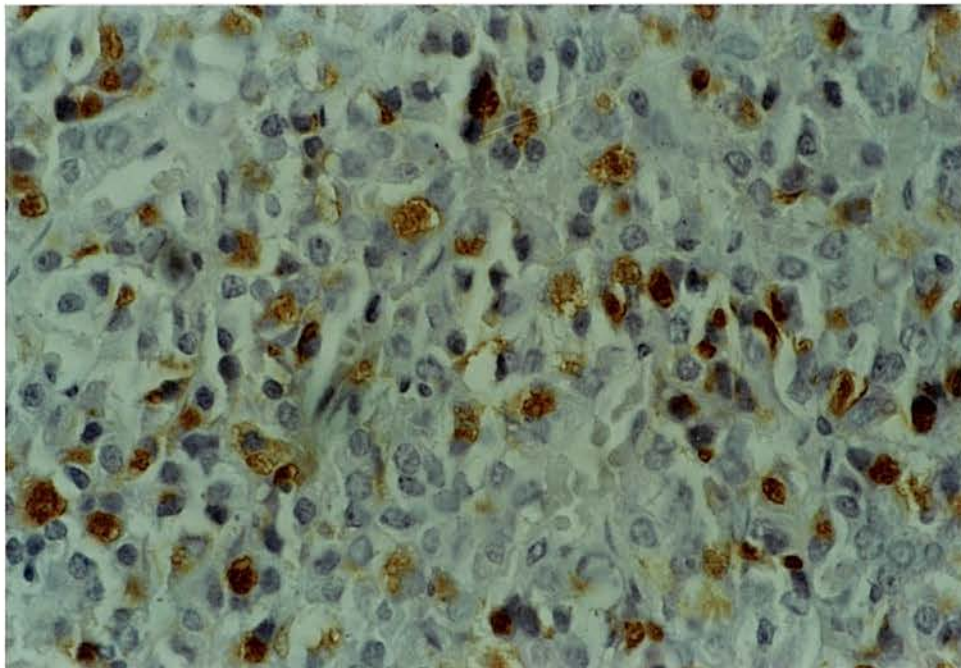
D. BROMOCRIPTINA



E. BROMOCRIPTINA + TAMOXIFEN



F. BROMOCRIPTINA + ACETATO DE NORETISTERONA



G. TAMOXIFEN + ACETATO DE NORETISTERONA

4. DISCUSSÃO.

4.1. REPERCUSSÕES HIPOFISARIAS DO ESTROGENO ENDOGENO

Embora exista um volume apreciável de informações sobre o peso hipofisário, os níveis de PRL sérica e sobre os lactotrofos de ratos, nem todos esses parâmetros foram avaliados em diferentes condições estrogênicas, em ratas de linhagem Wistar. Assim, nosso primeiro objetivo foi o de estabelecer valores referenciais para estes parâmetros, em ratas Wistar de nosso laboratório, em idade pré-puberal, adultas, ou na vigência de ooforectomia. Antes da discussão dos achados, é necessário enfatizar que foram afastadas outras variáveis conhecidas que poderiam interferir nessa avaliação. O primeiro cuidado foi com a faixa etária dos animais adultos utilizados, já que todos os parâmetros observados variam com a idade. Com o envelhecimento, considerado em geral a partir dos 22 meses de idade, o peso da hipófise pode aumentar (SARKAR e cols., 1982; GOLDMAN e cols., 1988), por hiperplasia de lactotrofos (BERKVENS e cols., 1980; KOVACS e cols., 1980; TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1983; CHUKNYISKA e cols., 1986), ou mesmo pela presença de tumores espontâneos (KOVACS e cols., 1977; BERKVENS e cols., 1980; TROUILLAS e cols., 1982). Também é conhecido o aumento na secreção de PRL com a idade, tanto em fêmeas (SHAAR e cols., 1975; KOVACS e cols., 1980; DEMAREST e cols., 1982;

SARKAR e cols., 1982; WISE, 1982) como em machos (DEMAREST e cols., 1985; GOLDMAN e cols., 1988), embora eventualmente esta diferença não tenha sido encontrada (VAN PUTTEN e KILIAAN, 1988). Nesta situação, a hiperprolactinemia pode resultar de alteração dopaminérgica hipotalâmica (SARKAR e cols., 1982), de alteração na dinâmica dopaminérgica intraglandular (DEMAREST e cols., 1982), da hiperplasia dos lactotrofos, ou mesmo de modificação funcional destas células, como o aumento na capacidade de secreção (CHUKNYISKA e cols., 1986). Neste trabalho, a idade máxima dos animais se encontra na faixa classificada como de ratos adultos jovens, estando excluído este viés.

A liberação da PRL, por sua vez, está sujeita a outras interferências como, por exemplo, a presença de ritmo circadiano. Segundo MATTHEIJ e SWARTS (1978), os níveis de PRL no rato são mais baixos entre 7 e 15 horas, aumentam entre 15 e 20 horas, e são flutuantes no período da noite. O período das 7 às 15 horas, que parece ser o mais estável e propício à experimentação (MATTHEIJ e SWARTS, 1978) foi aqui utilizado para a coleta de sangue. Outra variável é o estresse, o qual provoca elevação nos níveis da PRL, sem comprometer seu ritmo (DUNN e cols., 1972). Além das formas clássicas de estresse, como alteração de luz ou temperatura, anestesia com éter, imobilização, laparotomia e sangramento, a própria manipulação experimental, como a retirada do animal da gaiola e seu manuseio por 5 segundos, ou a mudança de ambiente por 3 minutos, podem elevar

agudamente os níveis de PRL (SEGGIE e BROWN, 1975). Neste experimento, a remoção do animal para o sacrifício foi feita com o menor distúrbio possível para os que permaneciam na gaiola, na tentativa de minimizar o "efeito do sacrifício sequencial", onde a remoção de um animal de seu grupo elevaria o nível de PRL dos restantes (FELICIO e cols., 1988).

Neste experimento, o peso médio da hipófise total de ratas adultas foi $7,4 \pm 0,65$ mg. O peso médio da hipófise anterior de ratas da mesma idade, avaliado em grupos-controle na literatura, oscila entre $9,3 \pm 0,3$ mg (SARKAR e cols., 1982) e $10,9 \pm 0,9$ mg (PRYSOR-JONES e cols., 1988) na cepa Wistar-Furth, enquanto na cepa Wistar-TW o peso total da hipófise é $5,7 \pm 0,2$ mg (TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1983). Nos estudos citados, assim como nesse, não foi levado em conta o período do ciclo estral, embora esteja referido que o peso no estro é maior que no diestro (BLAKE e cols., 1972). O peso médio da hipófise total de ratos machos Wistar-TW é $5,0 \pm 0,3$ mg (TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1983), da hipófise anterior da ratos machos Wistar é $6,7 \pm 0,46$ ou $8,11 \pm 0,66$ mg (SCHREIBER e cols., 1987) e da hipófise total de ratos da mesma cepa é $7,5 \pm 0,3$ ou $7,8 \pm 0,9$ mg (JAHN e cols., 1982). Embora alguns desses valores sejam aparentemente menores que alguns valores citados para fêmeas, em nosso laboratório o peso da hipófise total de machos, pareados por idade, varia entre $7,12 \pm 0,62$

(OLIVEIRA, 1989) e $8,11 \pm 0,5$ mg (dados não publicados), não apresentando diferença significativa em relação às fêmeas.

Nas ratas pré-puberais (25 dias) o peso da hipófise foi significativamente menor que o de ratas adultas. Na observação de VOOGT e cols. (1970), o peso da hipófise anterior em ratas Sprague-Dawley de 26 dias ($2,4 \pm 0,1$ mg) foi significativamente menor que o de ratas de 2-3 meses em estro ($11,8 \pm 0,6$ mg).

Os valores aqui observados em ratas ooforectomizadas há 30 dias não diferiu significativamente do peso da hipófise das adultas. Aproximadamente 30 dias após ooforectomia, o peso da hipófise total relatado em ratas da cepa Fischer é $13,0 \pm 1,0$ mg (EL-AZOUZI e cols., 1990), e 21 dias após a castração é $12,2 \pm 0,7$ mg (ELIAS e WEINER, 1984), enquanto nas Sprague-Dawley, 14 dias após a castração, o peso médio da hipófise anterior é $12,2 \pm 0,4$ mg (CHEN e MEITES, 1970). Nessas observações não consta o peso hipofisário de ratas da mesma idade intactas, para que possa ser avaliado o efeito da ooforectomia. Para BLAKE e cols. (1972), a castração também não interferiu com o peso da hipófise, quando esse foi avaliado 4 a 6 semanas após a ooforectomia. Não está afastada, porém, a possibilidade de alteração em períodos mais precoces.

Nas ratas adultas, a liberação de PRL é significativamente maior durante o estro e o proestro que no

diestro, tanto "in vitro" (SAR e MEITES, 1967) como "in vivo" (AMENOMORI e cols., 1970). Aumento acentuado nesses valores é visto especialmente na tarde e noite do proestro (BLAKE e cols., 1972), período em que ocorre a secreção máxima de estrógeno (YOSHINAGA e cols., 1969). Nesse experimento, o nível de PRL sérica encontrado nas ratas imaturas, foi significativamente menor que nas adultas, o que vai ao encontro dos achados de VOOGT e cols. (1970), que relataram níveis baixos de PRL antes da puberdade, seguido por aumento agudo no dia da abertura vaginal e declinando após. Os valores de PRL aqui observados em ratas ooforectomizadas é igualmente menor que o das ratas adultas. Esses dados repetem os achados de AMENOMORI e cols. (1970), BLAKE e cols. (1972), SHAAR e cols. (1975), TAKAHASHI e KAWASHIMA (1982) e JAHN e DEIS (1986). Recentemente foi demonstrado que, 14 dias após a ooforectomia, há diminuição de aproximadamente 55% nos níveis de mRNA PRL hipofisária (TONG e cols., 1989). Segundo GALA e BOSS (1975) os níveis mais baixos de PRL das ooforectomizadas em relação aos controles, são vistos entre os dias 6 e 14 pós-ooforectomia, e esse efeito não seria mais detectado entre 28 e 48 dias. Esse intervalo para normalização dos níveis prolactinêmicos deve ser contestado, tendo em vista nossos achados e de outros autores (BLAKE e cols., 1972; TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1982; JAHN e DEIS, 1986).

O percentual de lactotrofos hipofisários, avaliado através de medidas objetivas, foi estudado por poucos autores. Em ratos machos adultos jovens, o percentual de lactotrofos é $10,5 \pm 0,7$ na cepa Wistar-TW (TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1983), 26,0 (PÉREZ e cols., 1986) ou $21,7 \pm 1,4$ em ratos Wistar (OLIVEIRA, 1989). A diferença marcada entre os achados do primeiro autor e os demais poderia refletir diferenças entre as cepas, ou diferenças metodológicas, tanto em relação à técnica utilizada no estudo imuno-histoquímico, como no estudo morfométrico. Em fêmeas, o percentual relatado para esta faixa etária é $27,9 \pm 1,6$ (TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1983), 29,8 em fêmeas Fisher 344 ooforectomizadas (PHELLPS e HYMER, 1988) e, em suspensão de células hipofisárias, $27,7 \pm 0,6$ ou $29,0 \pm 0,8$ (CHUKNYISKA e cols., 1986). Esse percentual não varia conforme o ciclo estral (TAKAHASHI e KAWASHIMA, 1983; CHUKNYISKA e cols., 1986). Os achados atuais confirmam a maior proporção de lactotrofos nas fêmeas adultas, o que também foi observado por LEONG e cols. (1975) em células em cultura (39% de lactotrofos em fêmeas, contra 15% em machos). A diferença entre os sexos pode ser devida a ritmos distintos na atividade mitótica (TAKAHASHI e cols., 1984).

Em nossos dados, o percentual de lactotrofos é significativamente menor nas ratas sexualmente imaturas em relação às adultas. Em fêmeas Wistar-Imamichi com 20 dias de idade, esse percentual também é pequeno, da ordem de $13,5 \pm 1,4$, segundo NOGAMI (1984). Da mesma forma, TAKAHASHI e

KAWASHIMA (1982) observaram ao microscópio eletrônico um número maior de células de PRL aos 90 dias de idade, em comparação aos 30 dias.

A ooforectomia diminuiu significativamente o percentual de lactotrofos, conforme anteriormente observado por TAKAHASHI e KAWASHIMA (1983), que constataram redução desse número para $10,6 \pm 0,6$ com a idade de 12 meses, tendo a ooforectomia sido realizada entre os 3 e os 30 dias. O índice mitótico (número de mitoses por milímetro quadrado) tanto dos lactotrofos como das demais células hipofisárias diminuem pós-ooforectomia (TAKAHASHI e cols., 1984). A ausência de variação no número de lactotrofos após a ooforectomia no estudo de CHUKNYISKA e cols. (1986) pode ser justificada pelo curto intervalo entre esse procedimento e a hipofisectomia (3 dias). Além das alterações quantitativas nas células produtoras de PRL, a castração induz importantes alterações morfológicas nos diferentes tipos de lactotrofos (TONG e cols., 1990). Segundo BAKER e cols. (1973), o volume dos lactotrofos diminui pós-ooforectomia; avaliação desse parâmetro não foi objetivo do trabalho atual.

4.2. EFEITOS HIPOFISARIOS DO ESTROGENO EXOGENO

Sob ação do estrógeno, um estimulador da função secretória e da replicação dos lactotrofos, o peso da hipófise aumenta, atingindo valores máximos na presença de tumores induzidos (SELYE e cols., 1935). O peso da hipófise

pode aumentar em função de vários fatores, entre os quais estão a hipertrofia celular (McCOMB e cols., 1981; CASANUEVA e cols., 1982), o aumento do conteúdo de PRL armazenada (KIINO e DANNIES, 1981) e a proliferação vascular (NIWA e cols., 1987). Outra possibilidade seria o acúmulo de líquido na hipófise, à semelhança do que ocorre no útero sob estímulo estrogênico (FURR e JORDAN, 1984). No entanto, o fator preponderante é a proliferação dos lactotrofos, conforme será discutido adiante.

É possível, às vezes, constatar aumento no peso da hipófise com estímulos de curta duração. O intervalo necessário para essa observação depende da suscetibilidade hipofisária à ação estrogênica, a qual varia de acordo com a cepa. Assim, utilizando implante de estrógeno em duas cepas com sensibilidade francamente oposta a este esteróide, não foi detectado aumento significativo no peso hipofisário após 8 semanas de tratamento em ratos Holtzman (WIKLUND e cols., 1981), enquanto ratos Fischer 344 já exibiam essa alteração 7 dias (HATALA e POWERS, 1988) ou 10 dias após o implante (ELIAS e WEINER, 1984; SCHECHTER e cols., 1987). Também utilizando implante de estradiol, em ratos Sprague-Dawley, VAN NESSELROOIJ e cols. (1991) detectaram aumento de volume hipofisário, avaliado através da ressonância magnética, já a partir do nono dia de tratamento.

Em nosso experimento, nenhuma das doses utilizadas de valerato de estradiol foi suficiente para provocar aumento do peso hipofisário, em avaliação feita 7 dias após

a administração única. Esse resultado não confirma os achados de JAHN e cols. (1982), que observaram aumento no peso hipofisário de ratos machos, utilizando undecanoato de estradiol, na mesma dose e via, e com o mesmo intervalo entre a aplicação da droga e a avaliação do resultado. Ainda com aplicação única de estrógeno, foi constatado aumento no peso da hipófise 7 dias após 10 mg de éster de dietilestilbestrol (LLOYD e cols., 1978), ou mesmo tão precocemente como 18 horas após 10 mg de dietilestilbestrol (JACOBI e cols., 1977). Estes autores não detectaram, no mesmo período, nem aumento na concentração de PRL hipofisária, nem aumento na síntese de DNA.

No presente estudo, a repetição semanal da droga, em diferentes doses, em tratamentos de até 21 dias, igualmente não interferiu com o peso hipofisário. Aumento aproximado de 76% no peso da hipófise entre o sétimo e o vigésimo primeiro dia de tratamento com estrógeno em moldes similares ao nosso, foi observado por JAHN e cols. (1982). Também SCHREIBER e cols. (1987) observaram aumento no peso da hipófise após 3 semanas de administração de benzoato de estradiol a ratos machos, embora a dose semanal utilizada (2 mg) tenha sido expressivamente maior. Ainda com relação a administrações múltiplas de benzoato de estradiol (4 a 6, diárias), em fêmeas ooforectomizadas, houve aumento no peso da hipófise, com doses de 0,1 a 500 mcg, em ratas ooforectomizadas (CHEN e MEITES, 1970), e com doses de 0,1 a 5 mcg em ratas sexualmente imaturas (VOOGT e cols., 1970).

Para explicar as diferenças entre os achados da literatura e os atuais, pode se questionar as diferentes cepas (com implicações já discutidas anteriormente) e sexo dos animais. Numa das mais precoces observações sobre o efeito de grandes doses de estrógeno sobre a hipertrofia do lobo anterior da hipófise, já está assinalado que essa alteração é menos marcada tanto em ratas castradas como em ratos machos (McEUEEN e cols., 1936). O número de animais aqui utilizados na curva dose-efeito do estradiol, em diferentes tempos de tratamento, pode ter sido um dos fatores a impedir a observação de um resultado positivo nas ratas tratadas com estrógeno em relação às ratas ooforectomizadas-controle. Com a administração prolongada de estrógeno (50 dias), o aumento no peso da hipófise não foi suficiente para ter significância (experimento 4). Ele mostrou, no entanto, tendência a uma elevação progressiva, conforme observado com mais 15 dias de tratamento com estradiol (experimento 5). Após a administração prolongada de estrógeno (60 dias) a ratos machos Wistar, está relatado aumento significativo do peso hipofisário (OLIVEIRA, 1989). Segundo LYLE e cols. (1984), o aumento do peso hipofisário em animais com implante de estrógeno mostra correlação positiva com o tempo de tratamento ($r=0,69$), enquanto em ratos adultos não tratados, esse peso não aumenta com o tempo.

Elevação da PRL sérica pode ser detectada no rato 6 horas após a administração de dietiestilbestrol (JACOBI e

cols., 1977), ou mesmo 4 horas após 17betaestradiol (MURAI e BEN-JONATHAN, 1990). Dose-dependência da resposta da PRL ao estradiol está descrita em células hipofisárias normais em cultura (LIEBERMAN e cols., 1978; WEST e DANNIES, 1980), células tumorais em cultura (TATE e cols., 1984), e "in vivo" para doses abaixo de 1 mcg (VOOGT e cols., 1970; CALIGARIS e cols., 1974) ou até 5 mcg (CHEN e MEITES, 1970; SHAAR e cols., 1975; POWERS e cols., 1989). Nossos achados em relação à curva dose-efeito do estradiol sobre os níveis de PRL sérica, sendo a PRL dosada 7 dias após aplicação única de valerato de estradiol, foram positivos com a dose de 300 mcg, isto é, houve aumento significativo em relação aos controles. Do mesmo modo, também houve aumento significativo nos níveis de PRL nos animais que receberam 14 dias de tratamento (2 aplicações com intervalo de 7 dias), com as doses de 50 e 300 mcg. É necessária cautela na interpretação desses dados. Com a dose de 50 mcg, em 7 dias de tratamento, o aumento observado pode não ter obtido nível de significância devido à grande variabilidade nos níveis de PRL, achado comum na experiência de outros autores (REIER e cols., 1974; DALL'ARA e cols., 1988; VAN NESSELROOIJ e cols., 1991), que não foi atenuada pela observação de um número elevado de animais. Em segundo lugar, a farmacocinética da droga utilizada pode ter interferido com o resultado. Utilizando valerato de estradiol em ratos, na dose subcutânea de 400 mcg/100 g de peso corporal (maior que o dobro da dose máxima aqui utilizada), SEO e cols.

(1979) observaram pico sérico de estradiol em aproximadamente 12 horas, e níveis ainda elevados 48 horas após; também com dose única de benzoato de estradiol há liberação da droga pelo menos por 2-3 dias (POWERS e cols., 1989). Utilizando 5 mcg de benzoato de estradiol em ratas ooforectomizadas, CALIGARIS e cols. (1974) observaram valores altos de PRL sérica pelo menos até o quarto dia após a injeção. Essa constatação é válida para o sangue coletado à tarde, sendo os valores máximos de PRL vistos às 16 horas. Neste período, 0,3 mcg de benzoato de estradiol já são suficientes para estimular a secreção, e a resposta é crescente até a dose de 1 mcg; se o sangue for coletado às 11 horas, aumento na PRL só é observado com a dose de 20 mcg (CALIGARIS e cols., 1974). O intervalo aqui utilizado entre a aplicação do estrógeno e a coleta do soro para dosagem de PRL pode ter sido demasiado para a observação de alteração na PRL após uma única aplicação, com a dosagem sendo feita pela manhã. Um dado que contraria a ponderação acima, é o achado de JAHN e cols. (1982), que observaram, em ratos machos, elevação da PRL sérica 8 dias após 300 mcg de undecanoato de estradiol. A secreção de PRL pós-estradiol em ratos machos é menor que nas fêmeas, segundo estudo "in vivo" de CALIGARIS e cols. (1974) e maior em células em cultura, conforme HOFFLAND e cols. (1987). Já aos 21 dias de tratamento, observamos aumento significativo nos níveis de PRL com todas doses utilizadas, num efeito que pode estar relacionado à obtenção de um nível sérico estável de

estradiol, ou a um estímulo secundário da droga (animais previamente expostos). Nesta situação, já foi observado acúmulo maior e mais rápido de mRNA PRL, embora os padrões séricos de estrógeno sejam quase idênticos entre os animais sob estímulo secundário e estímulo primário (não expostos previamente ao hormônio) (SEO e cols., 1979). Possível explicação para a diferença de resposta a estes estímulos, seria a alteração no número de células responsivas ao estradiol. Especialmente curioso, é o fato de, aos 21 dias de tratamento, o aumento da PRL provocado pelas doses de 10 e 300 mcg ter sido similar, enquanto o induzido pela dose de 50 mcg foi maior que os demais. No entanto, a dose de 50 mcg não provocou maior aumento na celularidade de lactotrofos do que a de 300 mcg (ver adiante). Aumento nos níveis de PRL após injeções múltiplas de estradiol (diariamente, por 6-21 dias) é um achado compartilhado por vários autores (CHEN e MEITES, 1970; JORDAN e KOERNER, 1976; JAHN e cols., 1982; SPONA e LEIBL, 1981; NOGAMI, 1984).

Em função de ter provocado aumento significativo nos níveis da PRL em todos os tempos de tratamento, a dose de 300 mcg foi por nós escolhida para o tratamento prolongado. Esta dose libera estradiol circulante em níveis bem mais elevados (JAHN e cols., 1982) que em qualquer fase do ciclo estral (BUTCHER e cols., 1974). Os níveis de PRL continuaram elevados aos 50 e 65 dias de tratamento com estrógeno (experimentos 4 e 5), embora em nível decrescente. JAHN e cols. (1982) também observaram declínio do efeito

estimulatório do estrógeno sobre os níveis de PRL comparando o efeito aos 140 dias de tratamento com o dos 30 dias. Estes achados divergem de outros relatados com tratamentos prolongados, os quais mostram aumento progressivo dos níveis prolactinêmicos (CASANUEVA e cols., 1982; PRYSOR-JONES e cols., 1983; LLOYD, 1983; HATALA e POWERS, 1988; EL-AZOUZI e cols., 1990; VAN NESSELROOIJ e cols., 1991). Existem, no entanto, algumas diferenças entre estes trabalhos e o atual: enquanto CASANUEVA e cols. (1982) utilizaram 8 injeções de 2 mg de valerato de estradiol a cada 3 semanas, os demais usaram implante de estradiol ou dietilestilbestrol por períodos de 60 a 240 dias. Especialmente interessante, em relação a este tópico, é o trabalho de ELIAS e WEINER (1984). Esses autores realizaram implante de estradiol em 2 cepas distintas, Sprague-Dawley e Fischer 344; enquanto nos primeiros o aumento da PRL foi progressivo, nos Fischer a hiperprolactinemia aos 63 dias foi menor que aos 30, de modo similar aos nossos achados.

Em ratos machos estrogenizados, há correlação positiva entre o peso da hipófise e a PRL sérica, com coeficientes de correlação variáveis de 0,59 (OLIVEIRA, 1989), 0,73 (JAHN e cols., 1982) ou mesmo 0,9 (LYLE e cols., 1984). Em ratos machos estrogenizados, o coeficiente de correlação entre o peso da hipófise e o percentual de lactotrofos é de 0,67, e entre a PRL sérica e os lactotrofos é de 0,46 (OLIVEIRA, 1989).

O aumento na secreção de PRL provocado pelo

estrogênio se acompanha do aumento na atividade mitótica dos lactotrofos. Aumento no número de lactotrofos, avaliados através da imuno-histoquímica, é visto a partir do quarto dia de uso do estrogênio (VAN NESSELROOIJ e cols., 1991).

O aumento na síntese de DNA é posterior à hipersecreção hormonal, o que ficou demonstrado a partir dos achados de JACOBI e cols.(1977), que detectaram aumento na PRL sérica a partir de 6 horas após dietilestilbestrol, e aumento na síntese de DNA hipofisário a partir de 30 horas. Entre 24-72 horas pós-estímulo há correlação entre os níveis séricos de PRL e síntese de DNA (JACOBI e cols., 1977). Aumento no índice mitótico (número de mitoses por milímetro quadrado) foi observado 48 horas após 50 mcg de estradiol (TAKAHASHI e cols., 1984).

Após demonstrar que a BCP, além de inibir a liberação de PRL, também inibia a proliferação nas células hipofisárias induzida pelo estrogênio, LLOYD e cols. (1975) sugeriram que o estado secretor da PRL é que influenciava a resposta mitótica. Este mecanismo, através do qual alterações no conteúdo hipofisário de PRL resultam em eventos no ciclo celular que afetam a síntese de DNA, foi posteriormente defendido em outros trabalhos (LLOYD e cols., 1978; BURDMAN e cols., 1979; KALBERMANN e cols., 1979; KALBERMANN e cols., 1980; JAHN e cols., 1980; JAHN e cols., 1982).

A administração única de valerato de estradiol não se acompanhou, em nosso experimento, de alterações no

percentual de lactotrofos. Não há relatos, ao nosso conhecimento, avaliando objetivamente a população de lactotrofos, através da imuno-histoquímica, após administração única de estradiol.

O tratamento diário, por 5 dias, com 1, 10 ou 100 mcg de estradiol, apesar de aumentar acentuadamente o mRNA PRL, se acompanhou de aumento pequeno no número de lactotrofos (NOGAMI e cols., 1985).

Reforçando a idéia de que a resposta da hipófise ao estrógeno depende da duração do tratamento (NOGAMI e cols., 1985), observamos que com a exposição ao estradiol por 14 dias, o percentual de lactotrofos se elevou significativamente em relação ao controle, e de modo similar com todas as doses examinadas. A continuidade do tratamento por 21 dias, manteve os níveis elevados, com valores semelhantes aos observados com 14 dias.

Nossos resultados estão de acordo com os de NOGAMI (1984), que detectou aumento na população de lactotrofos após 10 dias de benzoato de estradiol, e SCHREIBER e cols. (1984), que relataram, não objetivamente, "aumento marcado na incidência de lactotrofos" após 3 semanas de tratamento com a mesma droga.

A hiperplasia persiste com tratamentos mais prolongados (LLOYD, 1983; PRYSOR-JONES e cols., 1988; PHELLPS e HYMER, 1988; OLIVEIRA, 1989). Assim, em nosso tratamento por 50 ou 65 dias, o percentual de lactotrofos nas ratas estrogenizadas manteve-se quase duplicado em

relação às ooforectomizadas (experimento 1), assim como outros autores observaram duplicação do número de lactotrofos em ratos machos estrogenizados em relação a controles (NOGAMI, 1984; OLIVEIRA, 1989).

Além da contagem dos lactotrofos através da imuno-histoquímica, outros métodos foram utilizados para avaliação da replicação celular. Assim, o índice mitótico ou a atividade mitótica (índice mitótico vezes peso da hipófise) estão aumentados pós-estradiol (LLOYD e cols., 1975; PÉREZ e cols., 1986), tão cedo como 48 horas após 50 mcg de estradiol, em ratas ooforectomizadas (TAKAHASHI e cols., 1984). Através da incorporação de ³H-timidina em DNA, "in vivo" ou "in vitro", observa-se aumento na síntese de DNA (JACOBI e cols., 1977; LLOYD e cols., 1978; JAHN e cols., 1980; NOGAMI e cols., 1985). Esse efeito já é constatado 30-48 horas após administração de estrógeno (JACOBI e cols., 1977; LLOYD e cols., 1978). Achado interessante é o de JAHN e cols. (1982) que notaram, sob tratamento contínuo, valor elevado na síntese de DNA no sétimo dia de tratamento, diminuição desse estímulo a partir de 21 dias e diferença não significativa a partir dos 45 dias. Esse dado está de acordo com nossa observação de uma proporção estável de lactotrofos entre os 14 e os 65 dias de tratamento.

O aumento na população de lactotrofos observado com o uso de estrógeno, poderia não resultar apenas de aumento na divisão celular. Outras células hipofisárias, como os mamosomatotrofos, poderiam, através da secreção

preferencial de PRL nessas condições, participar desse processo.

Sob ação estrogênica, também foi constatada diminuição na síntese e conteúdo de GH hipofisário (LLOYD e cols., 1978; WICKLUND e cols., 1981), assim como decréscimo relativo no número de células produtoras desse hormônio (LLOYD, 1983), e diminuição progressiva no número de células produtoras de GH e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a partir dos 30 dias de implante de dietilestilbestrol (EL-AZOUZI e cols., 1990).

4.3. EFEITOS HIPOFISARIOS DO TAMOXIFEN

A administração de TAM, nas três doses avaliadas, foi eficaz em se contrapor ao aumento de peso da hipófise estimulado por duas administrações de valerato de estradiol. Esse parâmetro não parece ter sido avaliado na literatura, no mesmo intervalo de tempo.

Nos animais que receberam valerato de estradiol por 8 semanas, antes de associar tratamento com o antiestrógeno, o TAM (120 mcg) manteve redução significativa no peso hipofisário. Esse resultado havia sido relatado em experimentos com administração concomitante de estradiol e TAM. Com essa associação por 15 dias, foi impedida a elevação no peso hipofisário que seria esperada com o uso do estrógeno (FERRETTI e cols., 1988). Do mesmo modo, com estímulo estrogênico prolongado e concomitante ao TAM, LYLE

e cols. (1984) observaram bloqueio completo do aumento hipofisário induzido pelo estrógeno. No entanto, quando o TAM foi utilizado após 8 semanas de uso isolado do estradiol, já com hiperplasia estabelecida, embora tenha impedido a progressão de peso esperada com o tratamento estrogênico, não reduziu o seu valor (LYLE e cols., 1984). Também STAWOWY e cols. (1989) não observaram diferença induzida pelo TAM (1 mg/Kg, 7 dias) no peso hipofisário de animais implantados com dietilestilbestrol. Nosso resultado diverge, portanto, dos dados apresentados pelos dois últimos autores.

Após estímulo estrogênico curto, as doses de 60 e 120 mcg de TAM reduziram significativamente, e em grau similar, os níveis de PRL sérica. A propriedade do TAM de antagonizar o estímulo do estrógeno sobre a liberação de PRL, em intervalos de tratamento semelhantes ao aqui utilizado, está registrada nos trabalhos de JORDAN e cols. (1975), JORDAN e KOERNER (1976), SPONA e LEIBL (1981), WEISENBERG e cols. (1986) e POWERS e cols. (1989). Nesses relatos, as doses de TAM eficazes em produzir esse efeito variam de 50 mcg/dia a 1 mg/dia (considerando o peso do animal de aproximadamente 200 g). A dose de 12,5 mcg/dia não é suficiente para reduzir os níveis de PRL (JORDAN e KOERNER, 1976), nem a dose avaliada por nós de 20 mcg/dia. Em dois outros estudos (GILNA e MARTIN, 1986; SPONA e cols., 1980), a administração de TAM aumentou a PRL em animais estrogenizados. Esse comportamento de agonista

estrogênico, observado habitualmente com o uso isolado da droga (JORDAN e cols., 1975; SPONA e LEIBL, 1991; BOWMAN e cols., 1983; PRYSOR-JONES e cols., 1983; TONEY e KATZENELLENBOGEN, 1986; POWERS e cols., 1989; SPRITZER e cols., 1992(b)) deve estar relacionado à administração aguda ou subaguda (3 a 5 dias) utilizada pelos autores. É sabido que a definição do tipo de resposta ao TAM (funcionando como agonista ou antagonista estrogênico) depende de vários fatores, entre os quais a dose empregada (BOWMAN e cols., 1983; AMARA e DANNIES, 1986). Assim, quando em doses baixas, o TAM aumenta a produção de PRL em cultura de células hipofisárias normais, enquanto em altas doses inibe completamente o estímulo estrogênico (MARTINEZ-CAMPOS e cols., 1986).

Após tratamento estrogênico prolongado, a introdução de TAM não alterou os níveis prolactinêmicos em nossa observação, resultado similar ao descrito por LYLE e cols. (1984).

O efeito do TAM sobre a celularidade é tema praticamente inexplorado na literatura, quase restrito aos relatos de inibição de crescimento tumoral em tumores espontâneos de várias linhagens celulares (NAGY e cols., 1980; DE QUIJADA e cols., 1980; LAMBERTS e cols., 1981; PRYSOR-JONES e cols., 1983). Encontram-se também relatos esparsos, com respeito à ação do TAM sobre a síntese de DNA hipofisário. Em ratos normais, foi detectada diminuição (SPONA e LEIBL, 1981) ou ausência de alteração (PRYSOR-JONES

e cols., 1983) nesse parâmetro. Já com estrógeno concomitante, o TAM, na dose de 100 mcg, inibiu o estímulo na síntese de DNA (SPONA e LEIBL, 1981). Em nossa experiência, também ocorre redução na síntese de DNA com 60 e 120 mcg de TAM (SPRITZER e cols., 1992(a)).

Nesse experimento em animais estrogenizados, a dose de 120 mcg/dia de TAM não alterou o percentual de lactotrofos, avaliado através da imuno-histoquímica, independente do tempo de estímulo estrogênico. O intervalo de 10 dias de tratamento é suficiente para a droga se ligar ao receptor estrogênico e produzir efeito (POWERS e cols., 1989). No entanto, é possível que os receptores não tenham sido expostos a níveis saturantes de TAM (esse nível foi obtido, por POWERS e cols. (1989) com a dose de 1 mg/Kg, superior à aqui utilizada). A dose elevada de estradiol poderia também ser responsável por uma afinidade menor do TAM pelo receptor estrogênico, independente do valor absoluto de TAM administrado. A redução no peso hipofisário que ocorre com a droga pode também estar relacionada a outros fatores como, por exemplo, o conteúdo de líquido glandular, a exemplo do que ocorre no útero, onde a co-administração de TAM inibe o acúmulo de líquido estimulado pelo estrógeno (FURR e JORDAN, 1984). Além disso, não foi explorada a possibilidade de ação do TAM sobre outros tipos celulares hipofisários, que poderiam justificar a redução no peso e no DNA.

4.4. EFEITOS HIPOFISARIOS DO ACETATO DE NORETISTERONA

O peso da hipófise, após tratamento combinado com acetato de noretisterona, mostrou redução em relação ao grupo estrógeno isolado, quando utilizada a dose diária de 1 mg. Já no experimento crônico, a dose de 0,5 mg também foi efetiva (OLIVEIRA e cols., 1992). Para CHEN e MEITES (1970), a P foi incapaz de alterar o aumento de peso hipofisário induzido pelo estradiol em doses diárias variando de 0,5 a 10 mg, por 6 dias. Embora não saibamos a razão do resultado diferente no tratamento curto, a justificativa para a redução do peso no experimento crônico pode estar no tempo de exposição ao progestágeno, que aí foi ampliado. Diminuição no peso hipofisário também foi observada por BAKER e cols. (1972), em ratas tratadas por 4 semanas ou mais, com acetato de medroxiprogesterona (1 mg/100 g).

A PRL sérica diminuiu com as doses de 0,1 e 0,5 mg de acetato de noretisterona, no experimento com exposição estrogênica curta, e também diminuiu após exposição prolongada com a dose de 0,5 mg (OLIVEIRA e cols., 1992). Embora a P possa, nas primeiras horas após a administração, induzir aumento da PRL em ratos sensibilizados pelo estrógeno, o efeito inibitório é evidente um dia após (CALIGARIS e cols., 1978). Este efeito foi observado também com o tratamento por 6 dias, nas doses de 4 mg (CHEN e MEITES, 1970) ou 10 mg (REIER e cols., 1974). Embora CHEN e

MEITES (1970) não tenham observado esse efeito com doses inferiores a 4 mg, e nem REIER e cols. (1974) com a dose de 2 mg, está relatado bloqueio no aumento da PRL com a administração única da droga, na dose de 0,8 mg/Kg de peso corporal. Também TONG e cols. (1989) observaram, com 2 mg de progesterona por 14 dias, reversão de 35% do aumento do mRNA PRL que se segue ao estradiol.

A P também reduz o aumento dos níveis da PRL induzido pelo estresse, provocado pelo éter-laparotomia, em animais estrogenizados (REIER e cols., 1974).

Em células tumorais (GH3) em cultura, a P igualmente inibe o efeito estimulatório do estradiol sobre a PRL (HAUG e GAUTVIK, 1976). Esse efeito é compartilhado pelo progestágeno R5020, em células normais em cultura, sensibilizadas pelo estrógeno (GIGUÉRE e cols., 1982).

Além do efeito antiestrogênico da P sobre a PRL, é possível um efeito androgênico, como sugerido por GIGUÉRE e cols. (1982) e TONG e cols. (1989).

O número de lactotrofos não foi alterado nos animais que receberam a dose de 0,5 mg de acetato de noretisterona por 5 dias, mas sofreu redução significativa quando utilizada a mesma dose por 12 dias (OLIVEIRA e cols., 1992).

O estudo da celularidade dos lactotrofos sob efeito de P ou progestágenos é extremamente escasso. Para HAUG e GAUTVIK (1976), a P "não afetou o crescimento

celular" em cultura de células tumorais GH3. Para BAKER e cols. (1973), implante de noretinodrel ou noretindrona, em ratos, provocou hipertrofia de lactotrofos, que foi relacionada à estrogenicidade intrínseca desses compostos, já que o mesmo efeito não foi observado com o acetato de medroxiprogesterona.

Em cães, o efeito da P, que é estimulador em relação à PRL (em oposição ao observado no rato e no homem), se acompanha de aumento no percentual de lactotrofos (ATTIA, 1980). A demonstração de efeitos sobre as células hipofisárias, depende da duração do tratamento, dose utilizada e intervalos de administração, níveis estrogênicos do animal, tratamento estrogênico associado, presença ou não de atividade estrogênica inerente na droga, e também da origem natural ou sintética do progestágeno (ATTIA, 1980).

Com relação aos efeitos antiproliferativos da P ou derivados sobre os lactotrofos de ratos estimulados pelo estrógeno, desconhecemos outros resultados com os quais possam ser comparados os nossos. Segundo LAMBERTS e VERLEUN (1987), como as alterações na liberação de PRL (inibitórias, com P ou acetato de megestrol em cultura) sempre se correlacionaram com alterações no conteúdo hipofisário de PRL, e no conteúdo de proteínas e DNA celular, cabia a sugestão de efeito inibitório no número celular. Essa sugestão ficou demonstrada objetivamente em nossa experiência.

4.5. EFEITOS HIPOFISARIOS DA BROMOCRIPTINA

Neste experimento, a curva dose-efeito da BCP, sob estímulo estrogênico curto, mostrou diminuição no peso hipofisário em relação ao efeito do estradiol, com as três doses utilizadas. Embora a diferença do resultado entre as doses não tenha sido significativo, o menor peso observado foi com o uso de 0,6 mg/rato. Na literatura, também foi observada redução no ganho de peso hipofisário, em esquema de tratamento similar, com a dose de 0,3 mg/100 g de peso corporal (LLOYD e cols., 1975; LLOYD e cols., 1978). Nossos dados acrescentam, portanto, a informação de que, utilizando doses menores que as já descritas (0,05 mg/rato), a BCP é eficaz em se contrapor ao efeito estrogênico.

A dose de 0,6 mg/rato foi selecionada para o tratamento de animais com exposição prolongada ao estrógeno. Nesses animais, essa dose foi igualmente eficaz em diminuir o peso hipofisário. Esse resultado diverge dos achados de JAHN e cols. (1982) e confirma os de KALBERMANN e cols. (1980), LYLE e cols. (1984), ELIAS e WEINER (1987), DALL'ARA e cols (1988) e PHELPS e HYMER (1988). A explicação para a diversidade nos resultados, está, possivelmente, no tempo de uso da BCP, já que a observação de JAHN e cols. (1982) se refere a 2 administrações antes do sacrifício do animal, enquanto as demais estão associadas a um número mínimo de 5 dias consecutivos de tratamento (PHELPS e HYMER, 1988).

Quanto ao nível de PRL, ele foi reduzido com todas as doses avaliadas. Na literatura, a dose única de 0,3/100 g de peso corporal, que é suficiente para diminuir os níveis de PRL sérica e inibir a síntese de DNA em ratos normais (JACOBI e LLOYD, 1981), também é eficaz em inibir a PRL sérica (DAVIES e cols., 1974; LLOYD e cols., 1975) e a síntese de DNA (DAVIES e cols., 1974) em ratos estimulados pelo estradiol. Inibição da PRL sérica após estímulo estrogênico curto, também foi observada com a utilização de doses maiores (1 mg/rato) de BCP (PÉREZ e cols., 1986).

Em animais cronicamente estimulados pelo estrógeno, está mantida a redução dos níveis de PRL com a BCP, como anteriormente observado (KALBERMANN e cols., 1980; JAHN e cols., 1982; DALL'ARA e cols., 1988; PHELPS e HYMER, 1988). Para JAHN e cols. (1982) e DALL'ARA e cols. (1988), o valor da PRL sérica regride até o nível apresentado pelos animais-controle (não estrogenizados). Segundo GALA e BOSS (1975), LYLE e cols. (1984) e ELIAS e WEINER (1987), com o tratamento simultâneo estrógeno-BCP, a diminuição dos níveis de PRL é menor do que a obtida com o uso isolado de BCP. Lactotrofos expostos ao estrógeno também apresentam, "in vitro", diminuição da resposta máxima à BCP (WEST e DANNIES, 1980). Por outro lado, outro grupo relatou efeito maior da BCP em animais tratados com estrógeno, do que em controles (CASANUEVA e cols., 1982). Nosso trabalho não permite discutir esse ponto, já que não foi observado um grupo não estrogenizado tratado com BCP. No entanto, se fizermos

comparação com o grupo de ratas ooforectomizadas do experimento 1, ocorreu apenas diminuição parcial do efeito estrogênico.

Aqui, em animais que receberam BCP (0,6 mg/rato/dia) após estímulo curto com estradiol, não foi detectada alteração no percentual de lactotrofos. Em experimentos com desenho semelhante, há relatos de diminuição na síntese de DNA visto através da incorporação de [3H]timidina "in vivo" (DAVIES e cols., 1984); redução de células hipofisárias em mitose, coradas com hematoxilina-eosina (LLOYD e cols., 1975); e redução de células em mitose, sendo apenas 10% dessas células em mitose coradas positivamente com o antisoro anti-PRL (FÉREZ e cols., 1986).

Na experiência com tratamento estrogênico crônico, o período de administração da BCP foi estendido para 12 dias. Esse intervalo permitiu a observação de redução significativa do percentual de lactotrofos, de aproximadamente 17% em relação aos animais estrogênizados. Em ratos com implante de dietilestilbestrol, que receberam BCP diariamente, por 5 dias, PHELPS e HYMER (1988) não observaram redução no percentual de lactotrofos. O efeito antiproliferativo da BCP, avaliado através da análise do ciclo celular, medindo o DNA por citometria de fluxo a laser, também foi pequeno (PHELPS e HYMER, 1988). Na conclusão desses autores, reversão da proliferação celular não é um efeito maior do tratamento com BCP, e sim a reversão da hipertrofia celular e a inibição da síntese e

liberação da PRL. Essa conclusão é passível de discussão. Assim, o percentual de redução de lactotrofos, em nossa experiência, embora modesto, foi significativo. Também ocorreu diminuição na síntese de DNA em outros 2 experimentos com exposição prolongada ao estrógeno (KALBERMANN e cols., 1980; DALL'ARA e cols., 1988). Nesses trabalhos, a administração da BCP foi de no mínimo 12 dias. Talvez o intervalo de tratamento necessário para que a alteração no número de lactotrofos possa ser detectada através da imuno-histoquímica, seja superior aos 5 dias utilizados por PHELPS e HYMER (1988) (e essa seja também a explicação para nossos achados negativos com 5 dias de BCP após estímulo estrogênico curto). Essa idéia encontra apoio na sequência de eventos similares que ocorrem após o uso de estrógeno, discutida anteriormente: enquanto a alteração na síntese de DNA já ocorre a partir de 30 horas da administração (JACOBI e cols., 1987), o aumento no número de lactotrofos, visto através da imuno-histoquímica, ocorre a partir do quarto dia (VAN NESSELROOIJ e cols., 1991), é muito pequeno após 5 dias (NOGAMI e cols., 1985), e às vezes só detectado após 10 dias de tratamento com estradiol (NOGAMI, 1984). Em animais com hiperprolactinemia por hiperplasia espontânea de lactotrofos, tratamento prolongado com BCP leva a um decréscimo contínuo no percentual de lactotrofos (McCOMB e cols., 1986).

4.6. EFEITOS HIPOFISARIOS DAS ASSOCIAÇÕES DE TAMOXIFEN, ACETATO DE NORETISTERONA OU BROMOCRIPTINA

Todas as associações de drogas foram eficazes em diminuir o peso hipofisário após estímulo estrogênico curto, sempre ao mesmo nível obtido com o uso isolado das drogas. Já com tratamento estrogênico prolongado, apenas a associação BCP e progestágeno bloqueou o aumento no peso da hipófise; nas outras associações, embora o peso hipofisário tenha diminuído, não houve significância. Esse achado não se deve a uma diminuição do efeito sobre uma hiperplasia de lactotrofos já estabelecida, já que, isoladamente, as drogas tiveram efeito redutor. Deve ser considerada a possibilidade de que, nas condições experimentais de administração estrogênica prolongada, e na presença do progestágeno, o TAM tenha se comportado como agonista estrogênico.

Todas as associações inibiram a liberação de PRL de maneira significativa, exceto a associação progestágeno e TAM no experimento prolongado, onde a inibição, embora existente, foi menor. Chama atenção o fato de, nesse grupo, a exemplo dos dois grupos sem resposta quando avaliado o peso hipofisário, estar incluído o TAM.

Enquanto nenhuma associação (como também nenhum tratamento isolado) interferiu com a celularidade após estímulo curto com estradiol, todas as combinações reduziram a população de lactotrofos no experimento crônico. Assim, o comportamento desse parâmetro parece depender mais da

duração do tratamento com as drogas observadas, do que com a duração do estímulo estrogênico (o percentual de lactotrofos não diferiu no tratamento estrogênico curto e no prolongado).

É importante assinalar que em nenhuma ocasião foi observado resultado positivo das associações em nenhum dos parâmetros avaliados, se não existisse também um resultado positivo com ao menos uma das drogas isoladas. Do mesmo modo, nem quando as duas drogas isoladas eram eficazes em alterar o ítem em observação, houve potenciação de efeitos com o tratamento combinado. Embora nas condições experimentais aqui utilizadas não tenha se observado vantagem com o uso das associações, é preciso levar em conta que não foi realizada curva dose-resposta para essas associações, as quais foram exploradas em dose fixa. Também existe a possibilidade de que a dose de algum fármaco usado na associação fornecesse a resposta máxima para um determinado efeito. Nessas condições, não se observaria potenciação de efeitos.

A associação de TAM com BCP é pouco explorada em modelos experimentais. A diminuição dos níveis de PRL induzida pela BCP em células tumorais em cultura, foi potencializada pela adição de TAM (DE QUIJADA e cols., 1980a). Sinergismo destas duas drogas na ação antiproliferativa não foi posteriormente confirmado nem em células hipofisárias tumorais humanas, "in vitro" (ARAFAH e cols., 1983), nem "in vivo", em ratos com prolactinomas

espontâneos transplantados (PRYSOR-JONES e cols., 1983). Em humanos, a introdução de TAM no tratamento de prolactinomas invasivos, mostrou leve efeito aditivo ou potencializador em relação à BCP (LAMBERTS e cols., 1982). Em 6/10 pacientes acompanhados por VOLKER e cols. (1982) a adição de TAM resultou em supressão marcada da PRL. Finalmente, duas pacientes intolerantes à BCP, tiveram boa resposta clínica, incluindo gravidez, com tratamento combinado de BCP e TAM (KOIZUMI e AONO, 1986).

Não existem, ao nosso conhecimento, e à época da realização desse estudo, informações sobre as associações TAM e progestágeno ou BCP e progestágeno. Portanto, a idéia inicial de que pudesse haver efeito aditivo ou de potenciação com essas associações, a partir dos diferentes mecanismos de ação hipofisária das drogas, não foi comprovada com o desenho experimental utilizado. Como ressaltado anteriormente, alguns fatores podem ter interferido negativamente nesse resultado, merecendo continuidade o estudo do tema.

4.7. ANALOGIA ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO MODELO EXPERIMENTAL E O EFEITO EM HUMANOS

Se os efeitos de um determinado fármaco são às vezes opostos em diferentes cepas de uma mesma espécie, extremamente delicada seria a tentativa de transposição dos resultados inter-espécies. No entanto, lactotrofos de ratos,

normais ou tumorais, são bons modelos para estudar os efeitos de estrógenos ou antiestrógenos (LAMBERTS e VERLEUN, 1987), permitindo algumas considerações sobre o tema.

Alguns dos efeitos estimuladores do estrógeno na atividade hormonal e mitótica da hipófise do rato (LLOYD e cols., 1975), que se expressam através do aumento da síntese e liberação de PRL, e da hipertrofia e hiperplasia dos lactotrofos, encontram paralelo em humanos, por ocasião da gravidez (PEILLON e cols., 1970) ou do uso de estrógenos em altas doses (FRANTZ e cols., 1972; ASSCHEMAN e cols., 1988a,b). Neste trabalho, o uso do estrógeno serviu para estabelecer o modelo animal, sendo os resultados observados confirmatórios dos achados da literatura. Foge dos objetivos principais a elaboração de conjecturas sobre os efeitos deletérios desse esteróide na hipófise humana.

No rato, os efeitos inibitórios da BCP se expressam através da diminuição da síntese e liberação da PRL (DANNIES e RUDNICK, 1980; JACOBI e LLOYD, 1981) e, em ratos estimulados pelo estrógeno ou em lactotrofos adenomatosos, também através da diminuição da proliferação celular (LLOYD e cols., 1975; PRYSOR-JONES e JENKINS, 1981; PRYSOR-JONES e cols., 1983; McCOMB e cols., 1985; PÉREZ e cols., 1986). Estas ações também encontram paralelo em humanos. No homem, a BCP diminui a secreção de PRL (DEL POZO e cols., 1972; BESSER e cols., 1972) e causa diminuição do volume de micro e macroprolactinomas (DEMURA e cols., 1985; LESSER e cols., 1990). O evento principal que se segue ao

uso da BCP em ratos e humanos, isto é, a redução de volume celular por inibição da maquinaria da síntese hormonal, está bem estabelecida. A inclusão da droga nesse experimento baseou-se: 1) no desejo de um "controle positivo", isto é, que sabidamente causasse redução nos níveis de PRL, e 2) no objetivo de documentar alterações na celularidade, que são pouco exploradas no modelo utilizado, através da contagem de lactotrofos identificados pela técnica da imunohistoquímica.

Já com o uso de TAM sob estímulo estrogênico, mesmo em ratos as informações são inconsistentes. Revisando os relatos publicados, há uma tendência de efeito inibitório sobre a secreção de PRL. Faltam informações sobre o efeito do TAM na celularidade. A incursão nessa área é estimulada por trabalhos clínicos que mostraram algum benefício com a adição de TAM à BCP (LAMBERTS e cols., 1982; VOLKER e cols., 1982; KOIZUMI e AONO, 1986). Em nossa observação, resultados favoráveis foram constatados com o TAM, quando considerado o peso hipofisário. O resultado foi variável na secreção de PRL (inibição ou ausência de efeito) e não se observaram efeitos sobre a celularidade. Tanto essa variabilidade, como o resultado pobre quando o TAM foi utilizado nas associações, são justificados pela complexidade de sua ação. Os dados atuais não permitem conclusões definitivas sobre a ação hipofisária do TAM.

Finalmente, são encorajadores os resultados obtidos com o acetato de noretisterona. Em ratos, "in vivo",

a progesterona inibe a liberação de PRL induzida pelo estrógeno (CHEN e MEITES, 1970; BRANN e cols., 1988). Além desse efeito, aqui foi constatada uma ação antiproliferativa, tema até o momento inexplorado. Relatos isolados em humanos mostram, com o uso de progestágenos, redução nos níveis de PRL, tanto induzidos pelo estrógeno (SCHAISON, 1980), como em pacientes com microprolactinomas (SITRUK-WARE e cols., 1985). Os resultados são novos e necessitam confirmação. Deve, também, ser aventada a possibilidade de trabalhos clínicos que avaliem o benefício do uso de progestágenos em situações onde o uso do estrógeno inspire cautela (por exemplo, na anticoncepção de pacientes com hiperprolactinemia, em tratamento com bromocriptina) (MALLMANN e SPRITZER, 1992).

5. CONCLUSÕES

1. Em ratas Wistar, tanto o peso hipofisário, como a liberação de PRL e o percentual de lactotrofos, são significativamente menores em ratas sexualmente imaturas em relação às adultas jovens. Em ratas castradas, os níveis de PRL sérica e o percentual de lactotrofos também são significativamente menores que os das adultas intactas, quando esses parâmetros são avaliados 30 dias após a ooforectomia. Conclui-se que o estrógeno endógeno tem papel definido na população de células hipofisárias secretoras de PRL.

2. O valerato de estradiol, já aos 7 dias de tratamento (período mínimo avaliado) foi eficaz em elevar significativamente os níveis séricos da PRL e, a partir dos 14 dias, em elevar o percentual de lactotrofos. Com a administração de estradiol por até 65 dias, houve tendência de elevação progressiva no peso hipofisário, persistência de hiperprolactinemia, embora em nível decrescente, e aumento no percentual de lactotrofos, em nível semelhante ao observado com estímulo estrogênico de menor duração. Estes achados enfatizam o efeito estimulatório do estrógeno exógeno sobre os lactotrofos, e acrescentam dados a) em relação ao período mínimo para observação de alterações na

celularidade através da imuno-histoquímica, e b) quanto à ocorrência de um platô no estímulo proliferativo, nesta cepa, nos limites do período observado.

3. Em animais tratados por 5 dias com tamoxifen (e 12 dias de estrógeno) observou-se diminuição do peso hipofisário com as três doses utilizadas (20, 60 ou 120 mcg/dia/rato), e redução nos níveis da PRL sérica com as doses de 60 e 120 mcg. Não foi detectada alteração na celularidade. Com hiperplasia de lactotrofos definitivamente estabelecida, sob estímulo estrogênico prolongado, e com 12 dias de administração diária de tamoxifen, se manteve a redução no peso hipofisário, sendo ausentes as ações sobre os níveis de PRL e a celularidade dos lactotrofos. É possível concluir que o tamoxifen tenha uma ação hipofisária consistente, embora em população celular ainda não identificada.

4. Animais tratados por 5 dias com acetato de noretisterona (e 12 dias de estrógeno) mostraram redução no peso hipofisário com a dose de 1 mg, e redução da PRL sérica com as doses de 0,1 e 0,5 mg. Não foi alterado o número de lactotrofos. Após tratamento estrogênico prolongado, o acetato de noretisterona (0,5 mg diários, 12 dias) manteve a redução no peso hipofisário e na PRL sérica e, nestas condições experimentais, foi observada uma redução no percentual de lactotrofos. Estes resultados demonstram que,

neste modelo, o progestágeno é eficaz em se contrapor a todas as ações estimulatórias do estrógeno aqui avaliadas.

5. Tratamento por 5 dias com bromocriptina (e 12 dias de estrógeno) levou à redução de peso hipofisário com todas doses utilizadas (0,05, 0,2 e 0,6 mg), as quais foram igualmente eficazes em diminuir a PRL sérica. Com essa duração de tratamento não se observou alteração na celularidade. Mesmo com hiperplasia crônica dos lactotrofos, quando administrada por 12 dias a bromocriptina foi eficaz em reduzir os três parâmetros: peso hipofisário, PRL sérica e percentual de lactotrofos. Esses dados demonstram a clássica e poderosa ação antidopaminérgica da droga. A redução no número de lactotrofos, cuja extensão ainda é controversa na literatura, foi aqui registrada objetivamente e por documentação fotográfica.

6. As associações de tamoxifen, acetato de noretisterona ou bromocriptina não produziram, nesse modelo experimental, em nenhuma circunstância, efeito de sinergismo, seja de adição ou potenciação. Esses resultados são limitados às combinações de doses aqui utilizadas, servindo como referência para a extensão da investigação.

6. RESUMO

Em ratos, o estrógeno tem ações estimulatórias sobre a síntese e liberação de PRL e sobre a proliferação de lactotrofos. O papel do estrógeno endógeno está demonstrado nesta observação, onde ratas Wistar sexualmente imaturas ou ooforectomizadas apresentam níveis de PRL sérica significativamente menores que ratas adultas jovens intactas. O estrógeno exógeno (valerato de estradiol) também estimula a secreção de PRL e o número de lactotrofos, em períodos de tratamento de até 65 dias, em doses semanais de 10, 50 ou 300 mcg/rato.

Em ratas ooforectomizadas, sob 12 ou 65 dias de estímulo estrogênico, foram avaliados os efeitos hipofisários de um antiestrogênio não esteróide, o tamoxifen (20, 60 ou 120 mcg/dia), e de um progestágeno, o acetato de noretisterona (0,1, 0,5 ou 10 mg/dia). Nesse modelo, os principais mecanismos de ação dessas drogas são a inibição de receptores estrogênicos e a modulação dos efeitos do estradiol. Também foi avaliada a ação hipofisária da bromocriptina (0,05, 0,2 ou 0,6 mg/dia), um agonista dopaminérgico, e das combinações de tamoxifen, acetato de noretisterona e bromocriptina. O tamoxifen reduziu o peso hipofisário, independente da duração do tratamento estrogênico, e diminuiu a PRL sérica quando o estrógeno foi

estrogênico, e diminuiu a PRL sérica quando o estrógeno foi usado por 12 dias. O acetato de noretisterona reduziu o peso hipofisário e a PRL sérica e também, no tratamento prolongado, reduziu o percentual de lactotrofos. Interferência especialmente eficaz foi a da bromocriptina que, em todas as doses avaliadas no tratamento curto, foi inibitória em relação ao peso hipofisário e secreção de PRL, e na dose de 0,6 mg, mesmo sob hiperplasia já estabelecida de lactotrofos, inibiu todos os estímulos induzidos pelo estradiol. A associação de tamoxifen ou acetato de noretisterona à bromocriptina não mostrou efeito de sinergismo em nenhuma circunstância.

Concluindo, entre os vários resultados que confirmam dados anteriores ou ampliam o conhecimento relativo aos efeitos hipofisários da inter-relação estrógeno e demais fármacos avaliados, destacam-se os resultados observados com o progestágeno. O progestágeno mostrou eficácia em se contrapor aos efeitos estrogênicos hipofisários, com ênfase especial à sua ação antiproliferativa sobre os lactotrofos, aqui objetivamente demonstrada.

ABSTRACT

In rats, estrogen has stimulatory actions on the prolactin synthesis and release and on prolactin cell proliferation. The role of endogenous estrogen is demonstrated in this observation, where prolactin serum level in immature (26 days old) or ovariectomized Wistar rats is significantly lower than in intact adult rats. Estradiol valerate also stimulates prolactin secretion and increases lactotroph number, in treatment periods of up to 65 days with weekly doses of 10, 50 or 300 mcg/rat.

In ovariectomized rats, under estrogenic stimulus for 12 or 65 days, the pituitary effects of tamoxifen, a non-steroid antiestrogen (20, 60 or 120 mcg/day), and the progestin norethisterone acetate (0,1, 0,5 or 10 mg/day) were evaluated. In this model, the mechanisms of action of these drugs include estrogen receptor inhibition and modulation of estradiol effects. The pituitary action of bromocriptine (0,05, 0,2 or 0,6 mg/day), a dopaminergic agonist, and of tamoxifen, norethisterone acetate and bromocriptine associations were also evaluated. Tamoxifen reduced pituitary weight stimulated by estradiol, independently of estrogenic treatment time, and reduced serum prolactin level when estrogen was used for 12 days. Norethisterone acetate also reduced pituitary weight and

serum prolactin level and, when the treatment was extended, reduced the lactotroph number. Bromocriptine was particularly efficient in inhibiting the increase in pituitary weight and prolactin secretion in all doses evaluated at the short time treatment. With continuous treatment, it inhibited the different estradiol-induced stimulus, despite the definite lactotroph hyperplasia. The associations of tamoxifen, norethisterone acetate and bromocriptine did not show synergistic effects in any situation.

We conclude that our main results are that the progestins antagonize the pituitary estrogenic effects, with special emphasis to its antiproliferative action on the lactotrophs, objectively demonstrated in this study.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADAM, H.K., GAY, M.A., MOORE, R.H. Measurement of tamoxifen in serum by thin-layer densitometry. Journal of Endocrinology, v.84, p.35-42, 1980.
2. AMARA, J.F. e DANNIES, P.S. Characterization of antiestrogen stimulation of cell number and prolactin production. Molecular and Cellular Endocrinology, v.47, p.183-189, 1986.
3. AMENOMORI, Y., CHEN, C.L., MEITES, J. Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. Endocrinology, v.86, p.506-510, 1970.
4. ARAFAH, B.M., WILHITE, B.L., RAINIERI, J. et al. Inhibitory action of bromocriptine and tamoxifen on the growth of human pituitary tumors in soft agar. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.57, p.986-992, 1983.
5. ASSCHEMAN, H., ASSIES, J., SMITS, J.P.H. et al. Estrogen-induced hyperprolactinemia and prolactinomas in male-to-female transsexuals. Advances in the Biosciences, v.69, p.309-311, 1988.(a)
6. ASSCHEMAN, H., GOOREN, L.J.G., ASSIES, J. et al. Prolactin levels and pituitary enlargement in hormone-treated male-to-female transsexuals. Clinical Endocrinology, v.28, p.583-588, 1988.(b)
7. ATTARDI, B. Facilitation and inhibition of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in the rat by progesterone: effects on cytoplasmic and nuclear estrogen receptors in the hypothalamus-preoptic area, pituitary and uterus. Endocrinology, v.108, p.1487-1496, 1981.
8. ATTIA, M. A. Ovarian steroids and pituitary function in some experimental animals and in man. Reviews in Pure and Applied Pharmacological Sciences, v.1, p.327-341, 1980.

9. BAKER, B.L., ESKIN, T.A., AUGUST, L.N. Direct action of synthetic progestins on the hypophysis. Endocrinology, v.92, p.965-972, 1973.
10. BASSETTI, M., SPADA, A., PEZZO, G. et al. Bromocriptine treatment reduces the cell size in human macroprolactinomas: a morphometric study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.58, p.268-273, 1984.
11. BEN-JONATHAN, N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. Endocrine Reviews, v.6, p.564-589, 1985.
12. BERKVEN, J.M., VAN NESSELROOIJ, J.H.J., KROES, R. Spontaneous tumours in the pituitary gland of old Wistar rats. A morphological and immunocytochemical study. Journal of Pathology, v.130, p.179-191, 1980.
13. BESSER, G.M., PARKE, L., EDWARDS, C.R.W. et al. Galactorrhoea: successful treatment with reduction of plasma prolactin levels by brom-ergocryptine. British Medical Journal, v.3, p.669-672, 1972.
14. BEVAN, J.S., SUSSMAN, J., ROBERTS, A. et al. Development of an invasive macroprolactinoma: a possible consequence of prolonged oestrogen replacement. Case report. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, v.96, p.1440-1444, 1989.
15. BLACKWELL, R.E. Hyperprolactinemia. Evaluation and management. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, v.21, p.105-125, 1992.
16. BLAKE, C.A., WEINER, R.I., SAWYER, C.H. Pituitary prolactin secretion in female rats made persistently estrous or diestrous by hypothalamic deafferentation. Endocrinology, v.90, p.862-866, 1972.
17. BLAUSTEIN, J. D. e BROWN, T. J. Progesterone decreases the concentration of hypothalamic and anterior pituitary estrogen receptors in ovariectomized rats. Brain Research, v.304, p.225-236, 1984.
18. BOOCKFOR, F. R. e FRAWLEY, L. S. Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions. Endocrinology, v.120, p.874-879, 1987.

19. BOWMAN, S.P., LEAKE, A., MORRIS, I.D. Hypothalamic, pituitary and uterine cytoplasmic and nuclear oestrogen receptors and their relationship to the serum concentration of tamoxifen and its metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in the ovariectomized rat. Journal of Endocrinology, v.94, p.167-175, 1982.
20. BOWMAN, S.P., JONES, C.A., LEAKE, A. et al. The biological activity of a single dose of tamoxifen in the adult ovariectomized rat. British Journal of Pharmacology, v.78, p.617-622, 1983.
21. BRANN, D.W., RAD, I.M., MAHESH, V.B. Antagonism of estrogen-induced prolactin release by progesterone. Biology of Reproduction, v.39, p.1067-1073, 1988.
22. BRICAIRE, C., KERLAN, V., KUTTENN, F. et al. La grossesse: une modalité de guérison des adénomes à prolactine? Presse Medicale, v.17, p.2117-2119, 1988.
23. BURDMAN, J.A., SZIJAN, I., JAHN, G.A. et al. DNA synthesis in the pituitary gland of the rat: effect of sulpiride and clomiphene. Experientia, v.35, p.1258-1259, 1979.
24. BURGETT, R.A., GARRIS, P.A., BEN-JONATHAN, N. Estradiol-induced prolactinomas: different effects on dopamine in posterior pituitary and median eminence. Brain Research, v.531, p.143-147, 1990.
25. BUTCHER, R.L., COLLINS, W.E., FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology, v.94, p.1704-1708, 1974.
26. CALDERON, J., MULDOON, T.G., MAHESH, V.B. Receptor-mediated interrelationships between progesterone and estradiol action on the anterior pituitary-hypothalamic axis of the ovariectomized immature rat. Endocrinology, v.120, p.2428-2435, 1987.
27. CALIGARIS, L., ASTRADA, J. J., TALEISNIK, S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. Journal of Endocrinology, v.60, p.205-215, 1974.

28. CARSON-JURICA, M.A., SCHRADER, W.T., O'MALLEY, B.W. Steroid receptor family: structure and functions. Endocrine Reviews, v.11, p.201-220, 1990.
29. CASANUEVA, F., COCCHI, D., LOCATELLI, V. et al. Defective central nervous system dopaminergic function in rats with estrogen-induced pituitary tumors, as assessed by plasma prolactin concentrations. Endocrinology, v.110, p.590-599, 1982.
30. CHEN, C.L. e MEITES, J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. Endocrinology, v.86, p.503-505, 1970.
31. CHUKNYISKA, R.S., BLACKMAN, M.R., HYMER, W.C. et al. Age-related alterations in the number and function of pituitary lactotropic cells from intact and ovariectomized rats. Endocrinology, v.118, p.1856-1862, 1986.
32. CLARK, J.H., SCHRADER, W.T., O'MALLEY, B.W. Mechanisms of action of steroid hormones. In: WILSON, J.D. e FOSTER, D.W. Williams Textbook of Endocrinology. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992, p.35-90.
33. CLARKE, I.J. e CUMMINS, J. T. Pulsatility of reproductive hormones: physiological basic and clinical implications. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, v.1, p.1-21, 1987.
34. CLARKE, C.L. e SUTHERLAND, R.L. Progesterin regulation of cellular proliferation. Endocrine Reviews, v.11, p.266-301, 1990.
35. CORENBLUM, B. Bromocriptine in pituitary tumours. Lancet, v.2, p.786, 1978.
36. CORENBLUM, B. e HANLEY, D. A. Bromocriptine reduction of prolactinoma size. Fertility and Sterility, v.36, p. 716-719, 1981.
37. CORRODI, H., FUXE, K., HOKFELT, T. et al. Effect of ergot drugs on central catecholamine neurons: evidence for a stimulation of central dopamine neurons. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.25, p.409-412, 1973.

38. COUTINHO, L.M.B. Adenomas da hipófise: estudo imuno-histoquímico. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988.
39. CRAMER, O.M., PARKER, C.R., PORTER, J.C. Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood. Endocrinology, v.104, p.419-422, 1979.
40. CUNNAH, D. e BESSER, M. Management of prolactinomas. Clinical Endocrinology, v.34, p.231-235, 1991.
41. DALL'ARA, A., LIMA, L., COCCHI, D. et al. Inhibitory effect of cabergoline on the development of estrogen-induced prolactin-secreting adenomas of the pituitary. European Journal of Pharmacology, v.151, p.97-102, 1988.
42. DANNIES, P.S. e RUDNICK, M.S. 2-bromo-alfa-ergocryptine causes degradation of prolactin in primary cultures of rat pituitary cells after chronic treatment. Journal of Biological Chemistry, v.255, p.2776-2781, 1980.
43. DAVIES, C., JACOBI, J., LLOYD, H.M. et al. DNA synthesis and the secretion of prolactin and growth hormone by the pituitary gland of the male rat: effects of diethylestilboestrol and 2-bromo-alfa-ergocryptine methanesulphonate. Journal of Endocrinology, v.61, p.411-417, 1974.
44. DAVIS, J.R.E., SELBY, C., JEFFCOATE, W. J. Oral contraceptive agents do not affect serum prolactin in normal women. Clinical Endocrinology, v.20, p.427-434, 1984.
45. DAVIS, J.R.E., VIDAL, E.M., WILSON, E.M., SHEPPARD, M.C. Suppression of prolactin release and mRNA accumulation by two novel dopamine agonist agents. Acta Endocrinologica, v.120, p.672-676, 1989.
46. DEL POZO, E., BRUN DEL RE, R., VARGA, L. et al. The inhibition of prolactin secretion in man by CB-154 (2-Br-alfa-ergocryptine). Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.35, p.768-771, 1972.

47. DEMAREST, K.T., MOORE, K. E., RIEGLE, G.D. Dopaminergic neuronal function, anterior pituitary dopamine content, and serum concentrations of prolactin, luteinizing hormone and progesterone in the aged female rat. Brain Research, v.247, p.347-354, 1982.
48. DEMAREST, K.T., MOORE, K. E., RIEGLE, G.D. Adenohypophysial dopamine content and prolactin secretion in the aged male and female rat. Endocrinology, v.116, p.1316-1323, 1985.
49. DEMURA, R., KUBO, O., DEMURA, H. et al. Changes in computed tomographic findings in microprolactinomas before and after bromocriptine. Acta Endocrinologica, v.110, p.308-312, 1985.
50. DENEFF, C. e ANDRIES, M. Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. Endocrinology, v.112, p.813-822, 1983.
51. DE QUIJADA, M. de, TIMMERMANS, H.A.T., LAMBERTS, S.W.J. et al. Tamoxifen enhances the sensitivity of dispersed prolactin-secreting pituitary tumor cells to dopamine and bromocriptine. Endocrinology, v.106, p.702-705, 1980. (a)
52. DE QUIJADA, M. de, TIMMERMANS, H.A.T., LAMBERTS, S.W.J. Tamoxifen supresses both the growth of prolactin-secreting pituitary tumours and normal prolactin synthesis in the rat. Journal of Endocrinology, v.86, p.109-116, 1980. (b)
53. DUNN, J.D., ARIMURA, A., SCHEVING, L.E. Effect of stress on circadian periodicity in serum LH and prolactin concentration. Endocrinology, v.90, p.29-33, 1972.
54. ECKERT, R.L. e KATZENELLENBOGEN, B.S. Human endometrial cells in primary tissue culture: modulation of the progesterone receptor level by natural and synthetic estrogens in vitro. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.52, p.699-708, 1981.
55. EHARA, Y., SILER, T.M., YEN, S.S.C. Effects of large doses of estrogen on prolactin and growth hormone release. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.125, p.455-458, 1976.

56. EL AYAT, A.A.B. e MAHESH, V.B. Stimulation of 17-beta-hydroxi steroid dehydrogenase in the rat anterior pituitary gland by progesterone. Journal of Steroid Biochemistry, v.20, p.1141-1145, 1984.
57. EL-AZOUZI, M., HSU, D.W., BLACK, P. McL. et al. The importance of dopamine in the pathogenesis of experimental prolactinomas. Journal of Neurosurgery, v.72, p.273-281, 1990.
58. ELIAS, K.A. e WEINER, R.I. Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.81, p.4549-4553, 1984.
59. ELIAS, K.A. e WEINER, R. I. Inhibition of estrogen-induced anterior pituitary enlargement and arteriogenesis by bromocriptine in Fischer 344 rats. Endocrinology, v.120, p.617-621, 1987.
60. ESIRI, M.M., BEVAN, J.S., BURKE, C.W. et al. Effect of bromocriptine treatment on the fibrous tissue content of prolactin-secreting and nonfunctioning macroadenomas of the pituitary gland. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.63, p.383-388, 1986.
61. FELICIO, L.F., MIRANDA, W.L., NASELLO, A.G. Prolactin levels in male and female rats perinatally treated with bromopride. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.21, p.133-136, 1988.
62. FERRETTI, C., BLENGIO, M., GHI, P. et al. Tamoxifen counteracts estradiol induced effects on striatal and hypophyseal dopamine receptors. Life Sciences, v.42, p.2457-2465, 1988.
63. FINK, G. Oestrogen and progesterone interactions in the control of gonodotrophin and prolactin secretion. Journal of Steroid Biochemistry, v.30, p.169-178, 1988.
64. FOURNIER, S., KUTTENN, F., de CICCIO, F. et al. Estradiol 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human breast fibroadenomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.55, p.428-433, 1982.

65. FRANTZ, A.G., KLEINBERG, D.L., NOEL, G.L. Studies on prolactin in man. Recent Progress in Hormone Research, v.28, p.527-590, 1972.
66. FRANTZ, A.G. e WILSON, J.D. Endocrine disorders of the breast. In: WILSON, J.D. e FOSTER, D.W. Williams Textbook of Endocrinology. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992, p.953-975.
67. FRAWLEY, L.S., BOOCKFOR, F.R., HOFFLER, J.P. et al. Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. Endocrinology, v.116, p.734-737, 1985.
68. FURR, B.J.A. e JORDAN, V.C. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. Pharmacology and Therapeutics, v.25, p.127-205, 1984.
69. GALA, R.R. e BOSS, R.S. Serum prolactin levels of rats under continuous estrogen stimulation and 2 Br-alfa-ergocryptine (CB 154) injection. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v.149, p.330-332, 1975.
70. GEN, M., VOZUMI, T., OHTA, M. et al. Necrotic changes in prolactinomas after long term administration of bromocriptine. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.59, p.463-470, 1984.
71. GEORGE, S.R., BURROW, G.N., ZINMAN, B. et al. Regression of pituitary tumors, a possible effect of bromergocryptine. American Journal of Medicine, v.66, p.697-702, 1979.
72. GIGUÈRE, V., MEUNIER, H., VEILLEUX, R. et al. Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interactions with dopamine, thyrotropin-releasing hormone, and isobutylmethylxanthine. Endocrinology, v.111, p.857-862, 1982.
73. GILNA, P. e MARTIN, F. The effect of oestriol and tamoxifen on oestradiol induced prolactin secretion in anaesthetised rats. Acta Endocrinologica, v.112, p.71-78, 1986.
74. GOH, H.H. e RATNAM, S.S. Effect of estrogens on prolactin secretion in transsexual subjects. Archives of Sexual Behavior, v.19, p.507-516, 1990.

75. GOLDMAN, J.M., COOPER, R.L., REHNBERG, G.L. et al. Age-related changes in the regional distribution of hormones in the male rat anterior pituitary. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.152, p.1213-1220, 1988.
76. GOLUBOFF, L.G. e EZRIN, C. Effect of pregnancy on the somatotroph and the prolactin cell of the human adenohypophysis. Journal of Clinical Endocrinology, v.29, p.1533-1538, 1969.
77. GOMPEL, A., CHOMETTE, G., MALET, C. et al. Estradiol-progestin interaction in normal human breast cells in culture. Breast Diseases-Senologia, v.1, p.149-156, 1985.
78. GOMPEL, A., MALET, C., SPRITZER, P. et al. Progesterin effect on cell proliferation and 17beta-hydroxysteroiddehydrogenase activity in normal human breast cells in culture. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.63 p.1174-1180, 1986.
79. GOODREN, L.J.G., ASSIES, J., ASSCHEMAN, H. et al. Estrogen-induced prolactinoma in a man. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.66, p.444-446, 1988.
80. GORCZYCA, W. e HARDY, J. Microadenomas of the human pituitary and their vascularization. Neurosurgery, v.22, p.1-6, 1988.
81. GROOM, G.V. e GRIFFITHS, K. Effect of the anti-oestrogen tamoxifen on plasma levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, oestradiol and progesterone in normal pre-menopausal women. Journal of Endocrinology, v.70, p.421-428, 1976.
83. HANKER, J.P., SCHELLONG, G., SCHNEIDER, H.P.G. The functional state of the hypothalamo-pituitary axis after high-dose oestrogen therapy in excessively tall girls. Acta Endocrinologica, v.91, p.19-29, 1979.
82. HATALA, M.A. e POWERS, C.A. Glandular kallikrein in estrogen-induced pituitary tumors: time course of induction and correlation with prolactin. Cancer Research, v.48, p.4158-4162, 1988.
84. HAUG, E. e GAUTVIK, K.M. Effects of sex steroids on prolactin secreting rat pituitary cells in culture. Endocrinology, v.99, p.1482-1489, 1976.

85. HELGASON, S. Estrogen replacement therapy after the menopause. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, Supplement, v.107, p.4-29, 1982.
86. HOFLAND, L.J., VAN KOETSVELD, P., KOPER, J.W. et al. Weak estrogenic activity of phenol red in the culture medium: its role in the study of the regulation of prolactin release in vitro. Molecular and Cellular Endocrinology, v.54, p.43-50, 1987.
87. HSU, S., RAINE, L., FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. American Journal of Clinical Pathology, v.75, p.734-738, 1981.
88. HSUEH, A.J.W., PECK, E.J., CLARK, J.H. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. Endocrinology, v.98, p.438-444, 1976.
89. HUBERT, J., VINCENT, A., LABRIE, F. Estrogenic activity of phenol red in rat anterior pituitary cells in culture. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.141, p.885-891, 1986.
90. HULTING, A.L., WERNER, S., HAGENFELDT, K. Oral contraceptive steroids do not promote the development or growth of prolactinomas. Contraception, v.27, p.69-73, 1983.
91. HWANG, P.L.H., NG, C.S.A. e CHEONG, S.T. Effect of oral contraceptives on serum prolactin: a longitudinal study in 126 normal premenopausal women. Clinical Endocrinology, v.24, p.127-133, 1986.
92. JACOBI, J., LLOYD, H.M., MEARES, J.D. Onset of oestrogen-induced prolactin secretion and DNA synthesis by the rat pituitary gland. Journal of Endocrinology, v.72, p.35-39, 1977.
93. JACOBI, J.M. e LLOYD, H.M. Modulation by dopamine antagonists of DNA synthesis in the pituitary gland of the male rat. Neuroendocrinology, v.33, p.97-100, 1981.
94. JAHN, G.A., KALBERMANN, L.E., MACHIAVELLI, G. et al. DNA polymerases in the rat pituitary gland - effect of oestrogens and sulphiride. Molecular and Cellular Endocrinology, v.18, p.241-248, 1980.

95. JAHN, G.A., MACHIAVELLI, G.A., KALBERMANN, L.E. et al. Relationships among release of prolactin, synthesis of DNA and growth of the anterior pituitary gland of the rat: effects of oestrogen and sulpiride. Journal of Endocrinology, v.94, p.1-10, 1982.
96. JAHN, G.A. e DEIS, R.P. Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. Journal of Endocrinology, v.110, p.423-428, 1986.
97. JONES, T.H., BROWN, B.L., DOBSON, P.R.M. Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion. Journal of Endocrinology, v.127, p.5-13, 1990.
98. JORDAN, V.C., KOERNER, S., ROBINSON, C. Inhibition of oestrogen-stimulated prolactin release by anti-oestrogens. Journal of Endocrinology, v.65, p.151-152, 1975.
99. JORDAN, V.C. e KOERNER, S. Tamoxifen as an anti-tumor agent: role of oestradiol and prolactin. Journal of Endocrinology, v.68, p.305-311, 1976.
100. JORDAN, V.C. e MURPHY, C.S. Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. Endocrine Reviews, v.11, p.578-610, 1990.
101. JUDD, S.J., RIGG, L.A., YEN, S.S.C. The effects of ovariectomy and estrogen treatment on the dopamine inhibition of gonadotropin and prolactin release. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.49, p.182-184, 1979.
102. KALBERMANN, L.E., SZIJAN, I., BURDMAN, J.A. Cell proliferation in the rat pituitary gland: a mechanism of control in prolactin cells. Experientia, v.35, p.689-691, 1979.
103. KALBERMANN, L.E., MACHIAVELLI, G.A., DE NICOLA, A.F. et al. Synthesis of DNA in oestrogen-induced pituitary tumours in rats: effect of bromocriptine. Journal of Endocrinology, v.87, p.221-224, 1980.
104. KATZENELLENBOGEN, B.S., KATZENELLENBOGEN, J.A., FERGUSON, E.R. et al. Anti-estrogen interaction with uterine estrogen receptors. Journal of Biological Chemistry, v.253, p.697-707, 1978.

105. KEMENY, A.A., JACUBOWSKI, J., STAWOWY, A. et al. Changes of blood flow in oestrogen-induced hyperplastic anterior pituitary lobe following bromocriptine administration. British Journal of Neurosurgery, v.1, p.243-250, 1987.
106. KIINO, D.R. e DANNIES, P.S. Insulin and 17beta-estradiol increase the intracellular prolactin content of GH4C1 cells. Endocrinology, v.109, p.1264-1269, 1981.
107. KING, W.J. e GREENE, G.L. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature, v.307, p.745-747, 1984.
108. KOIZUMI, K. e AONO, T. Pregnancy after combined treatment with bromocriptine and tamoxifen in two patients with pituitary prolactinomas. Fertility and Sterility, V.46, p.312-314, 1986.
109. KOVACS, K., HORVATH, E., ILSE, R.G. et al. Spontaneous pituitary adenomas in aging rats. A light microscopic, immunocytochemical and fine structural study. Beitrag Pathologischem Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, v.161, p.1-16, 1977.
110. KOVACS, K., ILSE, G., RYAN, N. et al. Pituitary prolactin cell hiperplasia. Hormone Research, v.12, p.87-95, 1980.
111. KOVACS, K. e HORVATH, E. Tumors of the pituitary gland. The Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1986. (Atlas of Tumor Pathology, 21).
112. KREY, L.C. e KAMEL, F. Estradiol processing by pituitary cells in culture: an examination of the influences of various exposures to progesterone. Life Sciences, v.47, p.1235-1241, 1990.
113. KUTTENN, F., FOURNIER, S., DURAND, J.C. et al. Estradiol and progesterone receptors in human breast fibroadenomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.52, p.1225-1229, 1981.
114. LAMBERTS, S.W.J., UITTERLINDEN, P., ZUIDERWIJK-ROEST, J.M. et al. Effects of a luteinizing hormone-releasing hormone analog and tamoxifen on the growth of an estrogen-induced prolactin-secreting rat pituitary tumor and its influence on pituitary gonadotropins. Endocrinology, v.108, p.1878-1884, 1981.

115. LAMBERTS, S.W.J., VERLEUN, T., OOSTEROM, R. Effect of tamoxifen administration on prolactin release by invasive prolactin-secreting pituitary adenomas. Neuroendocrinology, v.34, p.339-342, 1982.
116. LAMBERTS, S.W.J., VERLEUN, T., HOFLAND, L. et al. Differences in the interaction between dopamine and estradiol on prolactin release by cultured normal and tumorous human pituitary cells. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.63, p.1342-1347, 1986.
117. LAMBERTS, S.W.J. e VERLEUN, T. Differences in the mechanism of the inhibitory actions of catecholestrogens, tamoxifen and high concentrations of estrogens on prolactin release by cultured rat pituitary tumor cells. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, v.23, p.1117-1123, 1987.
118. LAMBERTS, S.W.J. e MAC LEOD, R.M. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. Physiological Reviews, v.70, p.279-318, 1990.
119. LANDOLT, A.M., DEL POZO, E., HAYEK, J. Injectable bromocriptine to treat acute, oestrogen-induced swelling of invasive prolactinoma. Lancet, v.2, p.111, 1984.
120. LANDOLT, A.M., OSTERWALDER, V., LANDOLT, T.A. Storage and release of secretory granules in human prolactinomas: modification by bromocriptine. Journal of Endocrinology, v.113, p.495-499, 1987.
121. LANE, G., SIDDLE, N.C., RYDER, T.A. et al. Effects of dydrogesterone on the oestrogenized postmenopausal endometrium. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, v.93, p.55-62, 1986.
122. LAUDON, M., GROSSMAN, D.A., BEN-JONATHAN, N. Prolactin-releasing factor: cellular origin in the intermediate lobe of the pituitary. Endocrinology, v.126, p.3185-3192, 1990.
123. LEONG, D.A., LAU, S.K., SINHA, Y.N. et al. Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat. Endocrinology, v.116, p.1371-1378, 1985.

124. LESSER, R.L., ZHEUTLIN, J.D., BOGHEN, D. et al. Visual function improvement in patients with macroprolactinomas treated with bromocriptine. American Journal of Ophthalmology, v.109, p.535-543, 1990.
125. LIEBERMAN, M.E., MAURER, R.A., GORSKI, J. Estrogen control of prolactin synthesis in vitro. Biochemistry, v.75, p.5946-5949, 1978.
126. LIEBERMAN, M.E., JORDAN, V.C., FRITSCH, M. et al. Direct and reversible inhibition of estradiol-stimulated prolactin synthesis by antiestrogens in vitro. Journal of Biological Chemistry, v.258, p.4734-4740, 1983.
127. LLOYD, H.M., MEARES, J.D., JACOBI, J. Effects of oestrogen and bromocriptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. Nature, v.255, p.497-498, 1975.
128. LLOYD, H.M., JACOBI, J.M., MEARES, J.D. DNA synthesis and depletion of prolactin in the pituitary gland of the male rat. Journal of Endocrinology, v.77, p.129-136, 1978.
129. LLOYD, R.V. Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. An immunohistochemical study. American Journal of Pathology, v.113, p.198-206, 1983.
130. LUCIAND, A.A., SHERMAN, B.M., CHAPLER, F.K. et al. Hyperprolactinemia and contraception: a prospective study. Obstetrics and Gynecology, v.65, p.506-510, 1985.
131. LUINE, V.N., McEWEN, B.S., BLACK, I.B. Effect of 17beta-estradiol on hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. Brain Research, v.120, p.188-192, 1977.
132. LYLE, S.F., WRIGHT, K., COLLINS, D.C. Comparative effects of tamoxifen and bromocriptine on prolactin and pituitary weight in estradiol-treated male rats. Cancer, v.53, p.1473-1477, 1984.
133. MAHEUX, R., JENICEK, M., CLEROUX, R. et al. Oral contraceptives and prolactinomas: a case-control study. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.143, p. 134-138, 1982.

134. MALET, C., GOMPEL, A., SPRITZER, P. et al. Effect of estradiol and the synthetic progestin promegestone (R5020) on the proliferation of human mammary cells in culture. Annals New York Academy of Sciences, v.464, p.489-492, 1986.
135. MALLMANN, E., SPRITZER, P. Effect of the progestin norethisterone acetate on prolactin secretion in hyper-prolactinemic women. (Submetido à publicação, 1992.)
136. MARCH, C.M., KLETZKY, D.A., DAVAJAN, V. et al. Longitudinal evaluation of patients with untreated prolactin-secreting pituitary adenomas. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.139, p.835-844, 1981.
137. MARTINEZ-CAMPOS, A., AMARA, J.F., DANNIES, P.S. Antiestrogens are partial estrogen agonists for prolactin production in primary pituitary cultures. Molecular and Cellular Endocrinology, v.48, p.127-133, 1986.
138. MASALA, A., DELITALA, G., LO DICO, G. et al. Inhibition of lactation and inhibition of prolactin release after mechanical breast stimulation in puerperal women given tamoxifen or placebo. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, v.85, p.134-137, 1978.
139. MATTHEIJ, J.A.M. e SWARTS, J.J.M. Circadian variations in the plasma concentration of prolactin in the adult male rat. Journal of Endocrinology, v.79, p.85-89, 1978.
140. MAURER, R.A. Bromoergocryptine-induced prolactin degradation in cultured pituitary cells. Biochemistry, v.19, p.3573-3578, 1980.(a)
141. MAURER, R.A. Dopaminergic inhibition of prolactin synthesis and prolactin messenger RNA accumulation in cultured pituitary cells. Journal of Biological Chemistry, v.255, p.8092-8097, 1980.(b)
142. MAURER, R.A. Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. Nature, v.294, p.94-97, 1981.
143. MAURER, R.A. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. Journal of Biological Chemistry, v.257, p.2133-2136, 1982.

144. MAURER, R.A., KIM, K.E., DAY, R.N. et al. Regulation of prolactin gene expression by estradiol. Molecular Endocrinology and Steroid Hormone Action, v.322, p.159-169, 1990.
145. McCOMB, D.J., HORVATH, E., KOVACS, K. et al. Enhanced responsiveness of lactotrophs in ectopic pituitaries to bromocryptine and estrone acetate. Acta Anatomica, v.110, p.113-120, 1981.
146. McCOMB, D.J., HELLMANN, P., KOVACS, K. et al. Spontaneous sparsely-granulated prolactin-producing pituitary adenomas in aging rats. Neuroendocrinology, v.41, p.201-211, 1985.
147. McCOMB, D.J., HELLMANN, P., THORNER, M.O. et al. Morphologic effects of bromocryptine on spontaneously occurring pituitary prolactin-cell hyperplasia in old Long-Evans rats. American Journal of Pathology, v.122, p.7-16, 1986.
148. McEUEEN, C.S., SELYE, H., COLLIP, J.B. Some effects of prolonged administration of oestrin in rats. Lancet, v.1, p.775-776, 1936.
149. MCGREGOR, A.M., SCANLON, M.F., HALL, R. et al. Effects of bromocryptine on pituitary tumours size. British Medical Journal, v.2, p.700-703, 1979.
150. MELMED, S. Bromocryptine inhibits colony formation by rat pituitary tumor cells in a double-layered agar clonogenic assay. Endocrinology, v.109, p.2258-2260, 1981.
151. MISHELL, D.R., KLETZKY, O.A., BRENNER, P.F. et al. The effect of contraceptive steroids on hypothalamic-pituitary function. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.128, p.60-74, 1977.
152. MOLITCH, M.E., ELTON, R.L., BLACKWELL, R.E. et al. Bromocryptine as primary therapy for prolactin-secreting macroadenomas: results of a prospective multicenter study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.60, p.698-705, 1985.
153. MOLITCH, M.E. Pregnancy and the hyperprolactinemic woman. New England Journal of Medicine, v.312, p.1364-1370, 1985.

154. MORI, H., MAEDA, T., SAITOH, Y. et al. Changes in prolactinomas and somatotropinomas in humans treated with bromocriptine. Pathology, Research and Practice, v.183, p.580-583, 1988.
155. MOSTER, M.L., SAVINO, P.J., SCHATZ, N.J. et al. Visual function in prolactinoma patients treated with bromocriptine. Ophthalmology, v.92, p.1332-1341, 1985.
156. MOULT, P.J.A., DACIE, J.E., REES, L.H. et al. Oral contraception in patients with hyperprolactinemia. British Medical Journal, v.284, p.868, 1982.
157. MURAI, I. e BEN-JONATHAN, N. Posterior pituitary lobectomy abolishes the suckling-induced rise in prolactin (PRL): evidence for a PRL-releasing factor in the posterior pituitary. Endocrinology, v.121, p.205-211, 1987.
158. MURAI, I. e BEN-JONATHAN, N. Acute stimulation of prolactin release by estradiol: mediation by the posterior pituitary. Endocrinology, v.126, p.3179-3184, 1990.
159. NAFTOLIN, F., MacLUSKI, N.J., LERANTH, C.Z. et al. The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. Journal of Steroid Biochemistry, v.30, p.195-207, 1988.
160. NAGY, I., VALDENEGRO, C.A., MAC LEOD, R.M. Effect of antiestrogens on pituitary prolactin production in normal and pituitary tumor-bearing rats. Neuroendocrinology, v.30, p.389-395, 1980.
161. NICOLL, C.S. e MEITES, J. Estrogen stimulation of prolactin production by rat adenohypophysis in vitro. Endocrinology, v.70, p.272-277, 1962.
162. NIWA, J., MINASE, T., HASHI, K. et al. Immunohistochemical, electron microscopic studies of estrogen-induced rat prolactinomas after bromocriptine treatment. Virchows Archiv. B. Cell Pathology, v.53, p.89-96, 1987.
163. NOGAMI, H. e YOSHIMURA, F. Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. Anatomical Record, v.202, p.261-274, 1982.

164. NOGAMI, H. Fine-structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. Cell and Tissue Research, v.237, p.195-202, 1984.
165. NOGAMI, H., YOSHIMURA, F., CARRILLO, A.J. et al. Estrogen induced prolactin mRNA accumulation in adult male rat pituitary as revealed by in situ hybridization. Endocrinologia Japonica, v.32, p.625-634, 1985.
166. OLIVEIRA, M.C. Efeitos da administração crônica de agentes antidopaminérgicos sobre a hipófise, avaliados através da imuno-histoquímica. Tese de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Porto Alegre, 1989.
167. OLIVEIRA, M.C. Prolactinomas e gravidez. Revista AMRIGS, v.35, p.216-218, 1991.
168. OLIVEIRA, M.C., SPRITZER, P., POY, M., CORONEL, A.X., DAHLEM, N., MORAES, J.T., BARBOSA-COUTINHO, L.M. Progesterin effect on prolactin secretion and immunoreactive prolactin cells in estradiol-treated ovariectomized rats. (Submetido à publicação, 1992.)
169. PANSINI, F., BIANCHI, A., ZITO, V. et al. Blood prolactin levels: influence of age, menstrual cycle and oral contraceptives. Contraception, v.28, p.201-207, 1983.
170. PANTEON, E., LOUMAYE, E., MAES, M. et al. Occurrence of prolactinoma after estrogen treatment in a girl with constitutional tall stature. Clinical and Laboratory Observations, v.113, p.337-339, 1988.
171. PASTEELS, J.L., DANGUY, A., FRÉROTTE, M. et al. Inhibition de la sécrétion de prolactine par l'ergocornine et la 2-BR-alfa-ergocryptine: action directe sur l'hypophyse en culture. Annales D'Endocrinologie, v.32, p.188-192, 1971.
172. PAWLIKOWSKI, M., KUNERT-RADEK, J., STEPIÉN, H. Direct antiproliferative effect of dopamine agonists on the anterior pituitary gland in organ culture. Journal of Endocrinology, v.79, p.245-246, 1978.

173. PEILLON, F., VILA-PORCILE, E., OLIVER, L. et al. L'action des oestrogènes sur les adenomes hypophysaires chez l'homme. Documents histopathologiques en microscopie optique et électronique et apport de l'experimentation. Annales D'Endocrinologie, v.31, p.259-270, 1970.
174. PÉREZ, R.L., MACHIARELLI, G.A., ROMANO, M.I. et al. Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin-secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats. Journal of Endocrinology, v. 108, p.399-403, 1986.
175. PHELPS, C. J. e HIMER, W. C. Effects of bromocriptine on prolactin cellular hypertrophy, proliferation and secretory activity in diethylstilbestrol-induced pituitary tumors. Molecular and Cellular Endocrinology, v.58, p.137-148, 1988.
176. PICHON, M., BRESSION, D., PEILLON, F. et al. Estrogen receptors in human pituitary adenomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.51, p.897-902, 1980.
177. PITUITARY ADENOMA STUDY GROUP. Pituitary adenomas and oral contraceptives: a multicenter case-control study. Fertility Society, v.39, p.753-760, 1983.
178. POWERS, C.A., HATALA, M.A., PAGANO, P.J. Differential responses of pituitary Kallikrein and prolactin to tamoxifen and chlorotrianisene. Molecular and Cellular Endocrinology, v.66, p.93-100, 1989.
179. PRIOR, J.C., COX, T.A., FAIRHOLM, D. et al. Testosterone-related exacerbation of a prolactin producing macroadenoma: possible role for estrogen. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.64, p.391-394, 1987.
180. PRYSOR-JONES, R.A. e JENKINS, J.S. Effect of bromocriptine on DNA synthesis, growth and hormone secretion of spontaneous pituitary tumours in the rat. Journal of Endocrinology, v.88, p.463-469, 1981.
181. PRYSOR-JONES, R.A., SILVERLIGHT, J.J., JENKINS, J.S. Effect of tamoxifen on growth and prolactin secretion of rat pituitary tumours. Journal of Endocrinology, v.97, p.261-266, 1983.

182. PRYSOR-JONES, R.A., SILVERLIGHT, J.J., KENNEDY, S.J. et al. Vasoactive intestinal peptide and the stimulation of lactotroph growth by oestradiol in rats. Journal of Endocrinology, v.116, p.259-265, 1988.
183. RAD, I.M. e MAHESH, V.B. Role of progesterone in the modulation of the preovulatory surge of gonadotropins and ovulation in the pregnant mare's serum gonadotropin-primed immature rat and the adult rat. Biology of Reproduction, v.35, p.1154-1161, 1986.
184. RASMUSSEN, C. BERGH, T., WIDE, L. Prolactin secretion and menstrual function after long-term bromocriptine treatment. Fertility and Sterility, v.48, p.550-554, 1987.
185. RAYMOND, V. BEAULIEU, M. LABRIE, F. et al. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. Science, v.200, p.1173-1175, 1978.
186. REICHLIN, S. Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. Advances in the Biosciences, v.69, p.277-292, 1988.
187. REIER, P.J., MORISHIGE, W.K., ROTHCHILD, I. The effect of ether and laparotomy on serum prolactin levels in progesterone-treated intact and ovariectomized rats. Neuroendocrinology, v.16, p.43-51, 1974.
188. RENGACHARY, S.S., TOMITA, T., JEFFERIES, B.F. et al. Structural changes in human pituitary tumor after bromocriptine therapy. Neurosurgery, v.10, p.242-251, 1982.
189. REYNIK, J.V. WENOF, M. AUBERT, J.M. et al. Incidence of hyperprolactinemia during oral contraceptive therapy. Obstetrics & Gynecology, v.55, p.8-11, 1980.
190. ROGOL, A.D. e ROSEN, S.W. Prolactin of apparent large molecular size: the major immunoreactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.38, p.714-717, 1974.
191. RYAN, R., SHUPNIK, M.A., GORSKI, J. Effect of estrogen on preprolactin messenger ribonucleic acid sequences. Biochemistry, v.18, p.2044-2048, 1979.

192. SAR, M. e MEITES, J. Changes in pituitary prolactin release and hypothalamic PIF content during the estrous cycle of rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v.125, p.1018-1021, 1967.
193. SAR, M. Estradiol is concentrated in tyrosine-hydroxylase-containing neurons of the hypothalamus. Science, v.223, p.938-940, 1984.
194. SARKAR, D.K., GOTTSCHALL, P.E., MEITES, J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. Science, v.218, p.684-686, 1982.
195. SARTOR, P., VACHER, P., MOLLARD, P. et al. Tamoxifen reduces calcium currents in a clonal pituitary cell line. Endocrinology, v.123, p.534-540, 1988.
196. SCHAISON, G. Aménorrhée après contraception orale. Nouvelle Presse Medicale, v.9, p.3083-3086, 1980.
197. SCHECHTER, J., AHMAD, N., ELIAS, K. et al. Estrogen-induced tumors: changes in the vasculature in two strains of rat. American Journal of Anatomy, v.179, p.315-323, 1987.
198. SCHECHTER, J., GOLDSMITH, P., WILSON, C. et al. Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.67, p.713-719, 1988.
199. SCHECHTER, J. e WEINER, R. Changes in basic fibroblast growth factor coincident with estradiol-induced hyperplasia of the anterior pituitaries of Fischer-344 and Sprague-Dawley rats. Endocrinology, v.129, p.2400-2408, 1991.
200. SCHLECHTE, J., DOLAN, K., SHERMAN, B. et al. The natural history of untreated hyperprolactinemia: a prospective analysis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.68, p.412-418, 1989.

201. SCHMIDT-GOLLWITZER, M., EILETZ, J., GENZ, T. et al. Determination of estradiol, estrone, and progesterone in serum and myometrium: correlation with the content of sex steroid receptors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity throughout the menstrual cycle. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.49, p.370-376, 1979.
202. SCHREIBER, V., DUSKOVA, J., PRIBYL, T. et al. Metoclopramide potentiates the hypophyseal reactions to oestradiol. Physiologia Bohemoslovaca, v.33, p. 385-389, 1984.
203. SCHREIBER, V., PRIBYL, T., JAHODOVA, J. Dopaminergic antagonists potentiate the adenoypophyseal growth reaction to oestrogen: thioridazine is less effective than perphenazine. Physiologia Bohemoslovaca, v.36, p.9-13, 1987.
204. SCOTT, J.Z., KLETZKY, D.A., BRENNER, P.F. et al. Comparison of the effects of contraceptive steroid formulations containing two doses of estrogen on pituitary function. Fertility and Sterility, v.30, p.141-145, 1978.
205. SEGGIE, J.A. e BROWN, G.M. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, v.53, p. 629-637, 1975.
206. SELYE, H., COLLIP, J.B., THOMSON, D.L. Effect of oestrin on ovaries and adrenals. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v.32, p.1377-1381, 1935.
207. SEO, H., REFETOFF, S., VASSART, G. et al. Comparison of primary and secondary stimulation of male rats by estradiol in terms of prolactin synthesis and mRNA accumulation in the pituitary. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.76, p.824-828, 1979.
208. SHAAR, C.J., EUKER, J.S., RIEGLE, G.D. et al. Effects of castration and gonadal steroids on serum luteinizing hormone and prolactin in old and young rats. Journal of Endocrinology, v.66, p.45-51, 1975.

209. SHERMAN, B.M., SCHLECHTE J., HALMI, N.S. et al. Pathogenesis of prolactin-secreting pituitary adenomas. Lancet, v.2, p.1019-1021, 1978.
210. SHULL, J.D. e GORSKI, J. Estrogen regulation of prolactin gene transcription in vivo: paradoxical effects of 17betaestradiol dose. Endocrinology, v.124, p.279-285, 1989.
211. SHY, K.K., McTIERNAN, A.M., DALING, J.R. et al. Oral contraceptive use and the occurrence of pituitary prolactinomas. Journal of the American Medical Association, v.249, p.2204-2207, 1983.
212. SISAM, D.A., SHEEHAN, J.P., SHEELER, L.R. The natural history of the untreated microprolactinomas. Fertility and Sterility, v.48, p.67-71, 1987.
213. SITRUK-WARE, R., VARIN, C., CLAIR, F. et al. In vivo effects of progestins on prolactin secretion. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.60, p.575-578, 1985.
214. SKIDMORE, J.R., WALPOLE, A.L., WOODBURN, J. Effect on some triphenylethylenes on oestradiol binding in vitro to macromolecules from uterus and anterior pituitary. Journal of Endocrinology, v.52, p.289-298, 1972.
215. SMANIK, E.J., YOUNG, H.K., MULDOON, T.G. et al. Analysis of the effect of progesterone in vivo on estrogen receptor distribution in the rat anterior pituitary and hypothalamus. Endocrinology, v.113, p.15-22, 1983.
216. SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G. Statistical methods. 6 ed., Iowa, Iowa State University Press, 1967.
217. SOBRINHO, L.G., NUNES, M.C.P., SANTOS, M.A. et al. Radiological evidence for regression of prolactinoma after treatment with bromocriptine. Lancet, v.2, p.257-258, 1978.
218. SPONA, J., BIEGLMAYER, C., LEIBL, H. Estrogen interaction with the anterior pituitary of female rats. Differential cytosol binding, nuclear translocation and stimulation of RNA synthesis by 17beta-estradiol and tamoxifen. Biochimica et Biophysica Acta, v.633, p.361-375, 1980.

219. SPONA, J. e LEIBL, H. Inhibition by tamoxifen of estrogen-stimulated accumulation of preprolactin messenger ribonucleic acid. Biochimica et Biophysica Acta, v.656, p.45-54, 1981.
220. SPRITZER, P., DAHLEM, N., POY, M., OLIVEIRA, M.C., SILVA, I.S.B., ORSI, V., CERICATTO, R. Estradiol/tamoxifen interaction on prolactin secretion and DNA content of pituitary in ovariectomized adult rats. (Submetido à publicação, 1992.)(a)
221. SPRITZER, P., MALET, C., GOMPEL, A., LEYGUE, E., KUTTENN, F., MAUVAIS-JARVIS, P. Effect of normal human breast cells in culture. (Submetido à publicação, 1992.)(b)
222. STAWOWY, A., KEMENY, A.A., JAKUBOWSKI, J. Changes of blood flow un the adenohipophysis of normal and estrogen pretreated Fisher rats by tamoxifen. Acta Endocrinologica, v.121, p.821-826, 1989.
223. STONE, R.T., MAURER, R.A., GORSKI, J. Effect of estradiol-17beta on preprolactin messenger ribonucleic acid activity in the rat pituitary gland. Biochemistry, v.16, p.4915-4921, 1977.
224. SUH, H.K. e FRANTZ, A.G. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.39, p.928-935, 1974.
225. SUTHERLAND, R.L., MURPHY, L.C., FOO, M.S. et al. High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. Nature, v.288, p.273-275, 1980.
226. SUTHERLAND, R.L. e MURPHY, L.C. Mechanisms of oestrogen antagonism by nonsteroidal antioestrogens. Molecular and Cellular Endocrinology, v.25, p.5-23, 1982.
227. TAKAHASHI, S. e KAWASHIMA, S. Age-related changes in prolactin cell percentage and serum prolactin levels in intact and neonatally gonadectomized male and female rats. Acta Anatomica, v.113, p.211-217, 1982.

228. TAKAHASHI, S. e KAWASHIMA, S. Age-related changes in prolactin cells in male and female rats of the Wistar/TW strain. Journal of Sciences of the Hiroshima University, v.31, p.185-191, 1983.
229. TAKAHASHI, S., OKAZAKI, K., KAWASHIMA, S. Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and females rats of different ages. Cell and Tissue Research, v.235, p.497-502, 1984.
230. TATE, A.C., LIEBERMAN, M.E., JORDAN, V.C. The inhibition of prolactin synthesis in GH3 rat pituitary tumor cells by monohydroxitamoxifen is associated with changes in the properties of the estrogen receptor. Journal of Steroid Biochemistry, v.20, p.391-395, 1984.
231. TINDALL, G.T., KOVACS, K., HORVATH, E. et al. Human prolactin-producing adenomas and bromocriptine: a histological, immunocytochemical, ultrastructural, and morphometric study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.55, p.1178-1183, 1982.
232. TOFFLE, R.C., WEBB, S.M., TAGATZ, G.E. et al. Pregnancy-induced changes in prolactinoma as assessed with computed tomography. Journal of Reproductive Medicine, v.33, p.821-826, 1988.
233. TONEY, T.W. e KATZENELLENBOGEN, B.S. Antiestrogen action in the medial basal hypothalamus and pituitary of immature female rats: insights concerning relationships among estrogen, dopamine, and prolactin. Endocrinology, v.119, p.2661-2669, 1986.
234. TONEY, T.W. e KATZENELLENBOGEN, B.S. An evaluation of the interactions of antiestrogens with pituitary and striatal dopamine receptors. Journal of Receptor Research, v.7, p.695-712, 1987.
235. TONG, Y., SIMARD, J., LABRIE, C. et al. Inhibitory effect of androgen on estrogen-induced prolactin messenger ribonucleic acid accumulation in the male rat anterior pituitary gland. Endocrinology, v.125, p.1821-1828, 1989.

236. TONG, Y., ZHAO, H., LABRIE, F. et al. Effects of estrogens on the ultrastructural characteristics of female rat prolactin cells as evaluated by in situ hybridization in combination with immunogold staining technique. Neuroendocrinology, v.52, p.309-315, 1990.
237. TOPPER, Y.J. e FREEMAN, C.S. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiological Reviews, v.60, p.1049-1090, 1980.
238. TROUILLAS, J., GIROD, C., CLAUSTRAT, B. et al. Spontaneous pituitary tumors in the Wistar/Furth/ICO rat strain. An animal model of human prolactin adenoma. American Journal of Pathology, v.109, p.57-70, 1982.
239. TSENG, L. e GURPIDE, E. Estradiol and 20alpha-dihydroprogesterone dehydrogenase activities in human endometrium during the menstrual cycle. Endocrinology, v.94, p.419-423, 1974.
240. TSENG, L. e GURPIDE, E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. Endocrinology, v.97, p.825-833, 1975. (a)
241. TSENG, L. e GURPIDE, E. Effects of progestins on estradiol receptors levels in human endometrium. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.41, p.402-404, 1975. (b)
242. VAN NESSELROOIJ, J.H.J., BRUIJNTJES, J.P., VAN GARDEREN-HOETMER, A. et al. Magnetic resonance imaging compared with hormonal effects histopathology of estrogen-induced pituitary lesions in the rat. Carcinogenesis, v.12, p.289-297, 1991.
243. VAN PUTTEN, L.J.A. e KILIAAN, A.J. Immuno-electron-microscopic study of the prolactin cells in the pituitary gland of male Wistar rats during aging. Cell and Tissue Research, v.251, p.353-358, 1988.
244. VAN'T VERLAAT, J.W., GROUGHS, R.J.M., HENDRIKS, M.J. et al. Bromocriptine treatment of prolactin secreting macroadenomas: a radiological, ophthalmological and endocrinological study. Acta Endocrinologica, v.112, p.487-493, 1986.

245. VEKEMANS, M. e ROBYN, C. Influence of age on serum prolactin levels in women and men. British Medical Journal, v.4, p.738-739, 1975. (a)
246. VEKEMANS, M. e ROBYN, C. The influence of exogenous estrogen on the circadian periodicity of circulating prolactin in women. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.40, p.886-889, 1975. (b)
247. VICIAN, L., SHUPNIK, M.A., GORSKI, J. Effects of estrogen on primary ovine pituitary cell cultures: stimulation of prolactin secretion, synthesis, and preprolactin messenger ribonucleic acid activity. Endocrinology, v.104, p.736-743, 1979.
248. VOLKER, W., GEHRING, W.G., BERNING, R. et al. Impaired pituitary response to bromocriptine suppression: reversal after bromocriptine plus tamoxifen. Acta Endocrinologica, v.102, p.491-500, 1982.
249. VOOGT, J.L., CHEN, C.L., MEITES, J. Serum and pituitary prolactin levels before, during, and after puberty in female rats. American Journal of Physiology, v.218, p.396-399, 1970.
250. WEISENBERG, L.S., ORTI, E., PIROLI, G. et al. Hormonal effects on unoccupied estrogen receptors in nuclei of anterior pituitary glands. Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana, v.36, p.473-487, 1986.
251. WEISS, M.H., WYCOFF, R.R., YADLEY, R. et al. Bromocriptine treatment of prolactin-secreting tumors: surgical implications. Neurosurgery, v.12, p.640-642, 1983.
252. WELSHONS, W. V., LIEBERMAN, M.E., GORSKI, J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. Nature, v.307, p.747-749, 1984.
253. WEST, B. e DANNIES, P.S. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. Endocrinology, v.106, p.1108-1113, 1980.
254. WHITE, M.C., ROSENSTOCK, J., ANAPLIOTOU, M. et al. Heterogeneity of prolactin responses to oestradiol benzoate in women with prolactinomas. Lancet, v.1, p.1394-1396, 1981.

255. WHITEHEAD, M.I., TOWNSEND, P.T., PRYSE-DAVIES, J. et al. Effects of estrogens and progestins on the biochemistry and morphology of the postmenopausal endometrium. New England Journal of Medicine, v.305, p.1599-1605, 1981.
256. WIKLUND, J., WERTZ, N., GORSKI, J. A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. Endocrinology, v. 109, p.1700-1707, 1981.
257. WIKLUND, J. e GORSKI, J. Genetic differences in estrogen-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the rat pituitary: correlations with pituitary tumor susceptibility. Endocrinology, v.111, p.1140-1149, 1982.
258. WINGRAVE, S.J., KAY, C.R., VESSEY, M.P. Oral contraceptives and pituitary adenomas. British Medical Journal, v.1, p.685-686, 1980.
259. YEN, S.S.C., EHARA, Y., SILER, T.M. Augmentation of prolactin secretion by estrogen in hypogonadal women. Journal of Clinical Investigation, v.53, p.652-655, 1974.
260. YOSHINAGA, K., HAWKINS, R.A., STOCKER, J.F. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. Endocrinology, v.85, p.103-112, 1969.