



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

**PAPEL DA ANGIOTENSINA II NA RESPOSTA DA PROLACTINA AO
ESTRESSE EM RATAS LACTANTES**

Dissertação de Mestrado

Sara Cristina Sagae

Porto Alegre

2001

"É mais freqüente que a confiança seja gerada pela ignorância do que pelo conhecimento: são os que conhecem pouco, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência".

Charles Darwin

Aos meus pais, que fizeram com que tudo isso fizesse sentido.

Ao Irapuan, por existir, ser minha inspiração e dar colorido especial à minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu maior e incondicional amigo.

Ao orientador Gilberto Luis Sanvitto, pela amizade, paciência, pelos ensinamentos, por permitir que minhas idéias se tornassem realidade e principalmente por incentivar o meu lado como pesquisadora.

Ao professor Dr. Aldo Bolten Lucion, pela atenção e essencial colaboração.

Ao professor Dr. Celso Rodrigues Franci, pelo interesse e auxílio fundamental principalmente nas dosagens hormonais.

À professora Dr^a Janete A. Anselmo Franci, pelo carinho, sugestões, por compor a banca examinadora e pelo apoio em todas as dificuldades.

Aos demais componentes da banca examinadora Dr^a Carla Dalmaz e Dr. Alberto Rasia-filho pela atenção e essencial colaboração.

Ao amigo Charlis Raineiki, pelo companheirismo e apoio incondicional em todas as horas.

Ao Márcio Donadio pelo grande apoio tanto na parte prática quanto teórica e pela amizade.

À Márcia Bregeiron pela atenção e pela auxílio nas técnicas de estereotaxia e perfusão.

Ao Luciano Trevisan, pela ajuda e pelo empenho com que trabalhou todos os dias.

Aos meus inesquecíveis colegas de laboratório Carmen Gomes, Luciene Peixoto, Isabel Martins, Fabrício Macagnan, Elisa Wilkelmman, Anelise Todeschini, Gabriela Severino, Erica Hermel, Gabriela Pereira, Clarice Sândi, Francine Pereira, Ana Lúcia Cecconello, Angelo Piato e Ana Raquel pelo alegre convívio e pelo apoio nas mais diversas situações.

Aos demais alunos de iniciação científica, pela dedicação e colaboração.

Ao laboratório de Neuroanatomia, pelo empréstimo do vibrátomo para a realização dos cortes histológicos.

Às secretárias de pós-graduação Uíra e Miriam pela disponibilidade e empenho na resolução de todos os problemas.

À Sônia A. Zanon, Cleide Helena e à Rute A. Marcon pela ajuda indispensável nas dosagens hormonais.

Ao Vanderlon, ao Diego e demais funcionários do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde pelo cuidado com os animais.

Ao meu marido Irapuan Schneider Filho, pelo amor, apoio, compreensão e pela alegria admirável com que encara o dia a dia.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho e pelo incentivo essencial ao meu estudo.

À Andréa Miura da Costa, Lígia Tchaicka e Gleomar Maschio pela grande amizade e convivência.

Aos órgãos CAPES, FAPERGS, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Introdução.....	1
1.1 Angiotensina II.....	2
1.2 Adaptação ao estresse.....	3
1.3 Angiotensina II e estresse.....	4
1.4 Prolactina.....	5
1.5 Mecanismo de secreção de prolactina: influência da dopamina.....	6
1.6 Interação entre Ang II e secreção de prolactina.....	7
1.7 Secreção de prolactina em resposta ao estresse.....	8
1.8 Interação entre esteróides sexuais e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	9
1.9 Interação entre esteróides gonadais e a secreção de prolactina em resposta ao estresse.....	10
1.10 Lactação.....	11
Hipótese.....	14
Objetivos.....	15
Material e Métodos.....	16
Animais.....	16
Grupos experimentais.....	16
Anestesia.....	17
Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia para microinjeção no ARC.....	17

Estresse por éter.....	20
Coleta de sangue.....	20
Dosagens hormonais.....	20
Análise histológica da microinjeção.....	21
Análise estatística.....	21
Resultados.....	23
Discussão.....	31
Conclusões.....	37
Bibliografia.....	38

LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 1 (Método de estereotaxia).....19

FIGURA 2 (Esquema em corte coronal do encéfalo do rato).....22

RESULTADOS

FIGURA 3

Concentrações plasmáticas pré-estresse de estradiol em ratas no 7° e 20° dias de lactação.....25

FIGURA 4

Concentrações plasmáticas pré-estresse de progesterona em ratas no 7° e 20° dias de lactação.....26

FIGURA 5

Concentrações plasmáticas de prolactina em ratas no 7° e 20° dias de lactação.....27

FIGURA 6

Percentual da concentração plasmática de prolactina e progesterona em ratas no 20° dia de lactação em relação ao 7° dia de lactação.....28

FIGURA 7

Concentrações plasmáticas pré-estresse de prolactina, após o estresse e após microinjeção de salina ou losartan no núcleo arqueado em ratas lactantes no 7° dia de lactação.....29

FIGURA 8

Concentrações plasmáticas pré-estresse de prolactina, após o estresse e após a injeção de losartan no núcleo arqueado em ratas lactantes no 7° dia de lactação.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ang II – angiotensina II
- ARC- núcleo arqueado
- AVP – arginina-vasopressina
- E₂ – estradiol
- GABA – ácido γ -aminobutírico
- ME – Eminência mediana
- FSH – hormônio folículo-estimulante
- GnRH – hormônio de liberação de gonadotrofinas
- HPA- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- HPG – Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas
- ICV – intracerebroventricular
- LH - hormônio luteinizante
- OVX – ovariectomizadas
- P – progesterona
- PRL- prolactina
- PVN- núcleo paraventricular
- RAS – Sistema renina-angiotensina
- RNAm – RNA mensageiro
- SFO – órgão subfornicial
- SNC – Sistema Nervoso Central
- TIDA - dopaminérgico tuberoinfundibular
- TRH –hormônio estimulador de tireotrofina
- VIP – peptídeo vasoativo intestinal

RESUMO

Este trabalho investigou o efeito da Angiotensina II central na redução das concentrações de prolactina em ratas lactantes em resposta ao estresse e a influência dos esteróides gonadais nesse mecanismo. Ratas *Wistar* lactantes foram divididas em 2 grupos: fêmeas no 7° e 20° dias de lactação. Os grupos do 7° dia foram divididos em 4 subgrupos cada: A) fêmeas que não sofreram microinjeção no ARC e sem estresse; B) fêmeas sem microinjeção no arqueado e submetidas ao estresse; C) fêmeas submetidas à microinjeção de losartan no arqueado e ao estresse; D) fêmeas submetidas à microinjeção de solução salina no arqueado e ao estresse. Os grupos do 20° dia foram divididos em 3 subgrupos cada: A) fêmeas que não sofreram microinjeção no arqueado e sem estresse; B) fêmeas sem microinjeção no arqueado e submetidas ao estresse; C) fêmeas submetidas à microinjeção de losartan no arqueado e ao estresse. As microinjeções de losartan (0,2 µl, 10⁻⁹ M) e salina (0,2 µl) foram realizadas 3 dias após a canulação do arqueado e 15 minutos antes do estresse (vapores de éter por 1 minuto); 5 minutos após o estresse, os animais foram decapitados, o sangue coletado e o plasma foi utilizado para dosagem por radioimunoensaio de prolactina, progesterona e estradiol. Os resultados foram analisados pelo teste de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. A diferença entre duas médias foi testada pelo teste t de *Student*, com p<0,05 adotado como critério de significância. Ocorreu uma redução significativa nas concentrações basais de prolactina e progesterona em fêmeas no 20° em comparação ao 7° dia de lactação, enquanto que as concentrações basais de estradiol permaneceram inalteradas. O estresse agudo induziu uma redução nas concentrações de PRL em fêmeas no 7° e 20° dias, que foi impedida pela microinjeção de losartan no arqueado no 7° dia pós-parto. No 20° dia, contudo, o losartan falhou em impedir essa queda. Esses resultados demonstram que a Angiotensina II central possui efeito modulador na queda da secreção de prolactina em resposta a estresse agudo em ratas lactantes no 7° dia pós-parto, cujas concentrações de prolactina são elevadas; entretanto, isso parece não ser observado em ratas lactantes no 20° dia, cujas concentrações de prolactina e progesterona já estão significativamente reduzidas, indicando que esse efeito é dependente de progesterona e das concentrações de prolactina pré-estresse.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effects of central Angiotensin II on prolactin levels in lactating rats in response to stress and to verify the influence of gonadal steroids in this mechanism. Lactating *Wistar* rats were divided in two groups: females in 7th and 20th days of lactation. The groups of 7th day were divided in 4 subgroups: A) females that were not submitted to microinjection into arcuate nucleus and to stress; B) females without microinjection into arcuate nucleus and submitted to stress; C) females microinjected with losartan into the arcuate nucleus and submitted to stress; D) females microinjected with saline solution into arcuate nucleus and submitted to stress. The groups of 20th day were divided in 3 subgroups: A) females that were not submitted to microinjection into ARC and to stress; B) females without microinjection into arcuate nucleus and submitted to stress; C) females microinjected with losartan into the arcuate nucleus and submitted to stress. The microinjections of losartan and saline (0,2 µl) were realized 3 days after chronic guide cannulae were implanted into arcuate nucleus and 15 minutes before stress (eter vapour for 1 minute); 5 minutes after stress, the animals were decapitated, blood was collected and plasma concentrations of prolactin, progesterone and estradiol were determined by radioimmunoassay. Data (means ± SEM) were analyzed using an one-way ANOVA test. Pos hoc analyzes were performed using the *Newman-Keuls* test. The difference between 2 means were tested by *Student t* test. Statistic significance was defined as $p < 0,05$. A significant reduction were verified on basal prolactin and progesterone levels in females on 7th compared to 20th day of lactation, while basal E₂ levels were unchanged. Acute stress induced a reduction on prolactin levels in females on 7th and 20th days after parturition, that was hindered by Losartan microinjection into ARC on 7th day. On 20th day, however, losartan failed to impede this reduction. This results support the hypothesis that central Angiotensin II is one of the modulators of the reduction on prolactin secretion in response to acute stress in lactating rats on 7th day after parturition, when basal prolactin and progesterone levels are very high; however, it was not observed on lactating rats on 20th day, which basal prolactin and progesterone levels are significantly reduced, indicating that this effect seems to be dependent of progesterone and basal prolactin levels before stress.

INTRODUÇÃO

A Angiotensina II (Ang II) é um neuropeptídeo envolvido na regulação de várias funções, como a regulação da volemia (SAAVEDRA *et al.*, 1992; MCKINLEY *et al.*, 1996; SANVITTO *et al.*, 1997) e da função cardiovascular (ZHUO *et al.*, 1998) e contribui no controle da função reprodutiva pela regulação da secreção de hormônios da adenohipófise (PHILLIPS, 1987; SAAVEDRA *et al.*, 1992).

A prolactina (PRL) é um hormônio que possui uma grande importância fisiológica no período de lactação, por estimular o crescimento e o desenvolvimento das glândulas mamárias, síntese de leite e manutenção da secreção de leite. A secreção de leite é influenciada por vários fatores como a concentração de esteróides gonadais (DE PAUL, 1997) e estresse (MORISHIGE & ROTCHILD, 1960). A exposição de lactantes ao estresse cessa a secreção de leite pelas glândulas mamárias. Isso ocorre porque no período de lactação as concentrações plasmáticas de PRL que estão elevadas pelo estímulo da sucção dos mamilos é reduzida durante o estresse (GROSVENOR *et al.*, 1965; MOREHEAD & GALA, 1982; GALA & HAISENLENDER, 1986; BÁNKY *et al.*, 1994), inibindo desta forma, a produção de leite.

Um dos fatores que pode estar envolvido na queda de secreção de PRL em resposta a estresse é a Ang II, pois age como modulador da secreção de PRL (AGUILERA, 1982; MYERS & STEELE, 1981; 1989), está envolvida nas respostas adaptativas ao estresse (FITZSIMONS, 1980; SAAVEDRA *et al.*, 1986; CASTREN & SAAVEDRA, 1988) e parece modular a secreção de dopamina (DA) no núcleo arqueado (ARC) (STEELE, 1982; INOUE & NEGRO-VILAR, 1989), o principal fator inibidor da secreção de PRL (MOHANKUMAR & ZABAVINIK, 1993).

1.1 Angiotensina II

O octapeptídeo Ang II é sintetizado pela conversão de uma proteína circulante, o angiotensinogênio, por uma enzima denominada renina em Angiotensina I (Ang I), que é inativa. A Ang I então é convertida a Ang II pela ação de uma enzima denominada enzima conversora de angiotensina (FITZSIMONS, 1980; MORGAN *et al.*, 1996). A Ang II é sintetizada tanto periféricamente quanto centralmente. O SNC contém material genético para transcrição molecular de todos os componentes do sistema renina-angiotensina (RAS): RNAm para angiotensinogênio, para a enzima conversora de Angiotensina (LAFLAMME *et al.*, 1998), e para os sítios de ligação da Ang II (SANVITTO *et al.*, 1997).

Existem dois subtipos de receptores de Ang II identificados farmacologicamente: AT₁ e AT₂. Os receptores do tipo AT₁ se ligam especificamente ao antagonista Losartan de Ang II e os receptores do tipo AT₂ ligam-se especificamente aos compostos PD 123177 e CGP 42112 (SAAVEDRA, 1992; TIMMERMANS *et al.*, 1993). Embora ambos os tipos de receptores tenham sido detectados no cérebro (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991; TSUTSUMI *et al.*, 1993; JÖHREN & SAAVEDRA, 1996; JÖHREN *et al.*, 1997), o receptor AT₁ é o subtipo de receptor predominante em adultos (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991). Existem duas isoformas de receptor AT₁: AT_{1A} e AT_{1B}. Os subtipos AT_{1A} têm distribuição predominante no encéfalo (JÖHREN & SAAVEDRA, 1996), enquanto o subtipo AT_{1B}, na hipófise (LENKEI *et al.*, 1997). Receptores do tipo AT₁ de Ang II foram descobertos nos órgãos circunventriculares como órgão subfornicial (SFO), núcleo paraventricular (PVN), supraquiasmático, núcleo do trato solitário, núcleo hipotalâmico dorsomedial e ARC dorsomedial (SAAVEDRA, 1993; JÖHREN & SAAVEDRA, 1996; JÖHREN *et al.*, 1997). Estas áreas estão envolvidas nas funções centrais clássicas da Ang II, como a regulação da pressão, homeostase e liberação de hormônios da hipófise e todas essas funções são mediadas pelos receptores do tipo AT₁ de Ang II (SAAVEDRA, 1992).

1.2 Adaptação ao estresse

A experiência do estresse é comum a todos os seres vivos. A imposição ou percepção de mudanças físicas e ambientais, sejam negativas (ameaçadoras) ou positivas (recompensadoras) promove uma série de alterações fisiológicas que podem ser interpretadas como adaptativas ao organismo (HERMAN & WATSON, 1997). Estas alterações servem tanto para preparar o organismo, quanto para manter um equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso denominado homeostase (CHROUSOS & GOLD, 1992). Animais quando submetidos a estímulos estressantes têm uma rápida ativação dos sistemas neuroendócrinos como resposta, e uma reação que está bem estabelecida é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que, juntamente ao estado de alerta e o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) constitui o sistema de estresse. Este sistema é ativado durante o estresse (CHROUSOS *et al.*, 1998) e é controlado por uma série de moduladores que coordenam a secreção hormonal com a característica do estímulo e seu principal impacto fisiológico. Além disso, durante o estresse, várias mudanças ocorrem no Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico de mamíferos, que ajudam a preservar o indivíduo e a espécie.

Em ratos, são secretados arginina-vasopressina (AVP) e hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) pelo PVN (CHAPPELL *et al.*, 1986; IMAKI *et al.*, 1991), que estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise (WHITNAL, 1993). Aumentos subseqüentes de ACTH circulante então dirigem a síntese e a secreção de glicocorticóides pelo córtex das glândulas adrenais (HANDA *et al.*, 1994). Estresse prolongado promove grandes aumentos na expressão de RNA mensageiro (RNAm) para CRH (HERMAN & WATSON, 1995), e aumentos na expressão de CRH na lâmina externa da eminência mediana (ME) (WHITNAL, 1993), sugerindo um aumento na capacidade para ação de ACTH na glândula hipófise.

1.3 Angiotensina II e estresse

As ações do estresse e glicocorticóides sobre neuropeptídeos hipotalâmicos têm sido muito estudadas. Existem evidências que implicam um papel da Ang II na regulação das respostas ao estresse (FITZSIMONS, 1980; SAAVEDRA *et al.*, 1986; CASTREN & SAAVEDRA, 1988). Estudos demonstraram que o estresse aumenta os sítios de ligação para Ang II no ARC dorsomedial (SELTZER *et al.*, 1993), SFO e no PVN, e isso pode ocorrer devido a um aumento nas concentrações circulantes de Ang II e glicocorticóides (CASTREN & SAAVEDRA, 1988). O estresse por imobilização aumenta a atividade da renina plasmática (JINDRA, 1980), indicando uma ativação do RAS periférico. Além disso, a Ang II aumenta significativamente no plasma e no SNC após estresse agudo ou crônico (YANG *et al.*, 1996).

No hipotálamo, a Ang II está envolvida na regulação da secreção de corticosterona, hormônio luteinizante (LH), hormônio do crescimento (GH) e PRL (STEELE *et al.*, 1981; 1982; SAAVEDRA, 1992; GANONG, 1993).

O estresse é uma situação na qual a Ang II cerebral e periférica podem interagir na regulação da secreção de ACTH. A liberação de ACTH ocorre em resposta à redução no volume sanguíneo e estresse, os quais são modulados pela Ang II central e periférica (SAAVEDRA, 1992). O CRH e Ang II possuem uma ação aditiva na liberação de ACTH (VALE *et al.*, 1983). A Ang II estimula um aumento na secreção de CRH pelo PVN, o que por sua vez provoca um aumento na secreção de ACTH pela hipófise anterior (SPINEDI & NEGRO-VILAR, 1983). Em situações de estresse, a Ang II ainda induz a ativação da divisão autonômica do PVN, provocando um aumento na atividade do SNA simpático (JEZOVA *et al.*, 1998).

Além de induzir o aumento na secreção de CRH pelo PVN, a Ang II ainda controla a homeostase dos fluidos através de mecanismos como o estímulo da sede e da liberação de AVP em resposta ao estresse (FITZSIMONS, 1980; SAAVEDRA, 1992). Esse aumento da secreção de AVP e da sede induzido pela Ang II ocorre principalmente através da estimulação dos órgãos circumventriculares (PHILLIPS, 1987) como SFO (SANVITTO, 1997) pela Ang II.

Os efeitos da Ang II sobre o PVN parecem ser mediados pelos receptores

do tipo AT₁ de Ang II, que são amplamente distribuídos nestes núcleos (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991), especialmente nos neurônios que sintetizam e secretam CRH (AGUILERA *et al.*, 1995). Em contraste, o envolvimento do receptor do tipo 2 de Ang II na resposta ao estresse é menos conhecida. Entretanto, tanto RNAm para receptor AT₂ quanto os sítios de ligação para AT₂ têm sido identificados em várias regiões do cérebro (LENKEI *et al.*, 1997), por exemplo no locus coeruleus (LC). De fato, a exposição aguda a estressores neurogênicos induzem a expressão de RNAm para AT_{1A} e AT₂ no PVN e LC, respectivamente (DUMONT *et al.*, 1999).

1.4 Prolactina

A PRL é um hormônio protéico da adenohipófise que foi assim originalmente nomeada por sua habilidade em promover a lactação em fêmeas devido à variedade de efeitos que exerce sobre a glândula mamária. Além disso, está envolvida na função das glândulas ovarianas e pseudoprenhez em ratos fêmeas (LEONG *et al.*, 1980). Ao contrário do que foi originalmente descrito, a PRL não é sintetizada somente nos lactotrofos da glândula hipófise (BAKER & YU, 1977; BAKER & GROSS, 1978), mas também no SNC (FUXE *et al.*, 1977; GRIFFOND *et al.*, 1993;1994), útero (FRASOR *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 2000), placenta (HATTORI *et al.*, 1993; ROBERTSON *et al.*, 1994; 1996) e sistema imune (DRACA, 1995), onde possui papel modulador (HARTMANN *et al.*, 1989; MUKHERJEE *et al.*, 1990; DRACA, 1995; CHENG *et al.*, 2000), através de um efeito sobre a imunidade celular e humoral (FOSTER *et al.*, 2000; Mc MURRAY, 2000). Além de estar envolvida na reprodução (BOLE-FEYSOT, 1998), a PRL também participa no controle de uma variedade de comportamentos (DIJKSTRA *et al.*, 1992; ADITI *et al.*, 1994; TORNER *et al.*, 2001).

1.5 Mecanismo de secreção de prolactina: Influência da dopamina

A secreção de PRL está sob a influência de diversas substâncias como fatores de liberação e fatores de inibição da secreção de PRL. O estado reprodutivo do animal como ciclo estral e prenhez (ratas) / menstrual e gravidez (mulheres), e lactação, a concentração de hormônios esteróides e estímulos exteroceptivos como luz, estímulos sonoros e estresse também são fatores que influenciam a secreção de PRL. Uma grande quantidade de substâncias têm efeito estimulatório sobre a secreção de PRL como hormônio estimulador de tireotrofina (TRH) (TASHJIAN *et al.*, 1971), peptídeo vasoativo intestinal (VIP) (RUBERG *et al.*, 1978), serotonina (LARSON *et al.*, 1977), neurotensina (RIVIER *et al.*, 1977), Ang II periférica (STEELE *et al.*, 1981; 1982; MYERS & STEELE, 1989; 1991; SAAVEDRA, 1992;), bombesina (WESTENDORF, 1982), histamina (RICHARD *et al.*, 1991) e o peptídeo liberador de PRL (PrRP) (WATANOBE *et al.*, 2000).

Ainda não está bem esclarecido quais são as vias de regulação de secreção de PRL. Experimentos que investigam a secreção de PRL *in vivo* através de secções do infundíbulo ou lesões na ME demonstram que a influência hipotalâmica predominante sobre a secreção de PRL da hipófise anterior é inibitória (NEILL, 1974). O impulso para secretar PRL espontaneamente é reprimido pela ação de fatores de inibição de PRL hipotalâmicos sobre a hipófise. Existem vários fatores que possuem efeito inibitório sobre a secreção de PRL como o somatostatina (PATEL & SRIKANT, 1986), acetilcolina (CARMELIET & DENEFF, 1988), ácido γ -aminobutírico (GABA) (ENJALBERT *et al.*, 1979) e Ang II central (STEELE *et al.*, 1981; 1982; MYERS & STEELE, 1989; SAAVEDRA, 1992). Entretanto, existe uma grande quantidade de trabalhos estabelecendo a importância da DA como fator inibidor de PRL (BEN-JONATHAN *et al.*, 1979; NEILL, 1980; MOHANKUMAR *et al.*, 1997), em consequência da atividade dopaminérgica tuberoinfundibular (BEN-JONATHAN *et al.*, 1979; MOHANKUMAR *et al.*, 1997; ZABAVNIK *et al.*, 1993). Receptores de DA são encontrados nas membranas da hipófise (BROWN *et al.*, 1976; CREESE *et al.*, 1977), em particular nas membranas dos lactotrofos (GOLDSMITH *et al.*, 1979), e a DA é encontrada no plasma da haste hipofisial (BEN-JONATHAN *et al.*, 1977), em quantidade suficiente para inibir a secreção de PRL (GIBBS *et al.*, 1982).

A DA é sintetizada em corpos celulares localizados no ARC do hipotálamo e alcança a adenohipófise através de três vias dopaminérgicas distintas: (1) neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares (TIDA) partem do ARC e terminam nos capilares primários das veias portais longas na zona externa da ME, sendo transportada e liberada dos neurônios TIDA na adenohipófise (FUXE, 1964); (2) corpos celulares de neurônios TIDA estão localizados na porção rostral do núcleo arqueado e terminam tanto no lobo intermédio quanto no posterior da glândula hipófise (BJÖRKLUND *et al.*, 1973); (3) neurônios dopaminérgicos originam-se no núcleo periventricular do hipotálamo e terminam na adenohipófise (GOUDREAU *et al.*, 1995).

O ARC tem início na porção rostral do recesso tuberoinfundibular e continua ao longo das paredes desse recesso. Existem duas distintas subdivisões no ARC: a porção dorsomedial que contém neurônios de pequeno diâmetro e a porção ventrolateral que contém neurônios de tamanho médio. Muitos dos neurônios do ARC contém hormônios hipofisiotróficos que são liberados dos terminais localizados na eminência mediana dentro do sistema portal hipofiseal, que então os transporta até a adenohipófise (PAXINOS, 1995).

1.6 Interação entre Angiotensina II e secreção de prolactina

Numerosas observações demonstram claramente que a Ang II pode contribuir para a regulação fisiológica da secreção de PRL, tanto a Ang II central (MYERS & STEELE, 1989, 1991), quanto a Ang II sintetizada periféricamente (AGUILERA *et al.*, 1982; ANDERSON & CRONIN, 1990). Na hipófise anterior, a Ang II é sintetizada localmente e estimula a secreção de PRL (STEELE *et al.*, 1981; AGUILERA *et al.*, 1982; STEELE & MYERS, 1990). Por outro lado, a Ang II central possui efeito inibitório sobre a secreção de PRL (STEELE *et al.*, 1981; 1982; MYERS & STEELE, 1989, 1991). A Ang II central parece inibir a secreção de PRL através da liberação de DA, pela ativação de receptores em neurônios dopaminérgicos no ARC (JÖHREN *et al.*, 1997; MOUNZIH *et al.*, 1994). Ocorre um aumento agudo nas concentrações de DA no ARC após a injeção

intracerebroventricular (icv) de Ang II (STEELE *et al.*, 1982 ; INOUE & NEGRO-VILAR, 1989). Esse efeito é realizado através de receptores do tipo AT_{1A} de Ang II e é regulado pelas concentrações de esteróides gonadais, onde o tratamento de ratas ovariectomizadas (OVX) com estrógeno (E₂) e progesterona (P) produz um aumento nas concentrações desses receptores no ARC quando comparados a ratas OVX tratadas com placebo (JÖHREN *et al.*, 1997). Seltzer *et al.*, 1993 demonstraram que a P parece agir nos seus receptores localizados no ARC dorsomedial, onde induz a expressão de receptores AT₁ de Ang II, podendo desta forma promover um aumento da atividade do sistema Ang II no ARC, aumentando a atividade dopaminérgica, e conseqüentemente diminuindo a secreção de PRL. Além disso, durante estresse por contenção em ratos machos, quando as concentrações plasmáticas de PRL estavam aumentadas, o bloqueio dos receptores de Ang II promoveu aumento ainda maior na PRL plasmática (MYERS & STEELE, 1991), desta forma, a Ang II central parece ter um efeito limitante na magnitude da resposta da PRL ao estresse (STEELE, 1992).

1.7 Secreção de prolactina em resposta ao estresse

A PRL é um hormônio que responde prontamente a estímulos estressantes. Morishige & Rotchild, 1974 verificaram que a resposta da PRL ao estresse depende das concentrações de PRL pré-estresse no sangue. Se as concentrações hormonais são baixas antes da aplicação do estresse, o estresse promove uma elevação na PRL plasmática (NEILL, 1970; WAKABAIASHI *et al.*, 1971; EUKER *et al.*, 1975; TURPEN *et al.*, 1976; LEONG *et al.*, 1983; DEMAREST *et al.*, 1985; BÁNKY *et al.*, 1994; CALDEIRA & FRANCI, 2000; DAVE *et al.*, 2000) e esses efeitos dependem do tipo e da intensidade do estresse (RAUD , 1971; DU RUISEAU, 1978; CALIGARIS & TALEISNIK, 1983; FUJIKAWA *et al.*, 1995; POLETINI, 1998). Entretanto, se as concentrações de PRL são elevadas antes da aplicação do estresse, o estresse promove uma diminuição na concentração da PRL plasmática. Estudos demonstraram que o estresse por éter diminui as concentrações de PRL da hipófise quando aplicado durante a lactação

(GROSVENOR *et al.*, 1965; MOREHEAD & GALA, 1982; GALA & HAISENLENDER, 1986; BÁNKY *et al.*, 1994) e em ratas OVX tratadas com E₂ e P (CALIGARIS & TALEISNIK, 1983; POLETINI, 1998), cujas concentrações de PRL são bastante elevadas.

O aumento das concentrações de PRL provocado pelo estresse pode ser bloqueado pela administração de glicocorticóides em ratos machos castrados (EUKER *et al.*, 1975) e em ratas OVX tratadas com E₂ (SUBRAMANIAN & GALA, 1978), sugerindo que esse efeito é mediado pela corticosterona. Entretanto, em ratas lactantes e OVX tratadas com E₂ e P, a redução das concentrações de PRL parece não ser mediada pela corticosterona, uma vez que ratas adrenalectomizadas têm resposta similar à de ratas intactas (GALA & HAISENLENDER, 1982; BÁNKY *et al.*, 1994).

Desta forma, a PRL, juntamente com o ACTH podem ser considerados como bons índices quantitativos das respostas ao estresse (ARMARIO *et al.*, 1995). A importância fisiológica da secreção de PRL em resposta ao estresse ainda não está bem esclarecida, entretanto, devido ao seu papel na imunidade celular e humoral, pode possuir uma função imunomodulatória, protegendo desta forma o organismo das conseqüências do estresse (GALA, 1990), impedindo os efeitos deletérios provocados por substâncias como os glicocorticóides, que são produzidas quando o organismo é submetido a estresse (DORSHKIND & HORSEMAN, 2001).

1.8 Interação entre esteróides sexuais e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Está bem estabelecido que existem diferenças sexuais na atividade do eixo HPA, com um aumento na atividade em fêmeas (LE MEVEL *et al.*, 1979). A diferença parece ocorrer devido à influência dos esteróides sexuais femininos, uma vez que flutuações na atividade do eixo HPA ocorrem de acordo com o estágio do ciclo ovariano (CAREY *et al.*, 1995).

Existe uma íntima associação entre os eixos HPA e hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG). Essa associação é especialmente evidente durante o

funcionamento anormal de um dos eixos. Por exemplo, na ausência de ritmos circadianos adrenais que resultam em ciclos ovarianos irregulares (RAMALEY, 1975), o estresse possui um efeito inibitório na função reprodutiva (RIVIER & VALE *et al.*, 1984), e a esteroidogênese provoca uma regulação anormal do eixo HPA (BILLER *et al.*, 1990).

O possível mecanismo através do qual os esteróides sexuais modulam o eixo HPA é uma influência exercida pelos esteróides sexuais nos mecanismos de “feedback” negativo da corticosterona. Esses efeitos são mediados pelos receptores de glicocorticóides no hipocampo, hipotálamo e hipófise (de KLÖET, 1991).

Estudos evidenciam um efeito facilitatório do E₂ sobre a atividade do eixo HPA (VIAU, 1991; BURGESS & HANDA, 1992; CAREY *et al.*, 1995 ; CHROUSOS *et al.*, 1998). Tem sido demonstrado que o estradiol diminui tanto a ligação quanto a transcrição dos receptores de glicocorticóides no hipocampo, hipotálamo e adenohipófise, e isso tende a aumentar a atividade do eixo HPA por interferir no “feedback” negativo para glicocorticóides (PEIFFER *et al.*, 1991; BURGESS & HANDA, 1992). Por outro lado, a P parece exercer um efeito inibitório sobre o efeito facilitatório do E₂ (VIAU, 1991; PEIFFER *et al.*, 1991). Análises do citosol revelam que a P pode influenciar os receptores de mineralocorticóides no hipocampo. O tratamento com P resultou em diminuição na afinidade da ligação dos receptores de mineralocorticóides induzida por E₂ (CAREY *et al.*, 1995).

1.9 Interação entre esteróides gônadais e a secreção de PRL em resposta ao estresse

Está bem estabelecido que a idade, a hora do dia e os esteróides ovarianos podem influenciar o efeito do estresse por éter na secreção de PRL em ratos. Existem diferenças no eixo HPA em resposta à uma variedade de estímulos estressantes. Em ratos, as fêmeas respondem ao estresse de forma mais intensa que os machos (HANDA *et al.*, 1994). As condições hormonais das fêmeas podem alterar o perfil de secreção de PRL. Os esteróides ovarianos controlam os

aumentos na secreção de PRL não somente pelo estímulo da liberação pelos lactotrofos, mas também pela inibição da atividade das três populações de neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos (DeMARIA *et al.*, 2000).

O tratamento com E₂ estimula a secreção de PRL (CALIGARIS *et al.*, 1974), através da redução da resposta dos lactotrofos à dopamina (GUDELSKI *et al.*, 1981; FITCH & FREEMAN, 1996; CLOSE & FREEMAN, 1997; LIVINGSTONE *et al.*, 1998). Além disso, estimula as células da hipófise a produzir (ARBOGAST & VOOGT, 1994) e a secretar PRL (HASHI *et al.*, 1996) e promove um aumento na transcrição do gene da PRL (MAURER *et al.*, 1990; YEN & PAN, 1998). Entretanto, em situações de estresse em ratas OVX tratadas com E₂ e P, cujas concentrações plasmáticas de PRL pré-estresse são elevadas, o E₂ falha em induzir a secreção de PRL. Nesses modelos experimentais, em resposta a estresse, ocorre redução na concentração de PRL plasmática (CALIGARIS & TALESNIK, 1983).

A P também parece ter papel modulador na secreção de PRL (JAHN, 1986). Quando administrada com E₂, a P é capaz de adiantar e potencializar a secreção de PRL (CALIGARIS *et al.*, 1974; POLETINI, 1998). Após a injeção de progesterona em ratas OVX tratadas previamente com E₂ (CALIGARIS & TALESNIK, 1983; POLETINI, 1998) e ratas pseudoprenhas (MORISHIGE *et al.*, 1973), cujas concentrações plasmáticas de PRL estavam aumentadas devido à exposição prévia ao estresse, foi observado um declínio na PRL e o estresse falhou em afetar suas concentrações (CALIGARIS & TALESNIK, 1983; MORISHIGE *et al.*, 1973), sugerindo que as altas concentrações de P em condições de PRL alta podem ser um fator modulador da inibição da secreção de PRL induzida por estresse.

1.10 Lactação

A lactação é caracterizada por mudanças dramáticas no eixo HPA. Dentre os fatores que regulam a secreção de PRL, o estímulo da sucção, os hormônios esteróides e o estresse são os principais. Durante a lactação, entretanto, o

estresse falha em induzir o aumento na secreção de PRL (HIGUCHI *et al.*, 1989), promovendo a redução na secreção de PRL. A lactação em mulheres está associada com um único repertório endócrino caracterizado pelo aumento na secreção de ocitocina (OT) e PRL e pela supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (ALTEMUS *et al.*, 1995). Durante a primeira metade da lactação, são secretadas altas concentrações de P e PRL, e baixas concentrações de estrogênios, LH e hormônio folículo-estimulante (FSH) (TAYA & SASAMOTO, 1981; TAYA E GREENWALD, 1982). A sucção dos mamilos pelos filhotes é essencial para a manutenção das altas concentrações de PRL durante a lactação, que é caracterizado como um reflexo neuroendócrino dependente da intensidade do estímulo assim como do tamanho da ninhada. Na lactação, ocorre inibição da ovulação (HIGUCHI *et al.*, 1989; ABBUD & SMITH, 1991) e supressão da secreção do hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo induzida pela sucção dos mamilos (FOX & SMITH, 1984).

Estas mudanças são encontradas em todas as espécies de mamíferos, e uma série de estudos com ratas lactantes demonstram reduções significativas nas respostas endócrinas usuais ao estresse, incluindo diminuição de corticosterona (LIGHTMAN & YOUNG, 1989; WALKER *et al.*, 1992), catecolaminas (HIGUCHI *et al.* 1989), ocitocina (LIGHTMAN & YOUNG, 1989) e prolactina (GROSVENOR *et al.*, 1965; MOREHEAD & GALA, 1982; GALA & HAISENLENDER, 1986; BÁNKY *et al.* 1994). A diminuição da ação do eixo HPA durante a lactação pode ser responsável pelo aumento da função imune em mulheres pós-parto. Uma redução no “feedback” negativo para glicocorticóides em mediadores inflamatórios têm sido associados com respostas inflamatórias a antígenos estranhos em animais experimentais e a reatividade a estímulos inflamatórios parece ser aumentada em ratas lactantes (ALTEMUS *et al.*, 1995). Todas essas mudanças fisiológicas são necessárias para o sucesso no desenvolvimento dos filhotes.

O estímulo da sucção pelos filhotes responsável pelo aumento na secreção de PRL, envolve, pelo menos em parte, a supressão da atividade dopaminérgica tuberoinfundibular no ARC (de GREEF *et al.*, 1979; DEMAREST *et al.*, 1983; 1985; WANG *et al.*, 1993; HOFFMAN *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1998,1999). A síntese de DA, assim como a expressão da tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitante na

via da biossíntese de DA, estão significativamente reduzidas (WANG *et al.*, 1993; ESCALADA *et al.*, 1996), permitindo à adenohipófise expressar uma habilidade inerente para secretar PRL em um padrão muito alto (LEONG *et al.*, 1983). Outras evidências sugerem que a PRL liberada em resposta à sucção interfere na ligação da DA a seus receptores localizados na glândula hipófise ou que a sucção promove a liberação de um fator liberador de PRL, provocando desta forma um aumento nas concentrações plasmáticas de PRL (SHEWARD *et al.*, 1985).

Durante o período de lactação, estímulos estressantes promovem uma redução nas concentrações plasmáticas de PRL. Várias evidências demonstram que a Ang II é um neuropeptídeo que participa na regulação da secreção de PRL. Baseando-se nas evidências citadas anteriormente de que:

- ◆ A Ang II central possui efeito inibitório sobre a secreção de PRL;
- ◆ A Ang II aumenta significativamente no plasma e no SNC após estresse;
- ◆ O ARC possui receptores do tipo AT₁ de Ang II;
- ◆ A Ang II parece modular a secreção de dopamina através da ativação de seus receptores no hipotálamo;
- ◆ Os esteróides gonadais modulam a expressão dos receptores de Ang II;

formulou-se a hipótese de que a Ang II central participa na regulação da redução nas concentrações de PRL em resposta a estresse em ratas lactantes, podendo esta ação ser devida à interação com receptores AT₁ no ARC e da liberação de dopamina no sistema porta hipofiseal, sendo dependente das concentrações de progesterona plasmática. Para testar esta hipótese, avaliou-se o efeito da microinjeção de Losartan, um antagonista não-peptídico do receptor AT₁ de Ang II no ARC de ratas lactantes submetidas a estresse por éter em dois momentos da lactação que supostamente apresentam padrões diferenciados nas concentrações de PRL e P (7° e 20° dias de lactação).

OBJETIVO GERAL

Testar o efeito da microinjeção do antagonista AT₁ de Ang II, na secreção de prolactina em resposta a estresse agudo em ratas no 7° e 20° dias de lactação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

◆ Verificar as concentrações plasmáticas de prolactina, estrógeno e progesterona em ratas lactantes no 7° e 20° dias pós-parto;

◆ Avaliar o efeito do estresse agudo na secreção de prolactina em fêmeas no 7° e 20° dias de lactação;

◆ Investigar a participação da Ang II central sobre a concentração plasmática de prolactina em fêmeas no 7° e 20° dias de lactação, através da microinjeção do antagonista AT₁ de Ang II, relacionando com as concentrações de estrógeno e progesterona.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratas Wistar prenhas (peso corporal de 180-350g) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS foram mantidas em ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00 às 18:00 h) e temperatura ($24^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) controlados e livre acesso à água e ração. Alguns dias antes do parto, as fêmeas foram separadas em caixas individuais. O dia do parto foi designado como dia 0 de lactação e a ninhada foi ajustada para 8 filhotes. As fêmeas que tiveram menos de 8 filhotes não foram utilizadas no experimento.

Grupos experimentais

a) Grupo pré-estresse: sem implantação de cânulas e sem exposição ao éter, para dosagem das concentrações plasmáticas de PRL, aos 7 (n=12) e 20 (n=16) dias; P aos 7 (n=12) e 20 (n=10) dias; e E2 aos 7 (n=12) e 20 (n=10) dias de lactação;

b) Grupo estresse: sem implantação de cânulas e submetidos ao estresse, para dosagem de PRL aos 7 (n=14) e 20 (n=15) dias de lactação 5 minutos após o estresse;

c) Grupo estresse + salina: implantadas com cânulas-guia para microinjeção no ARC, microinjetados com solução salina no ARC e submetidos ao estresse, para dosagem de PRL aos 7 (n=17) e 20 (n=12) dias de lactação, 5 minutos após o estresse;

d) Grupo estresse + Losartan: implantadas com cânulas-guia para microinjeção no ARC, microinjetados com antagonista losartan de Ang II no ARC e submetidos ao estresse, para dosagem de PRL ao 7 (n=13) e 20 (n=18) dias de

lactação, 5 minutos após o estresse.

Anestesia

Os animais foram anestesiados via intramuscular com Xilasina (Ronpum) e Cloridrato de Ketamina (Francotar), ambos na dose de 100 mg/kg de peso corporal.

Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia para microinjeção no Arc

Três dias antes do experimento, cânulas-guia foram implantadas bilateralmente com o auxílio do aparelho estereotáxico de David Kopf. A cabeça era colocada em posição reta no aparelho e a mandíbula do animal era fixada de maneira firme, com pinos colocados no conduto auditivo externo e os dentes incisivos presos anteriormente (Fig. 1).

Após fixados no estereotáxico, os ratos foram submetidos à uma incisão longitudinal na pele, na linha média da região superior do crânio, expondo o periósteo, onde foi realizada técnica de trepanação, com o auxílio de uma broca. As cânulas possuíam comprimento de 15 mm e diâmetro externo de 0,6 mm. Para a localização precisa do núcleo, foi utilizado o atlas de cérebro de ratos (PAXINOS & WATSON, 1986) onde foram retiradas as medidas para o acesso cirúrgico. Foram utilizadas as seguintes coordenadas:

- ◆Antero-posterior: 3,6 mm
- ◆lateral: 3,0 mm
- ◆vertical: 8,0 mm

As medidas foram consideradas a partir da linha média do bregma como ponto zero. A medida da coordenada vertical foi considerada a partir das membranas meníngeas. A cânula, colocada obliquamente, com um ângulo de 17° ficava dois milímetros acima do ARC, e o acesso ao interior do núcleo era realizado com o auxílio de uma agulha injetora que atingia a medida vertical de

10,0 mm no cérebro. Após as cânulas serem introduzidas, foram fixadas com polímero sintético (acrílico) e com o auxílio de um pequeno parafuso acoplado ao tecido ósseo. Após 3 dias de canulação, no dia do experimento (7° e 20° dias pós-parto às 9 horas), os animais foram microinjetados lentamente com 0,2 µl de Losartan ($\{2\text{-n-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[2'-(1H-tetrazole-5-il bifenil-4-il) metil] imidazole}\}$) conhecido como Du Pont 753, Merck – EUA, 10^{-9} M (grupos Losartan 7° e 20° dias de lactação) ou 0,2 µl de solução salina (grupos salina 7° e 20° dias de lactação) no ARC, 15 minutos antes do estresse.

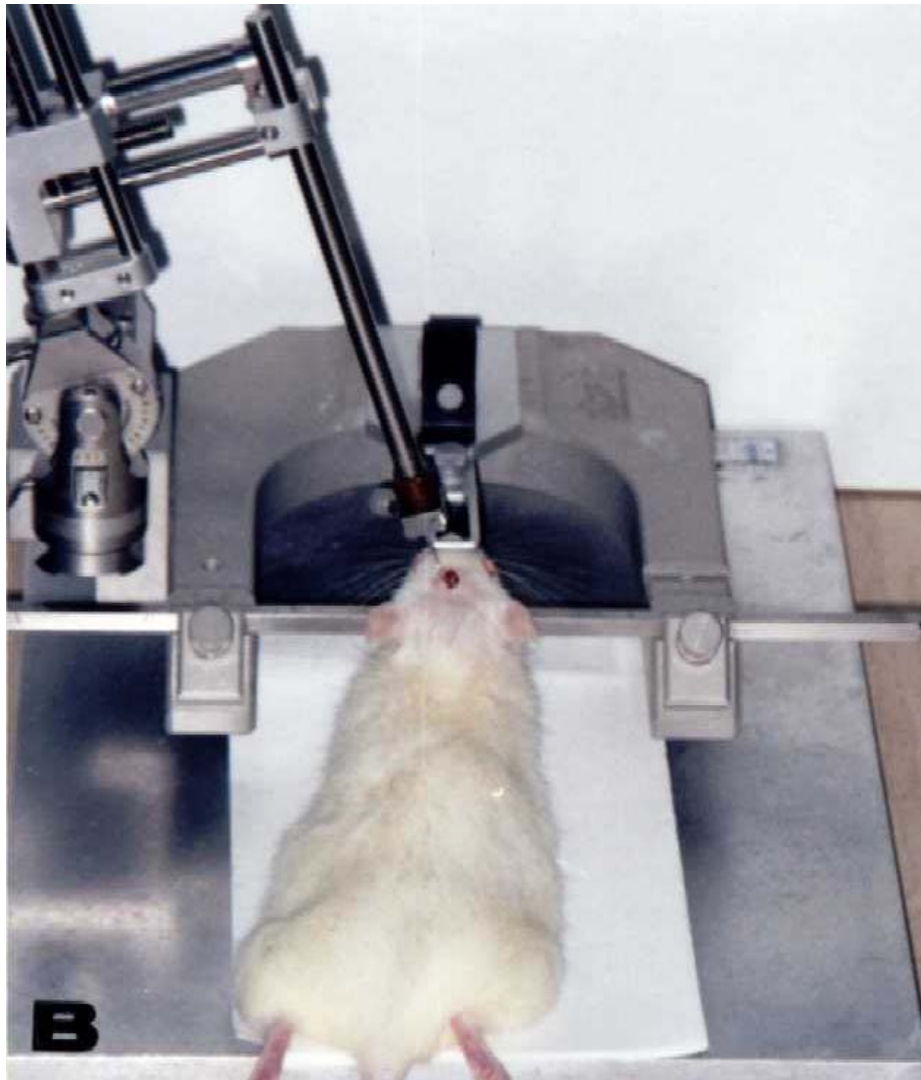


Figura 1: Representação da técnica de estereotaxia. (A) cabeça do animal fixada ao aparelho estereotáxico. (B) introdução da cânula-guia no cérebro com ângulo de 17° .

Estresse por éter

Os animais foram colocados em uma cuba de vidro fechada saturada com vapores de éter e permaneceram nesta atmosfera de éter por 1 minuto. Cinco minutos após o estresse, os animais foram mortos por decapitação.

Coleta de sangue

Após a decapitação, as amostras de sangue para as dosagens foram coletadas do tronco cerebral em ambiente silencioso, com funis e tubos de ensaio previamente heparinizados. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm à 5°C e o plasma isolado e estocado à -80°C.

Dosagens hormonais

As dosagens foram feitas por radioimunoensaio. Para os ensaios de PRL, foram utilizados *kits* específicos fornecidos pelo National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK – USA) e o anticorpo para precipitação foi produzido pelo laboratório do Dr. Celso R. Franci (FMRP-USP, Brasil). As amostras foram medidas em duplicata. Para os estrógenos e progesterona foram utilizados *kits* MAIA[®] da BIOCHEM IMMUNOSYSTEMS. Os limites mínimos para detecção de PRL, progesterona e estradiol foram de 0,09 ng/ml, 0,075 ng/ml e 07,5 pg/ml, respectivamente.

Análise histológica da microinjeção

Após a decapitação, os cérebros dos animais foram retirados e imersos em uma solução de formol 10% para processamento histológico e verificação da localização da injeção. Após fixados, os cérebros foram cortados em vibrátomo e corados com azul de toluidina. A análise histológica da injeção foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico e de um Atlas (PAXINOS & WATSON, 1986). Para o cálculo das médias somente foram utilizados os resultados dos animais cujas agulhas injetoras foram introduzidas no ARC (Fig. 2).

Análise Estatística: Os resultados foram analisados pelo teste de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. Para as comparações entre duas medias foi utilizado o teste t de *Student*; $p < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

RESULTADOS

Concentrações pré-estresse de PRL, P e E2 (basais)

Nas ratas lactantes no 7° e 20° dias de lactação, não houve diferença estatística entre as concentrações plasmáticas de E₂, que permaneceram baixas durante a lactação (figura 3).

As concentrações plasmáticas de P foram significativamente mais elevadas em fêmeas no 7° dia de lactação quando comparado com as de fêmeas no 20° dia de lactação, demonstrando uma redução de 57,5 %, como verificado nas figuras 4 e 6.

As concentrações plasmáticas de PRL sofreram uma redução de 65% no 20° dia de lactação quando comparado com fêmeas no 7° dia de lactação (Figuras 5 e 6).

Dessa forma, demonstra-se que ocorreu uma redução nas concentrações plasmáticas de PRL e P durante o período da lactação, efeito esse não observado nas concentrações de estradiol, que apresentou concentrações muito reduzidas nos dois momentos em que foram dosados (7° e 20° dias de lactação).

Efeito do estresse por éter sobre a concentração de PRL

O estresse agudo promoveu uma redução significativa (63,3%) nas concentrações plasmáticas de PRL aos 7 dias de lactação (figura 7).

No 20° dia de lactação, o estresse também induziu uma diminuição das concentrações de PRL, e essa redução foi estatisticamente significativa (69,4%) (figura 8).

Para testar um possível efeito do procedimento de canulação sobre a resposta de PRL ao estresse, foram comparadas as concentrações de PRL nos animais sem canulação e com microinjeção de salina no ARC no 7° dia de lactação (concentração de PRL mais elevada). Os animais estressados (com e

sem microinjeção) apresentaram concentrações semelhantes de PRL plasmática (figura 7).

A figura 7 apresenta ainda a comparação entre as médias de PRL plasmática de ratas estressadas e pré-injetadas com antagonista AT₁ no 7º dia de lactação. A diminuição nas concentrações de PRL promovida pelo estresse não foi observada nos animais tratados com losartan), indicando que o losartan microinjetado no ARC impede a queda nas concentrações de PRL induzida pelo estresse.

Por outro lado, em fêmeas no 20º dia de lactação, observou-se o mesmo padrão de diminuição nas concentrações de PRL induzido pelo estresse com ou sem tratamento com losartan, demonstrando que o Losartan aparentemente não modificou essa resposta ao estresse (figura 8).

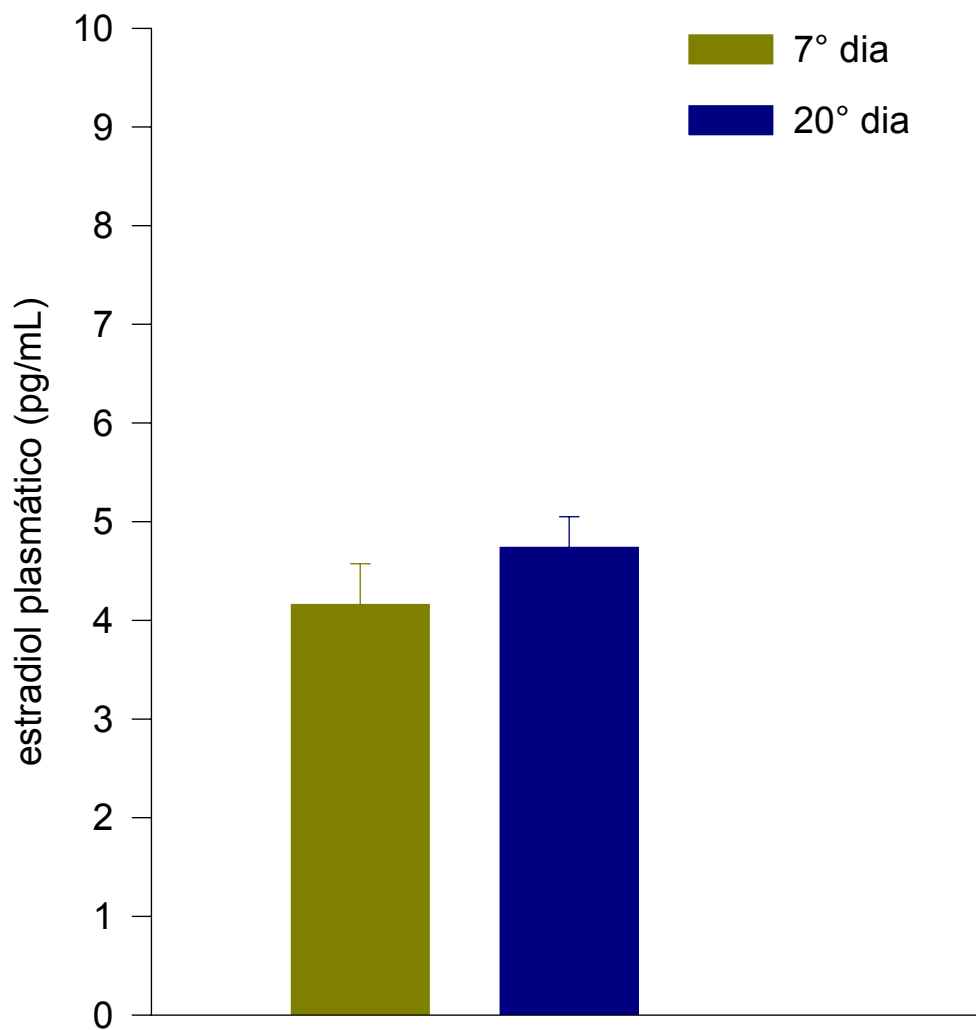


Figura 3 - Concentrações plasmáticas pré-estresse de estradiol (pg/ml \pm EPM) em ratas no 7° dia de lactação (8 filhotes por ninhada, n=12) e no 20° dia de lactação (8 filhotes por ninhada, n=10).

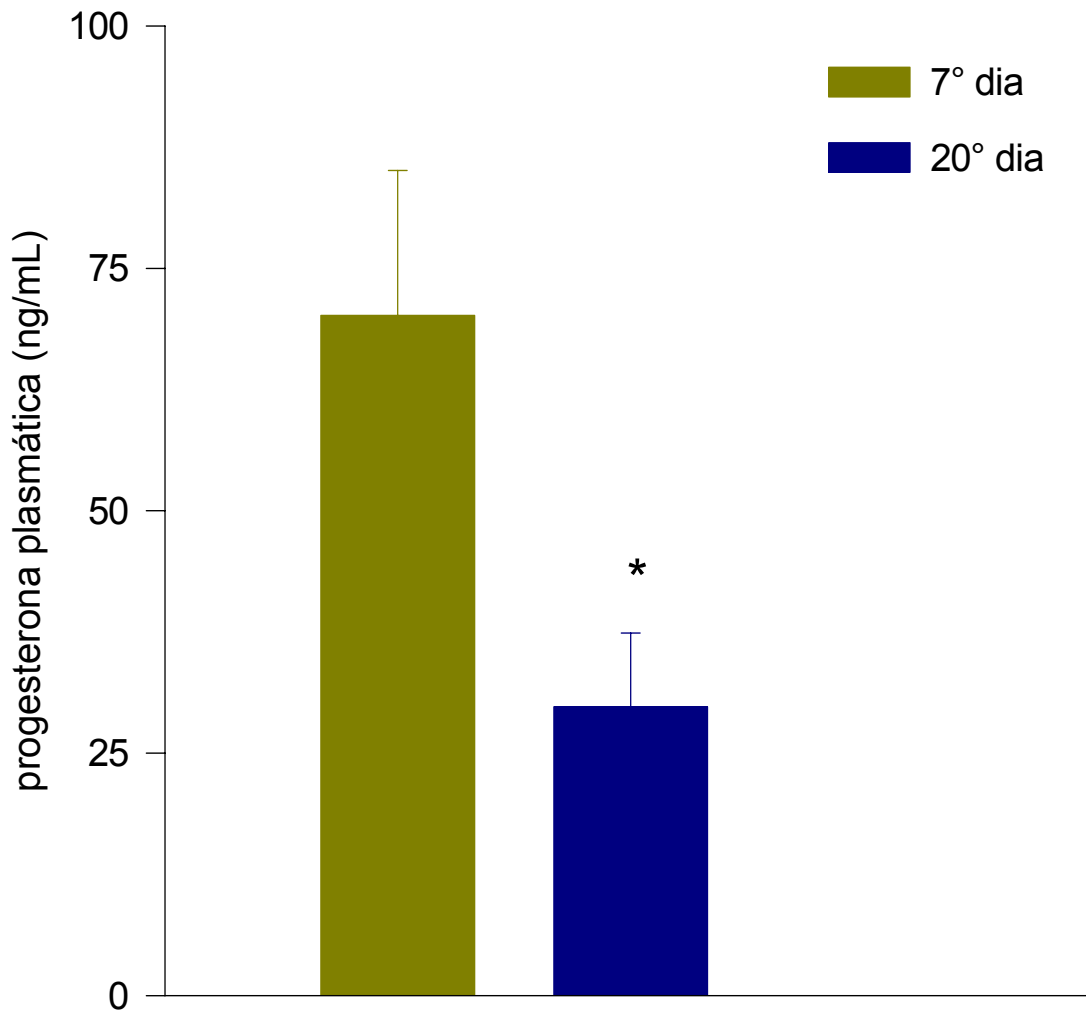


Figura 4 - Concentrações plasmáticas pré-estresse de Progesterona (ng/ml \pm EPM) em ratas no 7° dia de lactação (8 filhotes por ninhada, n=12) e no 20° dia de lactação (8 filhotes por ninhada, n=10). * ($p < 0,05$).

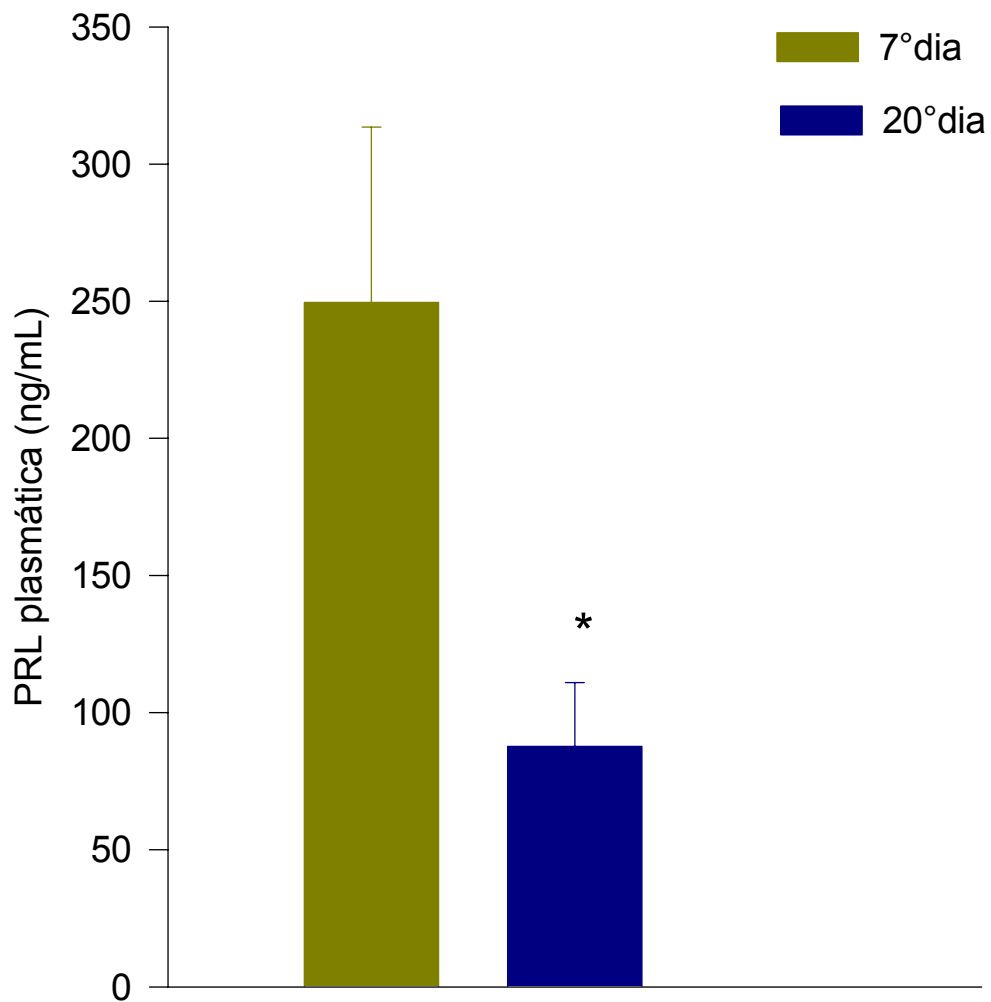


Figura 5 - Concentrações plasmáticas pré-estresse de PRL (ng/ml \pm EPM) em ratas no 7º dia de lactação (8 filhotes por ninhada, n=12) e no 20º dia de lactação (8 filhotes por ninhada, n=16). * ($p < 0,05$).

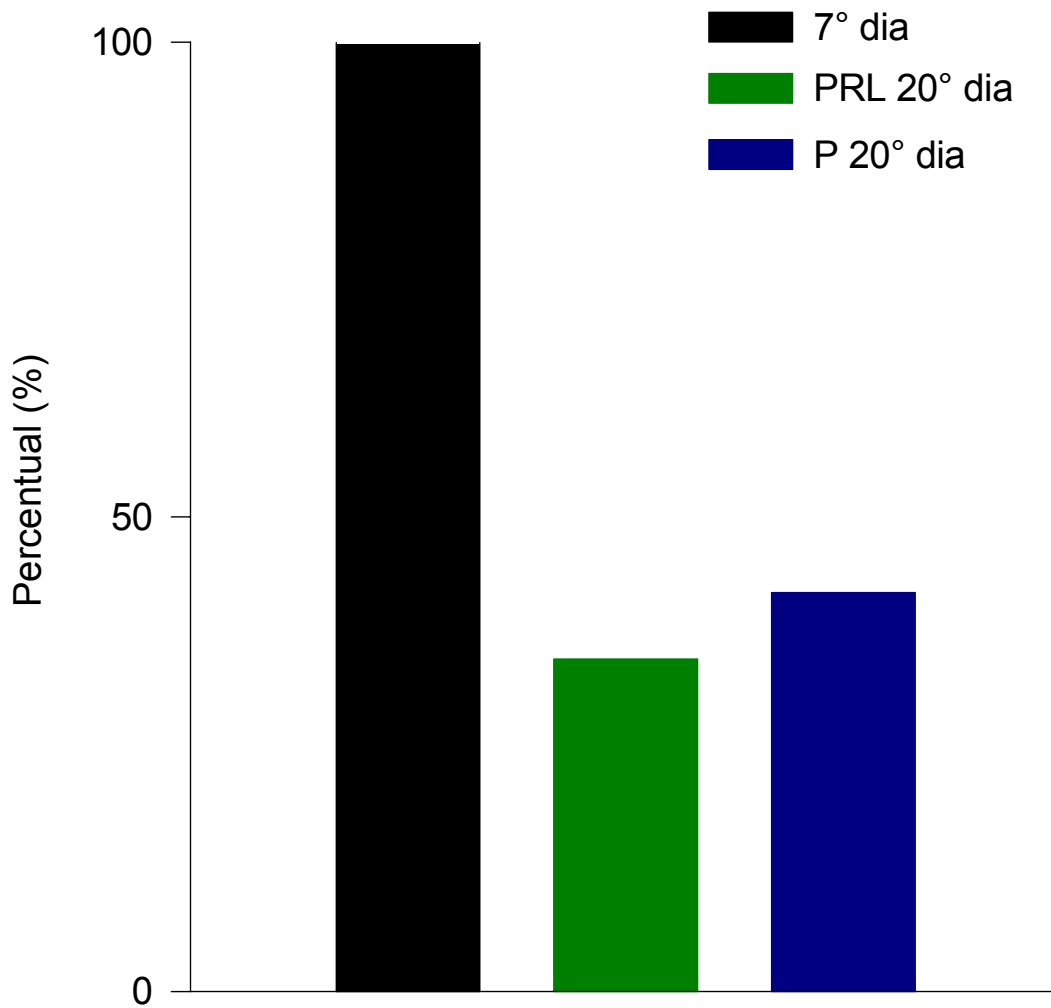


Figura 6 - Percentual da concentração de prolactina (PRL)(ng/ml) e progesterona (P) (ng/ml) em ratas no 20° dia de lactação em relação à concentração no 7° dia de lactação (100%).

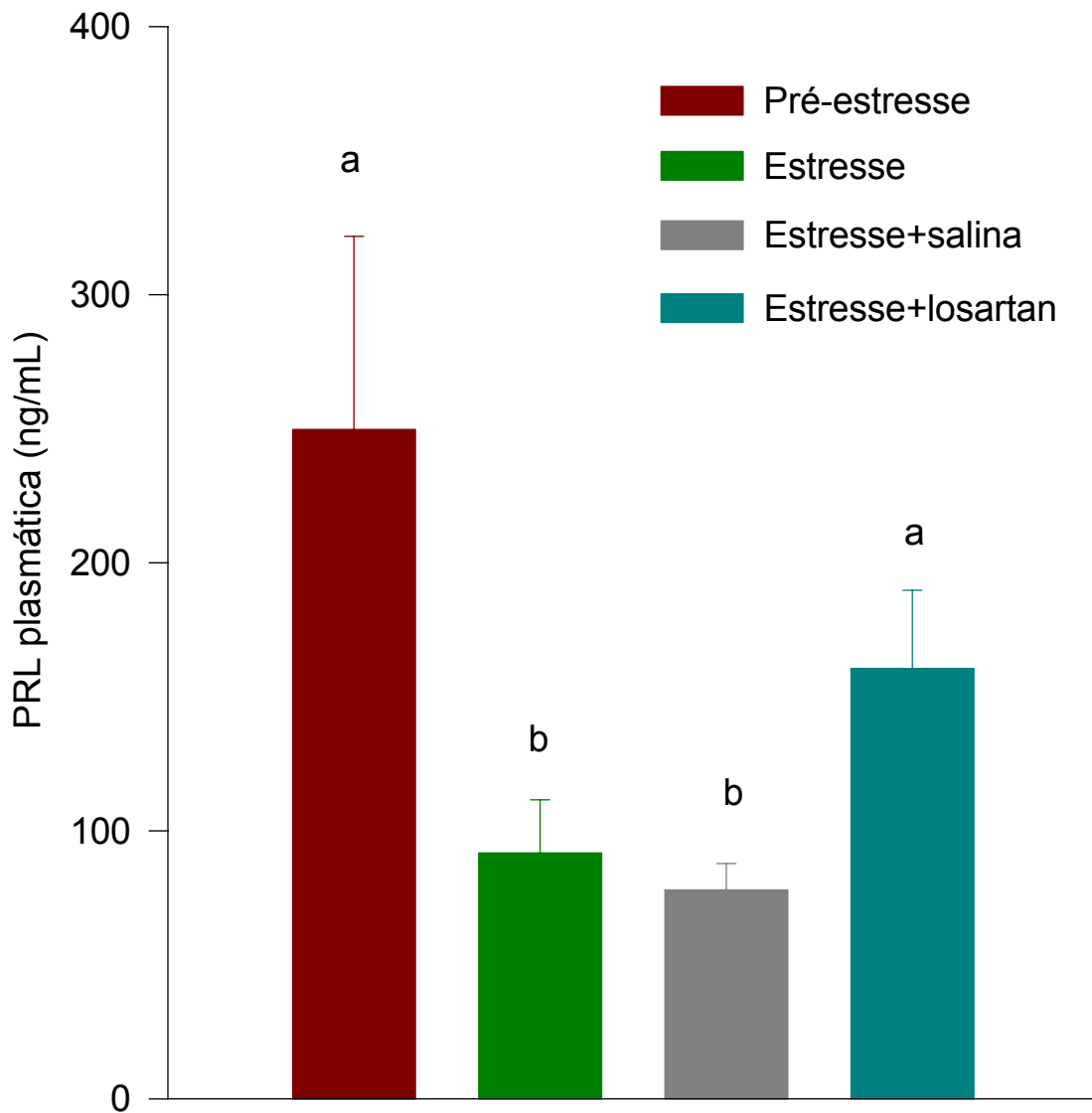


Figura 7 - Concentrações de PRL (ng/ml \pm EPM) em ratas no 7º dia de lactação (Pré-estresse, n=12) 5 min após estresse (éter 1 min) e microinjetados no ARC com salina (Estresse+salina, 20 μ l, n=17) e losartan (Estresse+losartan 10^{-9} M, n=13) a b, P<0,05.

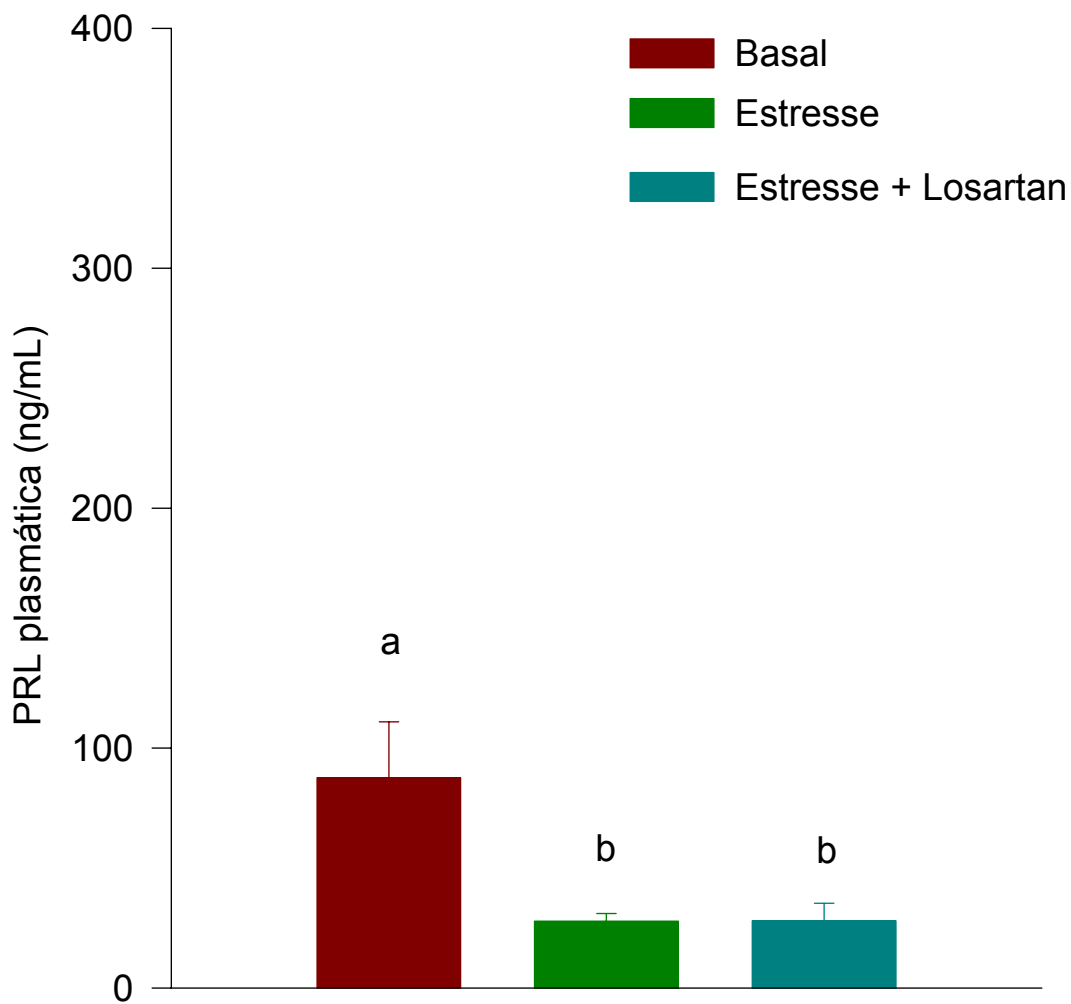


Figura 8 - Concentrações plasmáticas de PRL (ng/ml \pm EPM) em ratas no 20^o dia de lactação (Pré-estresse, n=16) min após estresse (éter 1min)(Estresse n=15) e microinjetadas no ARC com Losartan (Estresse + Losartan, 0,2 μ l, 10⁻⁹ M, n=18), a b p<0,05.

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que, fêmeas no 7º dia de lactação apresentaram altas concentrações plasmáticas de PRL, que sofreram redução significativa aos 20 dias, porém ainda permaneceram relativamente altas se comparadas com dados clássicos da literatura para fêmeas ciclando (SMITH, 1975). Esse comportamento da PRL é bastante característico e já foi verificado anteriormente por Taya & Sasamoto, 1981, que demonstraram que as concentrações de PRL são grandemente aumentadas durante os 10 primeiros dias de lactação e sofrem redução gradual. Considerando que a PRL é muito importante para a síntese de leite pelas glândulas mamárias e manutenção da secreção de leite, é necessário que suas concentrações permaneçam elevadas, principalmente na primeira metade da lactação. A queda significativa observada aos 20 dias provavelmente está relacionada à fase de desmame, que em roedores ocorre próximo aos 21 dias de idade, desta forma, a sucção pelos filhotes diminui, reduzindo o estímulo para secreção de PRL. No período de lactação o estímulo da sucção dos mamilos pelos filhotes (BEN-JONATHAN, 1985) está associado com a supressão da TIDA no ARC (de GREEF *et al.*, 1979; DEMAREST *et al.*, 1983; 1985; WANG *et al.*, 1993; HOFFMAN *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1998,1999), o que explicaria o aumento das concentrações de PRL durante a lactação. Segundo Wang *et al.*, 1993, a expressão da TH está suprimida durante a lactação, com diminuição da proteína e do RNAm da TH e a redução na expressão da TH o que contribui para a diminuição do tônus dopaminérgico. Além disso, as concentrações de DA estão reduzidas na hipófise e na ME (SELMANOFF & WISE, 1981), permitindo a manutenção das altas concentrações de PRL durante a lactação.

A atividade dos neurônios do sistema TIDA é regulada pela PRL. Aumentos nas concentrações plasmáticas de PRL aumentam a atividade desses neurônios e a secreção de DA na ME (MOORE, 1987). Durante a lactação, entretanto, esta regulação por “feedback” da PRL não está operante, porque as altas concentrações de PRL não estão associadas com o aumento da TIDA. Esta

dissociação aparente entre a TIDA e a secreção de PRL deve ser um dos mecanismos que, juntamente ao estímulo da sucção dos mamilos, contribuem para que as altas concentrações de PRL sejam sustentadas durante a lactação.

A PRL é um hormônio que responde a estímulos estressantes. A exposição a vários tipos de estresse promove aumento na secreção de PRL em ratos machos e fêmeas ciclando (NEILL, 1970; WAKABAYASHI *et al.*, 1971; EUKER *et al.*, 1975; DEMAREST *et al.*, 1985). Por outro lado, nossos resultados demonstraram que o éter promoveu uma redução significativa das concentrações plasmáticas de PRL nas fêmeas lactantes, reforçando dados anteriores de outros autores que sugerem que o estresse por éter reduz as altas concentrações de PRL de ratas lactantes com sucção contínua (TERKEL *et al.*, 1972; STERN & VOOGT, 1974; RIEGLE & MEITES, 1976), mas promove um aumento das baixas concentrações plasmáticas de PRL de ratas lactantes sem ou com reduzida sucção das mamas (TERKEL *et al.*, 1972; STERN & VOOGT, 1973; BLAKE, 1974; GROSVENOR *et al.*; 1979). Similarmente, a exposição ao éter produz uma redução das elevadas concentrações de PRL de ratas na tarde do proestro (MORISHIGE & HOTCHILD, 1974; RIEGLE & MEITES, 1976; POLETINI, 1998). Esse efeito paradoxal do estresse sobre a secreção de PRL, promovendo aumento ou redução na secreção dependendo do estado fisiológico do animal, resulta em vários questionamentos sobre o porquê dessas diferentes respostas e quais os possíveis mecanismos envolvidos na regulação desses efeitos, o que por sua vez ainda não está bem esclarecido.

É bem estabelecido que em resposta a vários tipos de estresse fisiológico, a função reprodutiva é a primeira a ser afetada. Desta forma, fisiologicamente parece pertinente atribuir a um sistema neuropeptídico, o envolvimento na responsividade ao estresse como um sistema modulador da função neuroendócrina reprodutiva. A Ang II central parece modular significativamente o efeito da resposta ao estresse. De fato, a exposição aguda a estressores neurogênicos induz a expressão do RNAm dos receptores AT₁ e AT₂ em duas áreas cerebrais associadas ao estresse, o PVN e o Locus Coeruleus (LC) (DUMONT, 1999) e o estresse por imobilização aumenta a atividade da renina plasmática, indicando uma atividade do RAS periférico (JINDRA *et al.*,

1980) . Além disso ocorre um aumento nas concentrações de Ang II no plasma e SNC após estresse agudo e crônico (YANG *et al.*, 1996), sugerindo que o sistema da Ang II possui um papel muito importante nos mecanismos que dirigem a resposta do sistema de estresse.

Nossos dados demonstraram que em fêmeas lactantes no 7º dia, as elevadas concentrações de PRL foram reduzidas devido à aplicação de estresse por éter e o bloqueio dos receptores de Ang II no ARC impediu a redução das concentrações plasmáticas de PRL após estresse, sugerindo que a Ang II central está envolvida na regulação da secreção de PRL em resposta ao estresse nesse período. Essa modulação da Ang II provavelmente é feita via estimulação da liberação de DA, o fator inibidor predominante da secreção de PRL. Foi demonstrado que a Ang II regula as concentrações de DA do ARC (STEELE *et al.*, 1982) e facilita a liberação de DA pelo hipotálamo (INOUE & NEGRO-VILAR, 1989). O efeito inibitório da Ang II central na modulação da secreção de PRL provavelmente ocorre via ARC. O ARC dorsomedial contém neurônios dopaminérgicos (FUXE, 1964) e as fibras nervosas imunorreativas à Ang II estão localizadas próximas a esses neurônios. Além disso, no ARC e em todas as áreas hipotalâmicas relacionadas com o controle da hipófise, todos os receptores de Ang II são do tipo AT₁ (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991), e particularmente no ARC, o RNAm desse receptor possui colocalização com a TH. (JÖHREN *et al.*, 1997). A nossa hipótese é que através da estimulação desses receptores a Ang II central exerce um efeito inibitório sobre a secreção de PRL pelo estímulo da síntese e liberação de DA. A queda na secreção de PRL induzida pelo estresse na tarde do proestro é acompanhada por um aumento na atividade dopaminérgica tuberoinfundibular (MOREHEAD *et al.*, 1990); além disso, a administração de Pimozide, um antagonista dopaminérgico, impediu a redução de PRL induzida por estresse, sugerindo que essa queda nas concentrações de PRL seja mediada pela DA (GALA & HAISLENDER, 1986).

As concentrações plasmáticas de P se encontravam bastante elevadas tanto em no 7º dia quanto no 20º dia de lactação quando comparadas com dados da literatura de ratas ciclando (SMITH 1975), porém com redução significativa aos 20 dias quando comparados com ratas no 7º dia de lactação, corroborando com

dados anteriores onde se verificou que as concentrações de P começam a reduzir no 17º dia de lactação e continua diminuindo até o 20º dia de lactação (TAYA *et al.*, 1989). A semelhança no padrão de queda nas concentrações plasmáticas de PRL e progesterona no 20º dia de lactação quando comparados com o 7º dia, sugerem uma interação entre esse dois hormônios, que tem origem na sucção. Grosvenor & Keenan, 1992 demonstraram que a PRL age como um hormônio luteotrófico, que é caracterizado pelo aumento da secreção de P pelo corpo lúteo, através da potencialização dos efeitos do LH (RICHARDS & WILLIAMS, 1976) e da inibição da enzima 20 γ -hidroxiesteroide desidrogenase, responsável pela síntese de um metabólito da P, que é inativo. Desta forma, durante a lactação, o aumento das concentrações de PRL promove o aumento nas concentrações de P, que por sua vez possui efeito inibitório sobre a secreção de LH e FSH (GROSVENOR & KEENAN, 1992; FREEMAN, 1998). A redução nas concentrações de LH e FSH então promove uma redução nas concentrações de estradiol, como verificado em nossos dados.

As reduzidas concentrações de E₂ tanto no 7º quanto no 20º dias de lactação confirmam os resultados anteriormente observados por Taya *et al.*, 1989, demonstrando que as concentrações de E₂ permanecem baixas desde o 1º até o 20º dias de lactação. Esses resultados confirmam o perfil endócrino de lactação de alta concentração plasmática de P e baixa concentração de E₂ (LEE *et al.*, 1989; SMITH & NEILL, 1977). Contudo, a expressão de receptores de P é dependente do E₂ (JÖHREN *et al.*, 1997; SCOTT, 2000), assim, ainda não fica esclarecido a forma como a P estaria exercendo suas ações durante a lactação, uma vez que as concentrações de E₂ estão muito reduzidas. Além disso a P promove uma "up regulation" homóloga sobre seus próprios receptores (TSENG & ZHU, 1997), o que dificulta ainda mais o entendimento de sua ação nesta situação.

O aprofundamento das investigações sobre o mecanismo de ação da P talvez possam explicar esta aparente contradição. Resultados recentes demonstram que a P pode desenvolver ações através de sistemas não relacionados com os efeitos clássicos do receptor intracelular (TESSIER, 2000). Alguns desses efeitos, inclusive, modulam respostas de receptores excitatórios e

inibitórios no SNC (SMITH, 1989; HARRISON *et al.*, 1987) e são opostos aos desencadeados pelo estrógeno. A velocidade das respostas produzidas sugerem que estes efeitos não requerem alterações da expressão gênica, mas são resultados de uma ação direta sobre a membrana celular (HOFFMAN *et al.*, 1995). Independente do mecanismo de ação dos esteróides sobre o SNC, as altas concentrações de P e baixas concentrações de E₂ associadas à lactação, devem ser importantes alterações da responsividade neuronal nessa situação (HOFFMAN *et al.*, 1995).

Nossos resultados sugerem que em situações de estresse em fêmeas lactantes, cujas concentrações de PRL basais pré-estresse são extremamente altas devido ao estímulo da sucção, a P deve agir em seus receptores localizados no ARC para induzir a expressão de receptores do tipo AT₁ de Ang II, aumentando desta forma a atividade do sistema de Ang II no ARC. A Ang II então deve estimular a síntese e liberação de DA pelos neurônios dopaminérgicos, inibindo a secreção de PRL. A hipótese acima é embasada em dados da literatura que demonstram que alterações nas concentrações dos hormônios reprodutivos promovem mudanças na atividade do sistema AT₁ cerebral (SAAVEDRA, 1992; STEELE, 1992; SELTZER, 1993). A P aumenta a secreção de DA na circulação porta-hipofisária (CRAMER *et al.* 1979), que pode ocorrer devido a uma regulação no número de receptores AT₁ de Ang II no ARC dorsomedial, que apresenta receptores de E₂ e P (WAREMBOURG *et al.*, 1989). Jöhren *et al.*, 1997 verificaram por hibridização *in situ* que ocorre um aumento no RNAm para receptores AT₁ de Ang II no ARC de ratas OVX tratadas com E₂ e P, o que não foi observado em ratas OVX sem reposição hormonal, demonstrando uma indução da expressão do gene do receptor AT₁ de Ang II no ARC pelos hormônios reprodutivos.

Em suma, a lactação está associada à supressão da secreção de hormônios em resposta ao estresse, como a diminuição na secreção de PRL. Esta resposta difere da resposta de ratos machos e fêmeas ciclando, que respondem ao estresse com um aumento na secreção de PRL. A PRL parece possuir um efeito protetor quando secretada em resposta ao estresse, contra as possíveis ações deletérias dos glicocorticóides também liberados em resposta ao estresse

nesses animais. Na lactação, entretanto, a redução nas concentrações de PRL em resposta ao estresse parece ocorrer devido às elevadas concentrações de PRL pré-estresse. A ação fisiológica dessa queda na secreção de PRL ainda é incerta.

O conjunto de dados aqui apresentados demonstraram que a Ang II central é um importante modulador da supressão da secreção de PRL em resposta ao estresse em ratas lactantes no 7º dia, cujas concentrações plasmáticas de PRL e P estão muito elevadas. No 20º dia, cujas concentrações de PRL e P estão significativamente reduzidas, a Ang II parece não estar envolvida na secreção de PRL, sugerindo que essa modulação parece ser dependente das concentrações plasmáticas de PRL e P pré-estresse e que a progesterona promove a “up-regulation” heteróloga sobre o receptor AT₁ no núcleo arqueado; desta forma, a ausência de efeito da Ang II no 20º dia de lactação está associada à uma concentração de P mais baixa. Além disso, esses resultados ao demonstrarem uma ausência na participação da Ang II na resposta de PRL ao estresse no 20º dia indicam a participação de outros mecanismos e/ou sítios de ação na composição deste efeito, mostrando a complexidade da regulação da secreção de PRL em resposta a estresse em fêmeas lactantes.

CONCLUSÕES

◆ O estresse por éter provoca uma redução na concentração de PRL plasmática em ratas lactantes no 7° e 20° dias de lactação.

◆ A Ang II central participa do mecanismo de redução na concentração de PRL plasmática provocada pelo estresse no 7° dia de lactação.

◆ No 20° dia de lactação a Ang II aparentemente não está envolvida na resposta da PRL ao estresse.

◆ No 20° dia de lactação as concentrações plasmáticas de PRL e progesterona são significativamente menores que no 7° dia, porém mais elevadas que as concentrações descritas na literatura, apresentando os dois hormônios o mesmo padrão de queda.

◆ A concentração plasmática de estradiol é reduzida tanto no 7° quanto no 20° dia de lactação.

◆ Na lactação a resposta da PRL ao estresse é inversa à observada nas situações em que sua concentração não é tão elevada.

◆ A Ang II central exerce um papel importante na redução da PRL provocada pelo estresse no 7° dia de lactação, confirmando a hipótese de que a Ang II cerebral, ao contrário da sistêmica e hipofisária, atua como inibidor da PRL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBUD, R.; SMITH, M.S. Differences in the luteinizing hormone and prolactin response to multiple injections of kaina compared with N-methyl-D-aspartate, in cycling rats. *Endocrinology* 129: 3254-3258, 1991.
- ADITI, D.; MICHAEL, G.K.; LEE-MING, K. Prolactin, central nervous system and behavior: a critical review. *Neuroendocrinology* 59: 413-419, 1994.
- AGUILERA, G.; HYDE, C.L.; CATT, K.J. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology* 111(4): 1045-1050, 1982.
- AGUILERA, G.; KISS, A.; LU, X. Increased expresión of type 1 angiotensin II receptor in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoids administration. *J Neuroendocr* 7: 775-783, 1995.
- ALTEMUS, M.; DEUSTER, P.A.; GALLIVEN, E. Supression of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis responses to stress in lactating women. *J of Clin Endocrinol and Metab* 80: 2954-2959, 1995.
- ANDERSON, J.M.; CRONIN, M.J. Single lactotroph responses to dopamine, angiotensin II, and culture duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 258: E24-E31, 1990.
- ARBORGAST, L.A.; VOOGT, J.L. Progesterone suppresses tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nucleus on proestrus. *Endocrinology* 135: 343-350, 1994.
- ARMARIO, A.; LOPEZ-CALDERÓN, A.; JOLIN, T.; CASTELLANOS, J.M. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 20: 879-890, 1995.
- BAKER, B.L.; YU, Y.Y. An immunocytochemical study of human pituitary mammatropes from fetal life to old age. *Am J Anat* 148: 217-240, 1977.
- BAKER, B.L.; GROSS, D.S. Cytology and distribution of secretory cell types in mouse hypophysis as demonstrated with immunocytochemistry. *Am J Anat* 153: 193-215, 1978.
- BÁNKY, Z.; NAGY, G.M.; HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactatin rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology* 59: 63-71, 1994.
- BEN-JONATHAN, N.; OLIVER, C.; WEINER, H.J.; MICAL, R.S.; PORTER, J.C. Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throught pregnancy. *Endocrinology* 100: 452-458, 1977.

- BEN-JONATHAN, N.; ARBOGAST, L.A.; HYDE, J.F. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 33: 399-477, 1979.
- BEN-JONATHAN, N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev* 6: 564-589, 1985.
- BILLER, B.M.K.; FEDEROFF, H.J.; KOENING, J.I.; KLIBANSKI, A. Abnormal cortisol secretion and responses to corticotropin-releasing hormone in women with hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 311-317, 1990.
- BJÖRKLUND, A.; MOORE, R.Y.; NOBIN, A.; SSTENEVI, U. The organization of tubero-hypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron systems in the rat brain. *Brain. Res.* 51: 171-191, 1973.
- BLAKE, C.A. Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rats. *Endocrinology* 94: 503-508, 1974.
- BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19:225-268, 1998.
- BROWN, G.M.; SECMAN, P.; LEE, T. Dopamine neuroleptic receptors in basal hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 99: 1407-1410, 1976.
- BURGESS, L.H., HANDA, R.J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131: 1261-1269, 1992.
- CALDEIRA, J.C.; FRANCI, C.R. Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by isotonic acid. *Brain Res Bull* 52: 483-489, 2000.
- CALIGARIS, L.; ASTRADA, J.J. TALESNIK, S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J. Endocrinol.* 60: 205-215, 1974.
- CALIGARIS, L.; TALESNIK, S. Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, sex and daily rhythm. *Acta Endocrinologica* 102: 505-510, 1983.
- CAREY, M.P.; DETERD, C.H.; KONING, J.; HELMERHORS, F.; KLOET, E.R. The influence of ovarian steroids on hypothalamic pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J. Endocrinol.* 144: 311-321, 1995.
- CARMELIET, P.; DENEFF, C. Immunocytochemical and pharmacological evidence for an intrinsic cholinomimetic system modulating prolactin and growth hormone release in rat pituitary. *Endocrinol* 123: 1128-1139, 1988.

- CASTREN, E.; SAAVEDRA, J.M. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus subfornical organ. *Endocrinology* 122: 370-372, 1988.
- CHAPELL, P.B.; SMITH, M.A.; KILTS, C.D.; BISSETTE, G.; RITCHIE, J.; ANDERSON, C.; NEMEROFF, C.B. Alterations in corticotropin releasing factor like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci* 6: 2908-2914, 1986.
- CHENG, Y.; ZHIZHIN, I.; PERLMAN, R.L.; MANGOURA, D. Prolactin-induced cell proliferation PC12 cells depends on JNK but not ERK activation. *J of Biol Chem* 275: 23326-23332, 2000.
- CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders – Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, v.267: 1244-1252, 1992.
- CHROUSOS, G.P.; TORPY, D.J.; GOLD, P.W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 129: 229-240, 1998.
- CLOSE, F.T.; FREEMAN, M.E. Effects of ovarian steroid hormones on dopamine-controlled prolactin secretory responses in vitro. *Neuroscience* 65:430-435, 1997.
- CREESE, I.R.; SCHNEIDER, P.; SNYDER, S.H. 3H-spiroperidol labels dopamine receptors in pituitary and brain. *Eur J Pharmacol* 46: 377-381, 1977.
- DAVE, J.R.; ANDERSON, S.M.; SAVIOLASKIS, G.A.; MOUGEY, E.H.; BAUMAN, R.A.; KANT, G.J. Chronic sustained stress increases levels of anterior pituitary prolactin mRNA. *Pharm Bioch Behavior* 67(3): 423-431, 2000.
- DE GREEF, W.J.; NEILL, J.D. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 105: 1093-1099, 1979.
- DE KLOET, E.R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostase control. *Front. in Neuroendocrinol.* 12: 95-164, 1991.
- DEMAREST, K.T.; MCKAY, D.W.; RIEGLE, G.D.; MOORE, K.E. Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology* 36: 130-137, 1983.
- DEMAREST, K.T.; MOORE, K.E.; RIEGLE, E.D. Acute restraint stress decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity: Evidence for a differential response in male versus female rats. *Neuroendocrinology* 41: 504-510, 1985.

- DE MARIA, J.E.; LIVINGSTONE, J.D.; FREEMAN, M.E. Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res.* 879 (1-2): 139-147, 2000.
- DIJKSTRA, H.; TILDERS, F.G.H.; HIELLE, M.A.; SMELIK, P.G. Hormonal reactions to fighting in rat colonies: prolactin rises during defense but not offense. *Physiol Behav* 51: 961-968, 1992.
- DORSHKIND, K.; HORSEMAN, N.D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* 23 (3): 288-294, 2001.
- DRACA, S. Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunol Cell Biol* 73 (6): 481-483, 1995.
- DUMONT, E.C.; RAFRAFI, S.; LA FOREST, S.; DROLET, G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience* 93: 877-884, 1999.
- DU RUISSEAU, P.; TACHE, Y.; BRAZEAU, P.; COLLU, R. Pattern of hypophyseal hormone changes induced by various stressors in female and male rats. *Neuroendocrinology* 27: 257-271, 1978.
- ENJALBERT, A.; RUBERG, M.; ARANCIBIA, S.; FIORE, L.; PRIAM, M.; KORDON, C. Independent inhibition of prolactin secretion by dopamine and gamma-aminobutyric acid in vitro. *Endocrinology* 105: 823-826, 1979.
- ESCALADA, J.; CACICEDO, L.; ORTEGO, J.; MELIAN, E.; SANCHEZ-FRANCO, F. Prolactin gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of dopamine and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 137: 631-637, 1996.
- EUKER, J.S.; MEITES, J.; RIEGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone treated male rats. *Endocrinology* 96: 85-92, 1975.
- FITCH, C.A.; FREEMAN, M.E. Effects of the estrous cycle stage on the prolactin secretory response to dopamine in vitro. *Endocrine*(4): 59-63, 1996.
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin stimulation of the Central Nervous System. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol* 87: 117-159, 1980.
- FOSTER, M.P.; JENSEN, E.R.; MONTECINO, R.E.; LEATHERS, H.; HORSEMAN, N.; DORSHKIND, K. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormones, insulin like growth factor – I, and thyroid hormone. *Clin Immunol* 96 (2): 140-149, 2000.
- FOX, S.; SMITH, S. The suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion during lactation in the rat. *Endocrinology*: 115: 2045-2051, 1984.

- FRASOR, J.; GASPAR, C.A.; DONNELLY, K.M.; GIBORI, G.; FAZLEABAS, A.T. Expression of prolactin and its receptor in the baboon uterus during the menstrual cycle and pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84 (9): 3344-3350, 1999.
- FREEMAN, M.E.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80(4): 1523-1631, 2000.
- FUJIKAWA, T.; SOYA, H.; YOSHIZATO, H.; SAKAGUCHI, K.; DOH-URA, K. Restraint stress enhances the genes expression of prolactin receptor long form at the choroids plexus. *Endocrinology* 5608-5613, 1995.
- FUXE, K. Cellular localization of monoamines in the median eminence and in the infundibular system of some mammals. *Acta Physiol. Scand.* 58: 383-384, 1964.
- FUXE, K.; HÖKFELT, T.; ENEROTH, P.; GUSTAFSSON, J.A.; SKETT, P. Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science*: 196: 899-900, 1977.
- GALA, R.R.; HAISENLENDER, D.J. Stress-induced decrease of the afternoon prolactin surge. The influence of the adrenal gland. *Life Sci* 31: 875-879, 1982.
- GALA, R.R.; HAISENLENDER, D.J. Restraint stresses decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats. Influence of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterone. *Neuroendocrinology* 43: 115-123, 1986.
- GALA, R.R. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci* 46: 1407-1420, 1990.
- GANONG, W.F. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol* 14: 233—249, 1993.
- GIBBS, D.M.; NEILL, J.D. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology* 111: 1045-1050, 1982.
- GOLDSMITH, P.C.; CRONIN, M.J.; WEINER, R.I. Dopamine receptor sites in the anterior pituitary. *J Histochem Cytochem* 27:1205-1207, 1979.
- GOUDREAU, J.L.; FALLS, W.M.; LOOKINGLAND, K.J.; MOORE, K.E. Periventricular-S.E.M. dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinol.* 62: 147-154, 1995.

- GRIFFOND, B.; DERAY, A.; FELLMANN, D.; GIOFI, P.; CROIX, D.; BUGNON, C. Colocalization of prolactin- and dynorphin-like substances in neuronal population of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci Lett* 156: 91-95, 1993.
- GRIFFOND, B.; COLARD, C.; DERAY, A.; FELLMANN, D.; BUGNON, C. Evidence for the expression of dynorphin gene in the prolactin immunoreactive neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci Lett* 165: 89-92, 1994.
- GROSVENOR, C.E.; McCANN, S.M.; NALLAR, R. Inhibition of nursing-induced fall in pituitary prolactin concentration in lactating rats by injection of acids extracts of bovine hypothalamus. *Endocrinology* 76: 883- 889, 1965.
- GROSVENOR, C.E.; MENA, F.; WHITWORTH, N.S. Ether releases large amounts of prolactin from rat pituitaries previously "depleted" by short term suckling. *Endocrinology* 105: 884-887, 1979.
- GROSVENOR, C.E.; KEENAN, T.W. Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev* 14: 710-728, 1992.
- GUDELSKI, G.A.; NANSEL, D.D.; PORTER, J.C. Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 108: 440- 444, 1981.
- HANDA, R.J.; BURGESS, L.H.; KERR, J.E.; O'KEEFE, J.A. Gonadal steroid hormone receptors and Sex differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Hormones and Behavior* 28: 464-476, 1994.
- HARTMANN, D.P.; HOLADAY, J.W.; BERTON, E.W. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J* 3: 2194-2202, 1989.
- HARRISON, N.L.; MAJEWSKA, M.D.; HARRINGTON, J.W.; BAKER, J.L. Structure-activity relationships for steroid with the γ -aminobutyric acid-A receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 346-353, 1987.
- HASHI, A.; MAZAWA, S.; CHEN, S.Y.; YAMAKAWA, K.; KATO, J.; ARITA, J. Estradiol-induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology* 137: 3246-3252, 1996.
- HATTORY, N.; WAKIMASU, M.; TAKAHASHI, M.L HIROSAWA, M.; SHIOTA, K.; OGAWA, T. Characterization of rat placental lactogen (PL) with an antipeptide antibody directed against rat PLs. *Endocr J* 40: 727-735, 1993.
- HERMAN, J.P.; WATSON, S.J. Stress regulation of mineralocorticoid receptor heteronuclear RNA in rat hippocampus. *Brain Res* 677: 243-249, 1995.

- HIGUCHI, T.; NEGORO, H.; ARITA, J. Reduced response of prolactin and catecholamine to stress in the lactating rat. *J Endocrinol* 122: 495-498, 1989.
- HIGUCHI, T.; HONDA, K.; TAKANO, S.; NEGORO, H. Estrogen fails to reduce tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and to cause a prolactin surge in lactating, ovariectomized rats. *Brain Res.* 576: 143-146, 1992.
- HOFFMAN. G.E.; LI, W.W.; ABDUD, R.; LEE, W.S.; SMITH, M. Use of fos-related antigens (FRAS) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Res* 654: 207-215, 1994.
- HOFFMAN. G.E.; ABBUD, R.; LE, W, ATTARI, B.; BERGHORN, K.; SMITH, M.S. Effects of sex steroids on the central nervous system detected by the study of Fos protein expression. In: *Neurobiological effects of sex steroid hormones*. Cambridge university press, 1995.
- IMAKI, T.; NAHAN, J.L.; RIVIER, C.; SAWCHENKO, P.E.; VALE, W. Differential regulation of corticotropin releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J Neuroscience* 11: 585-599, 1991.
- INOUE, T.; NEGRO-VILAR, A. Evidence that vasoactive intestinal peptide, angiotensin II and LHRH modulate the release of prolactin induced by dopamine blockade. *Soc Neurosc Abstr* 15: 724, 1989.
- JINDRA, A.; KVETNANSKY, R.; BELOVA, T.I.; SUDAKOV, K.V. Effect of acute and repeated immobilization stress on plasma renin activity, catecholamines and corticosteroids in wistar and august rats. In: *Usdin, Kvetnansky, Kopin (eds) catecholamines and stress: Recent Advances*, Elsevier, Amsterdam, 249, 1980.
- JEZOVA, D.; OCHEDALSKI, T.; KISS, A.; AGUILERA, G. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinology* 10: 67-72, 1998.
- JÖHREN, O.; INAGAMI, T.; SAAVEDRA, J.M. Localization of AT₂ angiotensin II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 37: 192-200, 1996.
- JÖHREN, O.; SAAVEDRA, J.M. Expression of AT_{1A} and AT_{1B} angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-wk-old rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: E104-E112, 1996.
- JÖHREN, O.; HANS, I.; HÄUSER, W.; MAYE, I.; SANVITTO, G.L.; SAAVEDRA, J.M. Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Research* 757: 218-227, 1997.

- JÖHREN, O.; SANVITTO, G.L.; EGIDY, G.; SAAVEDRA, J. Angiotensin II At_{1A} receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neuron of the female rat arcuate nucleus. *The Journal of Neurosc* 17(21): 8283-8392, 1997.
- LARSON, B.A.; SINHA, Y.N.; VANDERLAAN, W.P. Effect of 5-hydroxytryptophan on prolactin secretion in the mouse. *J. Endocrinol.* 74:53-154,1977.
- LEE, L.R.; HAISENLEDER, D.J.; MARSHALL, J.C.; SMITH, M.S. Effects of progesterone on pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion and LH subunit messenger ribonucleic acid during lactation in the rat. *Endocrinology* 124: 2128-2134, 1989.
- LE MEVEL, J.C.; ABITOL, S.; BERAUDI, G.; MANILY, S. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated stress in male and female rats. *Endocrinology* 105: 812-817, 1974.
- LENKEI, Z.; PALKIVITS, M.; CORNAL, P.; LLORENS-CORTES, C. Expression of angiotensin type 1 (At₁) and type 2 (At₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocr* 18: 363-439, 1997.
- LEONG, D. A.; FRAWLEY, S.; NEILL, J.D. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann Rev Physiol* 45: 109-127, 1983.
- LI, C.; CHEN, P.; SMITH, M.S. The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 139: 1645-1652, 1998.
- LI, C.; CHEN, P.; SMITH.; M.S. Neuropeptide y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: role of PRL. *Endocrinology* 140: 118-123, 1999.
- LIGHTMAN, S.L.; YOUNG W,S, Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 12: 2358-2364, 1989.
- LIVINGSTONE, J.D.; LERANT, A.; FREEMAN. M.E. Ovarian steroids modulate responsiveness to dopamine and expression of G-proteins in lactotropes. *Neuroendocrinology* 68: 172-179, 1998.
- MAURER, R.A. KIM, K.E.; DAY, R.N.; NOTIDES, A.C. Regulation of prolactin gene expression by estradiol. *Prog. Clin. Biol. Res.* 322: 159-169, 1990.
- McKINLEY, M.J.; McMALLEN, R.M.; PENNINGTON, G.L.; SMARDENCAS, A.;

- WEISINGER, R.S.; OLDFIELD, B.J. Physiological actions of angiotensin II mediated by AT₁ and AT₂ receptors in the brain. *Clin. Exp. Pharmacology and Physiology* – Supplement 3: S99-104, 1996.
- McMURRAY, R.W. Estrogen, prolactin and autoimmunity: actions and interactions. *International Immunoplasm* 1(6): 995-1008, 2001.
- MOHANKUMAR, P.S.; MOHANKUMAR, S.M.J.; QUADRI, S.K.; VOOGT, J.L. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Res Bull* 42: 435-411, 1997.
- MOORE, K.E. Interaction between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol Reprod* 36: 47-58, 1987.
- MOREHEAD, M.H.; GALA, R.R. Restraint stress depresses prolactin surges in pseudopregnant rats and adrenalectomy does not alter the response. *Life Sci.* 41: 1491-1498, 1982.
- MOREHEAD, M.H.; LOOKINGLAND, K.J.; GALA, R.R. Stress-induced suppression of the prolactin afternoon surge in ovariectomized, estrogen-treated rats and the nocturnal surge in pseudopregnant rats are accompanied by an increase in median eminence dihydroxyphenylacetic acid concentrations. *Neuroendocrinology* 51(2):208-12, 1990.
- MORGAN, L.; PIPKIN, F.B.; KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int. Journal Biochemistry Cell Biology* 28 (11): 1211-1122, 1996.
- MORISHIGE, W.K.; PEPE, G.J.; ROTHCHILD, I. Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 92: 1527-1530, 1973.
- MORISHIGE, E.K.; ROTHCHILD, I. A paradoxical inhibiting effect of ether on prolactin release in the rat: comparison with effect of ether on LH and FSH. *Neuroendocrinology* 16: 95-107, 1974.
- MOUNZIH, K.; GROVE, K.C.; SPETH, R.C.; STEELE, M.K.; GANONG, W.F. Further studies of the site at which angiotensin II acts in the central nervous system to inhibit the secretion of prolactin. *Endocr. J.* 2: 41-45, 1994.
- MUKHERJEE, P.; MASTRO, A.M.; HYMER, W.C. Prolactin induction of interleukin-2 receptor on rats splenic lymphocytes. *Endocrinology* 126: 88-94, 1990.
- MYERS, L.S.; STEELE, M.K. The brain rennin-angiotensin system and prolactin secretion in female rats: influence of ovarian hormones. *J. Neuroendocrinol.* 1: 299-303, 1989.
- MYERS, L.S.; STEELE, M.K. The brain renin angiotensin system and prolactin

- secretion in the male rat. *Endocrinology* 129: 1744-1748, 1991.
- NEILL, J.D. Effect of stress on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197, 1970.
- NEILL, J.D. Prolactin: its secretion and control. *Endocrinology* 4(2): 469-488, 1974.
- PATEL, Y.C.; SRIKANT, C.B. Somatostatin mediation of adenohipophyseal secretion. *Annu Rev Physiol* 48: 551-567, 1986.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. Academic Press, Sydney, 1986.
- PAXINOS, G. The rat nervous system, 2nd ed. Academic Press, Sydney, 1995.
- PEIFFER, A.; LAPOINTE, B.; BARDEN, N. Hormonal regulation of type II glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 129: 2166-2174, 1991.
- PHILLIPS, M.I. Functions of Angiotensin in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol* 49: 413-435, 1987.
- POLETINI, M.O. Participação do Locus Coeruleus no controle da secreção de prolactina induzida por estresse em ratos machos e em fêmeas em diferentes condições hormonais. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, novembro de 1998.
- RAMALEY, J.A. Differences in serum corticosterone patterns in individual rats: relationship to ovulatory cycles. *J. Endocrinol.* 66: 421, 1975.
- RAUD, H.R.; KIDDY, C.A.; ODELL, W.D. The effect of stress upon the determination of serum prolactin by radioimmunoassay. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136: 689-693, 1971.
- RICHARD, P.; MOOS, F.; FREUND-MERCIER, M.J. Central effects of oxytocin. *Physiol. Rev.* 71: 31-70, 1991.
- RICHARDS, J.S.; WILLIAMS, J.L. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH). Regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 99:1571-1581, 1976.
- RIEGLE, G.D.; MEITES, J. The effect of stress on serum prolactin in the females rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 152: 441-448, 1976.
- RIVIER, C.; BROWN, M.; VALE, W. Effect of neurotensin, substance P and morphine sulfate on the secretion of prolactin and growth hormone in the rat. *Endocrinology* 100: 751-754, 1977.

- RIVIER, C.; VALE, W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology* 114: 914-921, 1984.
- ROBERTSON, M.C.; COSBY, H.; FRESNOZA, A.; CATTINI, P.A.; SHIU, R.P.C.; FRIESEN, H.G. Expression, purification, and characterization of recombinant rat placental lactogen-I: a comparison with the native hormone. *Endocrinology* 134: 393-400, 1994.
- ROBERTSON, M.C.; COSBY, H.; SHIU, R.P.C. Rat placental lactogen-I variant (rPL-Iv), product of a unique gene, is biologically different from rPL-I. *Endocrinology* 137: 5242-5249, 1996.
- RUBERG, M.; ROTSZEIN, W.H.; ARANCIBIA, S.; BESSON, J.; ENJALBERT, A. Stimulation of prolactin release by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Eur. J. Pharmacol.* 511: 319-320, 1978.
- SANVITTO, G.L.; JÖHREN, O.; HÄUSER, W.; SAAVEDRA, J.M. Water deprivation upregulates Ang II AT₁ binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *American Journal of Physiology* 273 (1): E156-E163, 1997.
- SAAVEDRA, J.M.; ISRAEL, A.; PLUNKETT, L.M.; KURIHARA, M.; SHIGEMATSU, K.; CORREA, F.M.A. Quantitative distribution of angiotensin II binding sites in rat brain by autoradiography. *Peptides* 7: 679-687, 1986.
- SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev.* 13: 329-380, 1992.
- SAAVEDRA, J.M.; VISWANATHAN, M.; SHIGEMATSU, K. Localization of angiotensin AT₁ receptors in the rat heart conduction system. *Eur J Pharmacol* 235(2-3):301-3, 1993.
- SCOTT, C.J.; PEREIRA, A.M.; RAWSON, J.A.; SIMMONS, D.M.; ROSSMANITH, W.G.; ING, N.H.; CLARKE, I.J. The distribution of progesterone receptor immunoreactivity and Mrna in the mediobasal hypothalamus by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 12(6): 565-575, 2000.
- SELMANOFF, M.; WISE, P.M. Decreased dopamine turnover in the median eminence in response to suckling in the lactating rat. *Brain Res* 212: 101-116, 1981.
- SELTZER, A.; TSUTSUMI, K.; SHIGEMATSU, K.; SAAVEDRA, J.M. Reproductive hormones modulate angiotensin II At₁ receptors in the dorsomedial arcuate nucleus of the female rat. *Endocrinology* 133: 939-941, 1993.
- SHEWARD, W.J.; FRASER, H.M.; FINK, G. Effect of immunoneutralization of thyrotrophin-releasing hormone on the release of thyrotrophin and prolactin during suckling or in response to electrical stimulation of the hypothalamus in the anaesthetized rat. *J Endocrinol* 106: 113-119, 1985.

- SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 95: 219-226, 1975.
- SMITH, M.S.; NEILL, J.D. Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biol Reprod* 17: 255-261, 1977.
- SMITH, S.S. Progesterone enhances inhibitory responses of cerebellar Purkinje cells mediated by the GABA-A receptor subtype. *Brain Res Bull* 23: 317-322, 1989.
- SPINEDI, E.; NEGRO-VILAR, A. Angiotensin II and ACTH release: site of actions and potency relative to corticotropin releasing factor and vasopressin. *Neuroendocrinology* 37: 446, 1983.
- STEELE, M.K.; NEGRO-VILAR, A.; McCANN, S.M. Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormone in the female rat. *Endocrinology* 109: 893-899, 1981.
- STEELE, M.K.; BROWNFIELD, M.S.; GANONG, W.F. Immunocytochemical localization of angiotensin immunoreactivity in gonadotrops and lactotrops of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 35: 155-158, 1982.
- STEELE, M.K.; McCANN, S.M.; NEGRO-VILAR, A. Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology* 111: 722-729, 1982.
- STEELE, M.K.; MYERS, L.S. In vivo studies on paracrine action of pituitary Angiotensin II in stimulatory prolactin release in rats. *Ann. J. Physiol.* 258: E619-E624, 1990.
- STEELE, M.K. The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. *Trends Endocrinol. Metab.* 3: 295-301, 1992.
- STEWART, M.D.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; SCHULER, L.A.; JOYCE, M.M.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod* 62 (6):1779-1789, 2000.
- SUBRAMANIAN, M.G.; GALA, R.R. The influence of adrenalectomy and of corticosterone administration on the ether-induced increase in plasma prolactin in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 175: 415-417, 1978.
- TASHJIAN, A.H.; BAROWSKY, N.J.; JENSEN, D.K. Thyrotropin releasing

hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 43: 516, 1971.

TAYA, K.; SASAMOTO, S. Changes in FSH, LH and prolactin secretion and ovarian follicular development during lactation in the rat. *Endocrinol Japon* 28: 187-196, 1981.

TAYA, K.; GREENWALD, G.S. Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinol Japon* 29: 453-459, 1982.

TAYA, K.; KOMURA, H.; WATANABE, G.; SASAMOTO. Peripheral blood levels of immunoreactive inhibin during pseudopregnancy, pregnancy and lactation in the rat. *J Endocrinol* 121: 545-552, 1989.

TERKEL, J.; BLAKE, C.A.; SAWYER, C.H. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 91: 49-53, 1972.

TESSIER, C.; DEB, S.; PRIGENT-TESSIER, A.; FERGUSON-GOTTSCHELL, S.; GIBORI, G.B.; SHIU, R.P.; GIBORI, G. Estrogen receptors alpha e beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology* 141(10): 3842-3851, 2000.

TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; WONG, P.C.; CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; BENFIELD, P.; CARINI, D.J.; LEE, R.J.; WEXLER, R.R.; SAYE, J.A.M.; SMITH, R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.*45: 205-251, 1993.

TORNER, L.; TOSCHI, N.; POHLINGER, A.; LANDGRAF, R.; NEUMANN, I.D. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: Improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosc.* 21(9): 3207-3214, 2001.

TSENG, L.; ZHU, H.H. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 57(6): 1360-1366, 1997.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II receptor subtypes in median eminence and basal forebrain involved in regulation of pituitary function. *Endocrinology* 129: 3001-3008, 1991.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J.M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am. J. Physiol.* 261: R209-R216, 1991.

TSUTSUMI, K.; SELTZER, A.; SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Res* 631: 212-220, 1993.

- TURPEN, C.; JOHNSON, D.C.; DUNN, J.D. Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. *Neuroendocrinology* 20: 339-351, 1976.
- VALE, W.; VAUGHAN, J.; SMITH, M.; YAMAMOTO, G.; RIVIER, J.; RIVIER, C. Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophyseal peptides, and another substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology* 113: 121, 1983.
- VIAU, V.; MEANEY, M.J. Basal and stress hypothalamic-pituitary-adrenal activity in cycling and ovariectomised-steroid treated rats. *Endocrinology* 129: 2503-2511, 1991.
- WAKABAIASHI, I.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A.V. Effect of pentobarbital and ether stress on serum prolactin levels in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 1181-1193, 1971.
- WANG, H.J.; HOFFMAN, G.E.; SMITH, M.S. Supressed tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic system during lactation. *Endocrinology* 133: 1657-1663, 1993.
- WARENBURG, M.; JOLIVET, A.; MILGROM, E. Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons in the guinea pig hypothalamus and preoptica area. *Brain Research* 480: 1-15, 1989.
- WATANOBE, H.; SCHIOTH, H.B.; WIKBERG, J.E.S.; SUDA, T. Evaluation of the role for prolactin-releasing peptide in prolactin secretion induced by ether stress and suckling in the rat: Comparison with vasoactive intestinal peptide. *Brain Res.* 865 (1): 91-96, 2000.
- WESTENDORF, J.M.; SCHONBRUNN, A. Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary cells in culture. *Endocrinology* 110: 352-358, 1982.
- WHITNALL, M.H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.* 40: 573-629, 1993.
- YANG, H.; LU, D.; YU, K.; RAIZADA, M.K. Regulation of neuromodulatory actions of angiotensin II in the brain neurons by the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 16: 4047-4057, 1996.
- YEN, S.H.; PAN, J.T. Progesterone advances the diurnal rhythm of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the prolactin surge in ovariectomized, estrogen-primed rats and in intact proestrous rats. *Endocrinology* 139: 1602-1609, 1998.
- ZABAVNIK, J.; WU, W.X.; EIDNE, K.A.; McNEILLY, A.S. Dopamine D2 receptor Mrna in the pituitary during the Oestrus cycle, pregnancy and lactation in the

rat. *Mol Cell Endocrinol* 95: 121-128, 1993.

ZHUO, J.; MOELLER, I.; JENKINS, T.; CHAI, S.Y.; ALLEN, A.A.; OHISHI, M.; MENDELSON, F.A. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT₁, AT₂ and AT₄ receptors. *J Hipertension* 16 (12) 2027-2037, 1998.