

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências - Departamento de Fisiologia

*Secreção de prolactina e proliferação de lactotrofos em
resposta a progestogênio, antiestrogênio e agonista da
dopamina: desenvolvimento de um modelo experimental de
hiperprolactinemia dependente de estrogênio*

Maria Flávia Marques Ribeiro

Orientadora: Prof. Dra Poli Mara Spritzer

Co-orientadora: Prof. Dra Lígia Maria Barbosa Coutinho

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como
requisito parcial para obtenção do Título de Doutor
em Ciências Biológicas – Fisiologia.

Porto Alegre-1996

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Prolactina	1
1.2. Regulação da Secreção da Prolactina	4
1.2.1. Regulação Central da Secreção da Prolactina	4
1.2.1.1. Regulação da Secreção de PRL Induzida pela Sucção	13
1.2.1.2. Regulação da Secreção de PRL Induzida pelo Estresse	15
1.2.2. Regulação Periférica da Secreção de PRL	17
1.3. Hiperprolactinemia	23
1.4. Fármacos com Ação Antiestrogênica	25
1.5. Modelos Experimentais de Hiperprolactinemia	30
1.6. Objetivos	34
1.6.1. Objetivo Geral	34
1.6.2. Objetivos Específicos	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Animais	36
2.2. Fármacos	37
2.3. Protocolo Experimental	37
2.3.1. Grupos Controle	38
2.3.1.1. Intactas	38
2.3.1.2. Ovariectomizadas	38
2.3.1.3. Ciclo Estral	38
2.3.2. Grupos Experimentais	39
2.3.2.1. Grupos tratados com Benzoato de Estradiol (BE)	39
2.3.2.2. Grupos tratados com outros fármacos associados ao BE	39
2.3.2.2.1. Bromocriptina (BCP)	39
2.3.2.2.2. Acetato de Noretisterona (NA)	39
2.3.2.2.3. Tamoxifeno associado à BCP ou ao NA	41
2.4. Descrição dos Experimentos	41
2.4.1. Níveis séricos de PRL, peso da hipófise e percentual de lactotrofos nos grupos controle	41
2.4.2. Efeitos do benzoato de estradiol sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	42
2.4.3. Efeitos da BCP associada ao BE sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	42
2.4.4. Efeitos do NA associado ao BE sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	44
2.4.5. Efeitos do tamoxifeno (TAM) isolado ou associado ao NA ou à BCP sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	45
2.5. Dosagem de Prolactina	45

2.6. Medida do peso da hipófise anterior	47
2.7. Contagem de células imunorreativas à PRL por imunohistoquímica	47
2.8. Análise estatística	49
3. RESULTADOS	50
3.1 Níveis séricos de PRL, peso da hipófise e percentual de lactotrofos em ratas dos grupos controle	50
3.1.1. Concentrações de PRL sérica nos grupos controle	50
3.1.1.1. Níveis séricos de PRL de ratas ovariectomizadas e intactas	50
3.1.1.2. Níveis séricos de PRL durante o ciclo estral	51
3.1.2. Peso da hipófise nos grupos controle	52
3.1.3. Percentual de lactotrofos nos grupos controle	53
3.2. Efeitos do benzoato de estradiol sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	54
3.2.1. Níveis séricos de PRL nos grupos tratados com BE	54
3.2.2. Peso da hipófise nos grupos tratados com BE	55
3.2.3. Percentual de lactotrofos nos diferentes tratamentos com BE	56
3.3. Efeitos da BCP associada ao BE sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	56
3.3.1. Níveis séricos de PRL nos grupos tratados com BCP associada ao tratamento com BE	58
3.3.1.1. Concentração sérica de PRL nos grupos tratados com BCP associada ao tratamento com E50	58
3.3.1.2. Níveis de PRL sérica nos grupos tratados com BCP associada a E300	59
3.3.2. Efeitos da BCP associada ao BE sobre peso da hipófise	60
3.3.3. Percentual de lactotrofos em hipófises de ratas tratadas com BCP associada ao BE	61
3.4. Efeitos do NA associado ao tratamento com BE sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos	66
3.4.1. Níveis séricos de PRL nos grupos tratados com NA associado ao tratamento com BE	66
3.4.1.1. Efeitos do NA associado ao tratamento com E50 sobre os níveis de PRL sérica	66
3.4.1.2. Níveis de PRL sérica nos grupos tratados com NA associado a E300	67
3.4.2. Peso da hipófise nos grupos tratados com NA associado ao tratamento com BE	68
3.4.2.1. Efeitos no peso da hipófise do NA associado ao E50	68
3.4.2.2. Efeitos do NA associado ao tratamento com E300 sobre o peso da hipófise	68
3.4.3. Percentual de lactotrofos em hipófises de ratas tratadas com NA associado ao BE	69
3.5. Efeitos da associação do tamoxifeno (TAM) isolado ou associado ao NA ou à BCP sobre os níveis de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos	72
3.5.1. Efeitos do TAM e do NA associados ao tratamento prolongado com BE	72
3.5.1.1. Efeitos das associações de TAM e NA sobre a PRL sérica	72
3.5.1.2. Efeitos das associações de TAM e NA sobre o peso da hipófise	74

3.5.2 Efeitos do TAM e da BCP associados ao tratamento prolongado com BE ...	74
3.5.2.1. Efeitos da associação de TAM com BCP sobre a PRL sérica.....	74
3.5.2.2. Efeitos da associação de TAM com BCP sobre o peso hipofisário.....	74
3.5.3. Percentual de lactotrofos dos grupos tratados com as associações de TAM com BCP e NA	78
4. DISCUSSÃO	79
5. CONCLUSÕES.....	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRGS (PROPESP).

*Hoje, muitos anos depois, tenho certeza que
meu pai tinha razão quando dizia: “Na
vida, três coisas são indispensáveis:
paciência ... paciência ... e ... paciência”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha orientadora, Profa. Dra. Poli Mara Spritzer, por sua participação ativa no planejamento e execução deste trabalho, e sua importante contribuição no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À co-orientação afetiva e tranqüila da Profa. Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho;

À Profa. Dra. Maria Marques por seu incansável incentivo, e por sua contagiante paixão pela pesquisa que me contaminou;

Ao colega e “irmão camarada” Fernando Marcos dos Reis pela ajuda indispensável nas dosagens de prolactina, elaboração de gráficos e cálculos estatísticos;

À colega Profa. Ilma Simoni Brum da Silva pelo apoio importante em todas as etapas deste trabalho, e principalmente por sua amizade incondicional;

À colega Maria Amália Pavanatto pela dedicação e parceria agradável em muitos momentos deste trabalho;

Ao Departamento de Patologia da FFFCMPA e seus funcionários pela acolhida no laboratório de imuno-histoquímica;

À Profa. Dra. Míriam Oliveira pelo auxílio em relação à obtenção de referências bibliográficas e no método de contagem de células;

Ao apoio técnico de Iara Tarabi e Isabel Cristina Lemes de Moura na técnica de imuno-histoquímica;

Aos bolsistas de iniciação científica Neuza Dahlem, Fernando Stelzer, Luciana Volkman e Maria de Fátima Bravo pelo auxílio na realização dos experimentos, contagem de células e pesquisa bibliográfica;

À colaboração de Iracema Vera Soares e Maria da Glória Souza Gomes na realização dos experimentos e manutenção do laboratório;

Ao colega Prof. Luiz Carlos Kucharski pela extrema boa vontade em resolver todos os problemas, extensivo à Guendalina, Isabel Cristina e demais componentes da Fundação RSMS.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e do CPG-Fisiologia, da secretaria da FINEP e da Biblioteca, pela colaboração e disponibilidade;

À Andrea Julião pela revisão do *abstract*;

Enfim, aos amigos e às pessoas com as quais de alguma maneira partilhei relações de afeto nesse período. Às pessoas especiais, meu sincero reconhecimento.

ARTIGOS PUBLICADOS COM OS DADOS DESTA TESE

RIBEIRO, M.F., SPRITZER, P.M., BARBOSA-COUTINHO, L.M., OLIVEIRA, M.C., PAVANATO, M.A., SILVA, I.S.B., REIS, F.M. Effects of Bromocriptine on Serum Prolactin levels, Pituitary Weight and Immunoreactive Prolactin Cells in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats: An Experimental Model of Estrogen-Dependent Hyperprolactinemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, *in press*, 1996.

RIBEIRO, M.F., SPRITZER, P.M., OLIVEIRA, M.C., BARBOSA-COUTINHO, L.M., PAVANATO, M.A., SILVA, I.S.B. Effects of Bromocriptine on Serum Prolactin levels and Pituitary Immunoreactive Prolactin Cells in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats: A Fruitfull Experimental Model of Estrogen-Dependent Hyperprolactinemia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, **39**: 63, 1995.

SPRITZER, P.M., RIBEIRO, M.F.M., OLIVEIRA, M.C., BARBOSA-COUTINHO, L.M., SILVA, I.S.B., DAHLEM, N., CERICATTO, R., PAVANATO, M.A. Effects of Tamoxifen on Serum Prolactin Levels, Pituitary Immunoreactive Prolactin Cells and Uterine Growth in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats. **Hormone and Metabolic Research**, **28**: 171-176, 1996.

Artigos em Preparação:

1. Hyperprolactinemia and immobility induced by forced swimming in rats.
2. Comparison of two models of chronic hyperprolactinemia in rats: evaluation of uterine growth and serum prolactin and estradiol levels.

RESUMO

A prolactina (PRL) é um hormônio secretado pela hipófise anterior que exerce múltiplas funções, relacionadas ou não com os processos reprodutivos. Este hormônio é importante no início e manutenção da lactação e modula a ação das gonadotrofinas. Desta forma, modificações na sua secreção, como a hiperprolactinemia, estão associadas com alterações menstruais, galactorréia e infertilidade. Além disso, os prolactinomas são os adenomas hipofisários mais prevalentes e, uma causa relativamente freqüente de hiperprolactinemia. A regulação da secreção de PRL é bastante complexa, envolvendo vários sistemas de neurotransmissores centrais e neuropeptídeos de origem hipotalâmica ou dos lobos hipofisários posterior e intermediário. Os principais estímulos fisiológicos para sua secreção são a sucção, o estresse e o estrogênio. A própria PRL autorregula sua secreção e sofre influências de vários peptídeos que atuam através de mecanismos parácrinos e autócrinos. Diferente de outros hormônios hipofisários, a PRL não é regulada por retroalimentação de hormônios secretados pela glândula alvo, e o controle hipotalâmico é essencialmente inibitório. A dopamina é responsável pela inibição tônica exercida pelo hipotálamo e sua ação pode ser modulada por outros reguladores, principalmente os liberadores, como o estrogênio.

O estrogênio é um potente estimulador da secreção de PRL e

sua administração pode induzir adenomas hipofisários dependendo da dose, duração do tratamento, espécie e suscetibilidade da cepa. A bromocriptina (BCP) é um agonista dopaminérgico bastante eficiente em reduzir a hiperprolactinemia e o tamanho de tumores hipofisários secretores de PRL, tanto clínica como experimentalmente. Considerando que os estrogênios induzem hiperprolactinemia, têm sido investigados os efeitos sobre a secreção de PRL de alguns fármacos com ação antiestrogênica, como o tamoxifeno e os progestogênios. O tamoxifeno (TAM) é um inibidor competitivo do receptor estrogênico, enquanto os progestogênios atuam diminuindo os receptores estrogênicos e/ou estimulando a enzima conversora de estradiol em estrona. Existe um grande número de modelos experimentais para o estudo da regulação da secreção de PRL, dependendo dos parâmetros avaliados. O estímulo da função e proliferação lactotróficas através da administração de estrogênios é um desses modelos, embora não haja uma padronização quanto aos fármacos, às doses e à duração dos tratamentos utilizados.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo experimental de hiperprolactinemia dependente do estrogênio, avaliando-se níveis de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de células imunorreativas à PRL na hipófise de ratas, que receberam vários esquemas de tratamento estrogênico. Após a validação do modelo pela avaliação das variáveis estudadas em resposta à administração de BCP, foram investigados os efeitos de um progestogênio, o acetato de noretisterona (NA), de um antiestrogênio, o tamoxifeno (TAM), e da associação de TAM com NA e BCP, sobre os mesmos parâmetros.

Foram utilizadas ratas Wistar adultas, ovariectomizadas e tratadas semanalmente, durante 2, 4 ou 10 semanas, com duas doses de benzoato de estradiol

(BE): 50 ou 300 µg/rata (E50 e E300, respectivamente). Associado ao BE também foram administrados, nos últimos 5 ou 12 dias do tratamento estrogênico, BCP (0,05 ou 0,6 mg), NA (0,5 ou 0,1 mg), TAM (20 ou 60 µg) ou TAM combinado com NA e BCP, nas doses mais baixas. Estes fármacos foram administrados diariamente e todas as injeções foram realizadas por via subcutânea. As ratas foram sacrificadas por decapitação, e as hipófises foram removidas imediatamente, pesadas e fixadas em formalina para posterior processamento por imunohistoquímica. O sangue troncular foi coletado, centrifugado e o soro armazenado a -20°C até a dosagem de PRL por radioimunoensaio de duplo anticorpo. As hipófises foram incluídas em parafina e três cortes de cada uma foram corados de acordo com o método da avidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981 modificado por COUTINHO, 1988). O cromógeno utilizado foi o diaminobenzidina (DAB). Em áreas escolhidas ao acaso foram contadas 200 células nucleadas, registrado o número de células contendo PRL e o resultado foi expresso em percentual de células coradas em relação ao número total de células contadas.

Foram determinados os valores de referência para as variáveis estudadas, ou seja, níveis de prolactina sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos, nos grupos controle. Em relação à PRL sérica e ao peso da hipófise, observou-se que não houve diferença significativa entre os dados obtidos em ratas ovariectomizadas e intactas. Além disso, constatou-se a reprodutibilidade destes resultados. Avaliou-se a variação das concentrações de PRL sérica durante as fases do ciclo estral e, verificou-se que não houve diferença significativa entre as médias da concentração de PRL nas diferentes fases do ciclo, nem em relação às ratas intactas. Os resultados deste

trabalho mostram que houve diminuição significativa no percentual de lactotrofos das ratas ovariectomizadas em relação ao número encontrado nas ratas intactas.

Estabeleceram-se duas condições de hiperprolactinemia: um estado de hiperprolactinemia “funcional” e outro, com hiperprolactinemia associada a aumento do peso hipofisário e proliferação de lactotrofos. A administração da dose maior de BE (E300) promoveu alterações proliferativas na hipófise, enquanto a dose menor (E50) gerou hiperprolactinemia “funcional”.

Este modelo experimental foi validado com a reprodução dos efeitos antiprolactinêmicos e antiproliferativos da BCP. Esses efeitos foram dependentes da dose utilizada.

A determinação dos efeitos do NA sobre os mesmos parâmetros demonstrou que os efeitos antiproliferativos foram observados em ratas tratadas com E300 e não nas tratadas com E50. Quanto aos níveis de PRL sérica, a administração de NA (0,5 mg) associado ao tratamento com E50/4 semanas, E300/2 semanas e E300/4 semanas reduziu parcialmente esses níveis. Por outro lado, a associação de NA (0,1 mg) ao tratamento prolongado com E300 (10 semanas) produziu redução significativa da concentração de PRL sérica, mas não induziu alterações proliferativas na hipófise. Estes dados sugerem que o efeito antiprolactinêmico do NA depende de um equilíbrio de doses com o BE, e que a existência de hiperprolactinemia prévia pode ser um fator importante. Para demonstrar redução do peso da hipófise e do percentual de lactotrofos em ratas tratadas com E300, durante 2 e 4 semanas, foi necessária a administração de NA durante 12 dias.

A combinação de TAM e NA associada ao tratamento estrogênico prolongado com E300 não modificou os níveis séricos de PRL nem o peso da hipófise. Quanto ao

percentual de lactotrofos, a utilização de 20 µg de TAM combinado com NA potencializou o efeito antiproliferativo desses fármacos. Isso ocorreu, possivelmente, devido à diferença entre os mecanismos de ação do TAM e do NA.

Também foi avaliado o efeito da associação de TAM e BCP e verificou-se que essa associação não alterou significativamente o peso hipofisário e o percentual de lactotrofos. Em relação aos níveis séricos de PRL, o TAM parece ter bloqueado o efeito antiprolactinêmico da BCP. Neste caso, o TAM poderia ter agido como agonista estrogênico antagonizando os efeitos dopaminérgicos. Esta hipótese não foi testada neste trabalho.

Os dados do presente trabalho enfatizam a importância da interação estrogênio/antiestrogênio na expressão da hiperprolactinemia. Estudos posteriores poderão definir melhor a função dos antiestrogênios, os mecanismos moleculares através dos quais atuam em estados hiperprolactinêmicos e sua relação com a dopamina e seus agonistas, e/ou com os progestogênios. Além disso, o modelo experimental desenvolvido neste trabalho permite investigar mais profundamente as interações dos estrogênios com outros reguladores da secreção da PRL, como dopamina, progestogênios, e vários neurotransmissores e/ou neuromoduladores sabidamente importantes nessa regulação.

ABSTRACT

Prolactin (PRL) is an anterior pituitary hormone that fulfills multiple functions, related or not to reproductive processes. It modulates gonadotropin action and is important for the onset and maintenance of lactation. Therefore, substantial changes in PRL levels, such as hyperprolactinemia, are related to menstrual disorders, galactorrhea and infertility. In addition, prolactinomas are the most prevalent hypophyseal adenomas and a fairly common cause of hyperprolactinemia. The regulation of PRL secretion is quite complex, and involves a great number of central neurotransmitters and neuropeptides from the hypothalamus and from the posterior and intermediate hypophyseal lobes. The main physiological stimuli to its secretion are suckling, stress and estrogen. PRL release is also influenced by a number of peptides which act through paracrine and autocrine mechanisms, as well as by an autoregulatory feedback. Unlike other pituitary hormones, PRL is not regulated by feedback from target gland hormones, and its hypothalamic control is essentially inhibitory. The tonic inhibition exerted by the hypothalamus is imputable to dopamine, whose action can be modulated by other substances, like estrogen.

Estrogen acts as a potent stimulator of PRL release and its administration may induce pituitary adenomas depending on dose, treatment duration, species and strain susceptibility. Bromocriptine (BCP), a dopaminergic agonist, is highly effective in reducing hyperprolactinemia, as well as the size of PRL-secreting pituitary tumors, both clinically and experimentally. Since estrogens induce hyperprolactinemia, the effects of some antiestrogenic substances – like tamoxifen and progestins – on PRL secretion have been thoroughly investigated. Tamoxifen (TAM) is a competitive inhibitor for the estrogen receptor, while progestins act by decreasing estrogen receptors and/or stimulating the enzyme that converts estradiol into estrone. There are many experimental models for studying the regulation of PRL secretion which can be chosen according to the parameters to be assessed. One of these models is the stimulation of lactotroph function and proliferation by estrogen administration, even though the drug, dosage and treatment length have not been standardized to date.

The present study aims to develop an experimental model of estrogen-dependent hyperprolactinemia by assessing serum PRL levels, pituitary weight and percentage of PRL immunoreactive cells in the pituitary gland of female rats undergoing several estrogen treatment schedules. After validation of the model through evaluation of the BCP effects on the studied variables, the effects of norethisterone acetate (NA), a progestin, tamoxifen (TAM), an antiestrogen, and the association of TAM with NA and BCP were investigated under the same parameters.

Ovariectomized Wistar female rats were weekly treated for 2, 4 or 10 weeks with two subcutaneous doses of estradiol benzoate (EB): 50 or 300 µg/rat (E50 and E300,

respectively). In the last 5 or 12 days of estrogen treatment, BCP (0.05 or 0.6 mg), NA (0.5 or 0.1), TAM (20 or 60 μ g) or TAM combined with NA and BCP in the lowest doses, were daily administered in subcutaneous injections. Rats were sacrificed by decapitation and their pituitaries were immediately dissected out to be weighed and fixed in formalin for posterior immunohistochemical processing. Trunk blood samples were collected and centrifuged, and the serum stored at -20°C until assayed for PRL by a double-antibody radioimmunoassay. The pituitaries were included in paraffin and three sections of each specimen were stained according to the avidin-biotin peroxidase method (HSU et al., 1981, modified by COUTINHO, 1988). Diaminobenzidine (DAB) was used as the chromogen. In areas chosen at random, 200 nucleated cells were counted, the number of cells containing PRL was recorded and the result was expressed as the percentage of stained cells relative to total number of counted cells.

Reference values for the variables studied were established, namely, serum prolactin levels, pituitary weight and percentage of PRL immunoreactive cells in the control groups. As regards serum PRL levels and pituitary weight, no significant difference was observed between data obtained from ovariectomized and from intact rats. In addition, the reproducibility of these results was established. Also, the oscillation of serum PRL levels through the estrous cycle was assessed, and no significant difference was observed between mean PRL levels in the different phases of the cycle. The results also showed a significant decrease in the percentage of lactotrophs in ovariectomized rats as compared to the number detected in intact rats.

Two conditions of hyperprolactinemia were established: “functional” hyperprolactinemia and hyperprolactinemia associated with increased pituitary weight and lactotroph proliferation. The administration of the highest dose of BE (E300) induced proliferative alterations in the pituitary, whereas the lowest dose (E50) produced “functional” hyperprolactinemia.

This experimental model was validated by the replication of the antiprolactinemic and antiproliferative effects of BCP. Such effects were dose-dependent.

Determination of NA effects on the same parameters demonstrated that its antiproliferative effects were observed in rats treated with E300 but not in those treated with E50. The administration of NA (0.5 mg) associated with E50 (4 weeks), E300 (2 weeks) and E300 (4 weeks) determined a partial reduction of serum PRL levels. On the other hand, association of a low dose of NA (0.1 mg) with E300 long-term treatment (10 weeks) caused a significant reduction in serum PRL levels, but did not induce proliferative hypophyseal alterations. These effects suggest that the antiprolactinemic effect of NA depends on its balance with BE doses and is influenced by the presence of previous hyperprolactinemia. NA was administered for 12 days in order to demonstrate reduction of pituitary weight and percentage of lactotrophs in rats treated with E300 for 2 and 4 weeks.

The combination of TAM and NA associated with prolonged estrogen treatment with E300 did not modify serum PRL levels or pituitary weight. With regard to lactotroph percentage, the use of 20 μ g of TAM combined with NA potentiated the

antiproliferative effects of these substances. This may have occurred due to the different mechanisms of action of TAM and NA.

The effect of TAM and BCP was also assessed and this association did not significantly alter pituitary weight and lactotroph percentage. As to serum PRL levels, TAM appears to have blocked the antiprolactinemic effect of BCP. In such instance, TAM may have acted as an estrogen agonist counteracting the dopaminergic effect of BCP. This hypothesis has not been tested in the present work.

The present data emphasize the importance of estrogen/antiestrogen interaction in the expression of hyperprolactinemia. Further studies will better define the function of antiestrogens, the molecular mechanisms through which they act in hyperprolactinemic conditions and their connection with dopamine and its agonists, and/or with progestins. Moreover, the experimental model developed herein can serve as a useful tool in the investigation of the interactions between estrogens and dopamine, progestins, and various neurotransmitters and/or neuromodulators well-known as important factors for the regulation of PRL release.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROLACTINA

A prolactina (PRL) é um hormônio hipofisário envolvido no controle de uma ampla variedade de processos fisiológicos, reprodutivos e não reprodutivos, incluindo equilíbrio hidrossalino, metabolismo, respostas imunes, proliferação e diferenciação celular. A PRL é essencial para o início e manutenção da lactação, regulando o desenvolvimento e diferenciação das glândulas mamárias, e induzindo a síntese de α -lactoalbumina e caseína. Além disso, a PRL participa de vários processos relacionados à reprodução, como a maturação folicular, a esteroidogênese gonadal, o comportamento, a sensibilidade das gônadas à ação das gonadotrofinas, o padrão secretório do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, em roedores, induz a ovulação e mantém a atividade do corpo lúteo.

A prolactina humana hipofisária é um hormônio proteico, constituído de uma cadeia polipeptídica com 199 aminoácidos e 3 pontes dissulfeto, com peso molecular de 23.000 daltons. Esta forma de PRL corresponde a 80% da PRL circulante e apresenta grande atividade biológica. Existem outras formas de PRL no plasma, com significância biológica ainda não bem esclarecida, e que correspondem a 10-20% da

PRL imunoativa (SINHA, 1995). Entre elas estão a forma “*big*” (50.000 daltons), a “*big-big*” (100.000 daltons) e a glicosilada (25.000 daltons). As formas maiores estão mais frequentemente presentes no plasma de pacientes com tumores secretores de PRL. Foram isoladas formas menores (8.000 e 16.000 daltons) que poderiam representar variantes da PRL que sofrem clivagem e exercem efeito parácrino (ANDRIES et al., 1992). A neuro-hipófise também pode ser a fonte de mensageiros químicos relacionados com a família da PRL (TORNER et al., 1995). A PRL é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso dos lactotrofos, a partir da clivagem de um precursor (pré-PRL) e transportada para o Golgi, onde é armazenada em grânulos. Formas estruturalmente similares são secretadas pelo endométrio e pela placenta.

A meia vida da PRL é de aproximadamente 20 minutos e os valores plasmáticos normais variam de 5-10 ng/ml nos homens e de 5-20 ng/ml nas mulheres durante o período reprodutivo. Os valores normais variam de acordo com o ambiente hormonal e a situação fisiológica, aumentando na puberdade, durante a gestação e, na lactação, apresentando picos relacionados com a sucção mamilar. A PRL é secretada de forma pulsátil, e apresenta um ritmo circadiano de secreção com maior liberação à noite, elevando-se a partir de 10-60 minutos do início do sono (SASSIN et al., 1972). Em ratos há um ritmo estimulador endógeno, responsável por dois picos de liberação de PRL, um diurno (17-19 horas) e um noturno (3-5 horas) (AREY et al., 1989). Na espécie humana, as mulheres apresentam flutuações na concentração de PRL sérica durante o ciclo menstrual, que podem ser significativas no período peri-ovulatório. Em ratas, os níveis séricos de PRL variam em função do ciclo estral e um pico de liberação de PRL ocorre na tarde do dia do proestro (LAFUENTE et al., 1993).

A adeno-hipófise é um órgão endócrino complexo que contém, no mínimo, seis tipos de células secretoras de hormônios. Além disso, uma população de células secretoras de um hormônio pode ser composta de várias subpopulações celulares. Os lactotrofos de ratas lactantes, estão localizados preferencialmente em duas regiões da hipófise anterior: uma região interna, central e outra região mais periférica, externa. As células da zona externa liberam PRL mais rapidamente, após o estímulo da sucção, sugerindo que a regulação de cada região pode ser diferente (PAPKA et al., 1986). Foi descrito que as células da zona externa são mais responsivas ao hormônio liberador de tireotrofina (TRH), enquanto as da zona interna respondem mais à dopamina (BOOCKFOR & FRAWLEY, 1987). Hu e Lawson (1994) demonstraram que o número de células imunorreativas à PRL, em ratas ovariectomizadas, pode variar entre as regiões da hipófise e entre células com diferentes densidades. A conexão entre a hipófise anterior e o hipotálamo se dá por meio dos vasos porta hipofisários. Esses vasos consistem de capilares localizados na eminência mediana, haste hipofisária e lobo neural que são supridos pelas artérias hipofisárias superior, intermediária e inferior, respectivamente. Os capilares da eminência mediana alcançam a hipófise anterior através dos vasos porta longos, que se estendem junto à haste hipofisária. Os vasos porta curtos fazem a comunicação entre o lobo posterior e o anterior da hipófise, contribuindo com 20-30% do fluxo sanguíneo que chega à hipófise anterior. O fluxo bidirecional, através dos vasos porta longos, amplia a transferência de informações entre os componentes do sistema hipotálamo hipofisário (OLIVER et al., 1977; DORSA et al., 1979; MEZEY et al., 1978).

1.2 REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DA PROLACTINA

A regulação da secreção de PRL é complexa e envolve a interação de vários fatores hipotalâmicos, neurotransmissores e hormônios periféricos, que atuam por mecanismos neuroendócrinos, parácrinos ou autócrinos. Diferente dos outros hormônios secretados pela adenohipófise, a PRL não é mantida sob retroalimentação de hormônios secretados por uma glândula periférica e o controle hipotalâmico é essencialmente inibitório.

1.2.1. REGULAÇÃO CENTRAL DA SECREÇÃO DA PROLACTINA

Várias linhas de evidências sugerem que a dopamina é o hormônio hipotalâmico responsável pela inibição da PRL. Neurônios dopaminérgicos do sistema túbero-infundibular (TIDA), cujos corpos celulares estão localizados no núcleo arqueado e nos núcleos periventriculares do hipotálamo médiobasal, estendem seus terminais axônicos até a zona externa da eminência mediana. A dopamina (DA) secretada por esses neurônios alcança a adeno-hipófise através dos vasos longos do sistema porta hipofisário e, agindo em receptores (D2) específicos nos lactotrofos (CRONIN et al., 1978), inibe tónicamente a secreção de PRL (BEN-JONATHAN, 1985). Neurônios dopaminérgicos do sistema túbero-hipofiseal, também originados no núcleo arqueado, liberam DA nos lobos posterior e intermediário da hipófise. A DA proveniente deste outro sistema chega à hipófise anterior através dos vasos porta curtos. A manutenção da hipófise fora da influência inibitória do hipotálamo, por meio

da secção da haste hipofisária, lesões hipotalâmicas ou do transplante da hipófise, leva ao aumento da produção de PRL (CHEN et al., 1970; KANEMATSU & SAWYER, 1973). Este dado demonstra que a conexão entre a eminência mediana e a hipófise anterior é crítica para a manutenção do controle fisiológico da secreção de PRL. Ben-Jonathan et al. (1977) mostraram que os níveis de DA são mais altos na circulação porta do que na circulação geral, e Gibbs e Neill (1978) confirmaram que a concentração de DA no sangue portal é suficientemente elevada para causar inibição da secreção de PRL *in vivo*. Por outro lado, a administração de DA ou de agonistas da DA inibe a liberação de PRL pelos lactotrofos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MARTIN et al., 1984; MAURER, 1980; EATON et al., 1993). Alguns autores demonstraram que doses baixas de DA podem estimular a secreção de PRL (PARKER & LAWSON, 1993; AREY et al., 1993), o que poderia representar a ativação de subtipos do receptor D2, distintas proteínas G ou segundos mensageiros diferentes, de acordo com a dose utilizada (BURRIS et al., 1992). O efeito inibitório da DA na secreção de PRL foi associado à proteína Gi (KINEMAN et al., 1994) e ao fosfatidilinositol (CANONICO et al., 1983), enquanto o estimulatório poderia ser mediado pelo cálcio (BURRIS & FREEMAN, 1993). Além disso, a secreção de PRL pode ser estimulada por drogas que bloqueiam os receptores dopaminérgicos (fenotiazinas, metoclopramida) ou que causam depleção da DA hipotalâmica, como reserpina, metildopa ou inibidores da monoamina oxidase (APUD et al., 1980).

A DA está envolvida numa rede complexa de interações com outros hormônios ou neurotransmissores e os níveis de PRL, em um dado momento, são também influenciados por outros hormônios inibidores, liberadores e/ou moduladores. Assim, não existe uma simples relação inversa entre a atividade dos TIDA, ou a

concentração portal de DA, e os níveis de PRL circulante. Gudelsky e Porter (1980) verificaram aumento da concentração de DA nos vasos porta hipofisários injetando PRL por via intracerebroventricular. A injeção de haloperidol (antagonista dopaminérgico) também aumenta a DA portal, enquanto a administração de anticorpo contra PRL atenua esse efeito (GUDELSKY & PORTER, 1980). Então, a PRL pode regular sua secreção através da estimulação da liberação de DA, formando uma alça de retroalimentação negativa. A hiperprolactinemia de curta duração aumenta a atividade dos TIDA resultando num *feedback* de alça curta, inibindo a secreção de PRL. No entanto, durante a hiperprolactinemia crônica, a atividade dopaminérgica pode ser diminuída e os efeitos da DA na liberação de PRL reduzidos (SARKAR et al., 1984). Foram identificados, por autoradiografia e hibridização *in situ*, receptores específicos para PRL em núcleos hipotalâmicos, reforçando a existência de funções regulatórias diretas da PRL na liberação hipotalâmica de neurohormônios e neuromediadores (CRUMEYROLLE-ARIAS et al., 1993; CHIU et al., 1992). O número de sítios de ligação para PRL no hipotálamo aumenta com a administração de PRL ovina ou com o aumento da PRL endógena, induzido por implante hipofisário na cápsula renal (MUCCIOLI & DI CARLO, 1994). Vários estudos, realizados *in vitro* e *in vivo*, descrevem o efeito inibitório da PRL sobre sua própria secreção (FRAWLEY & CLARK, 1986; SELMANOFF, 1985; KADOWAKI et al., 1984). Tong e Pelletier (1992) demonstraram que o efeito de retroalimentação de alça curta, exercido pela PRL, pode ser mediado pela βendorfina. A PRL também pode reduzir a síntese de serotonina no hipotálamo através de um mecanismo que envolve a ativação de receptores dopaminérgicos (KING et al., 1985).

A identificação de receptores específicos para PRL em diferentes células da adeno-hipófise sugere que este hormônio pode também ter efeitos modulatórios através de um mecanismo autócrino ou parácrino (MOREL et al., 1994). A interação parácrina entre os lactotrofos e outras células hipofisárias não parece ser importante para a liberação aguda da PRL, porém, pode estar envolvida nas alterações crônicas da secreção de PRL, como nas que ocorrem após tratamento estrogênico (JONES et al., 1990). Deneff e Andries (1983) demonstraram que os gonadotrofos podem estimular a atividade secretória dos lactotrofos através da liberação de um fator humoral parácrino. O agente mediador desse efeito parece ser a angiotensina II, liberada dos gonadotrofos em resposta ao GnRH. Outras células e vários peptídeos podem estar envolvidos no controle parácrino da secreção de PRL. Os corticotrofos exercem um efeito inibitório tônico sobre a secreção de PRL, mediado pela ação da acetilcolina em receptores muscarínicos (CARMELIET & DENEFF, 1988). Alguns peptídeos, como peptídeo intestinal vasoativo (VIP), calcitonina, cininas, neurotensina, substância P e bombesina, também podem estar relacionados com o controle parácrino da secreção de PRL (ARONIN et al., 1986; SHAH et al., 1993; HOUBEN et al., 1994; JONES et al., 1990). A regulação autócrina inclui o efeito do VIP e de fatores de crescimento como EGF, FGF e IGFs, embora ainda seja discutida a importância fisiológica destes e de outros peptídeos.

Arey et al. (1989) demonstraram a existência de um ritmo estimulatório endógeno da secreção de PRL, específico nas ratas fêmeas, constituído por um pico noturno e um diurno. Esse ritmo endógeno está relacionado com flutuações cíclicas da atividade de neurônios ocitocinérgicos localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (AREY & FREEMAN, 1992). A liberação de ocitocina por esses

neurônios é regulada preferencialmente pela serotonina e pelo VIP, na fase diurna e noturna, respectivamente (AREY & FREEMAN, 1992a). Por outro lado, ratas ovariectomizadas, ou tratadas com estradiol, apresentam um ritmo circadiano endógeno de atividade dopaminérgica nos TIDA (MAI et al., 1994). Tem sido sugerido que um ritmo colinérgico endógeno está envolvido na regulação da atividade circadiana desses neurônios dopaminérgicos (SHIEH & PAN, 1995).

A regulação central da PRL inclui uma interação funcional entre vários neurotransmissores que podem modular a liberação de DA, de outros fatores reguladores ou atuar diretamente nos lactotrofos. O hormônio liberador da tireotrofina (TRH) tem sido considerado como um importante fator hipotalâmico liberador de PRL. Muitos autores já demonstraram o efeito estimulador do TRH sobre a secreção de PRL, *in vivo* e *in vitro* (RIVIER & VALE, 1974; HOYT & TASHJIAN, 1980; JACOBS et al., 1971). A administração de TRH produz hipertrofia e hiperfunção dos lactotrofos, na presença de tiroxina (OZAWA & KUROSUMI, 1993). A injeção de TRH em indivíduos normais, e naqueles com hiperprolactinemia idiopática, eleva os níveis de PRL sérica e este efeito tem sido preconizado como teste para a avaliação clínica e experimental da função lactotrófica. A liberação de PRL induzida pelo TRH pode ser bloqueada pela ativação de receptores GABA-B (LUX et al., 1992) e estimulada com a redução da infusão de DA (FAGIN & NEILL, 1981). O TRH pode estimular a secreção de PRL em algumas condições hormonais específicas. Em outras, como na lactação, existem alguns dados contraditórios (BLAKE, 1974; van HAASTEREN et al., 1996; GROSVENOR & MENA, 1980). Na lactação, o TRH poderia interagir com neurônios dopaminérgicos aumentando sua atividade (SCHUILING et al., 1993).

Foram identificados receptores para TRH em prolactinomas (LeDAFNIET et al., 1983) e, células derivadas de tumor hipofisário (GH3) em cultura apresentaram aumento de células liberadoras de PRL quando tratadas com TRH (BOOCKFOR et al., 1985). Além disso, a ação do TRH sobre a secreção de PRL pode ser modulada por outros hormônios, como os tireoidianos e o estradiol (OZAWA & KUROSUMI, 1993; JACKSON, 1982).

Embora existam alguns resultados controversos, há evidências de que a serotonina (5HT) seja um estimulador da secreção de PRL. O efeito da 5HT na regulação da PRL parece não ocorrer diretamente nos lactotrofos e sim no hipotálamo. O tratamento de ratos com 5HT, agonistas serotoninérgicos, precursores e inibidores da recaptção da 5HT estimulam a liberação de PRL (LAWSON & GALA, 1978; SIGNS et al., 1994). O bloqueio da síntese de 5HT inibe parcialmente a liberação de PRL de ratas em proestro (HORN & FINK, 1985). A inervação serotoninérgica provém dos núcleos da rafe e, no hipotálamo, além de inibir a atividade dopaminérgica túbero-infundibular, estimula a secreção de fatores liberadores de PRL na circulação porta. A integridade do núcleo paraventricular e da neuro-hipófise parece ser indispensável para o efeito liberador da 5HT sobre a secreção de PRL (JOHNSTON et al., 1986; MINAMITANI, 1987). Bloqueadores de receptores 5HT, como metisergida, aumentam a secreção de PRL, e após 2-4 horas a concentração de PRL diminui, *in vivo*, enquanto *in vitro* parece não ter efeito (LAMBERTS & MacLEOD, 1978). Os estudos farmacológicos são controversos devido à interação com o sistema dopaminérgico e pela inespecificidade de alguns bloqueadores utilizados. Várias evidências indicam que os receptores 5HT₂/HT_{1c} e 5HT₃ periféricos, e não centrais, participam da regulação da secreção da PRL

(RITTENHOUSE et al., 1993; LEVY et al., 1993). Jorgensen et al. (1993) descreveram uma potencialização dos efeitos estimuladores da secreção de PRL com a ativação de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos. A serotonina pode estimular a liberação de PRL, tanto por liberação de outros fatores liberadores, como TRH e VIP, como diminuindo a secreção de inibidores, como a DA (PILLOTTE & PORTER, 1981; CHEN & RAMIREZ, 1981). Signs et al. (1994) demonstraram que a estimulação serotoninérgica eleva os níveis hipofisários do mRNA da PRL e do VIP. Também foi descrito que a administração de 5HT estimula a liberação do VIP nos vasos porta-hipofisários (SHIMATSU et al., 1982).

O VIP é um peptídeo de 28 aminoácidos que foi primeiro isolado no trato gastrointestinal e também identificado, por imunocitoquímica, no sistema nervoso central (PELLETIER et al., 1981). Besson et al. (1979) descreveram a presença de VIP em terminais nervosos distribuídos em várias regiões do sistema nervoso central de ratos, o que sugere sua ação como neurotransmissor. A administração intracerebroventricular de VIP pode modificar a liberação hormonal pela hipófise anterior (VIJAYAN et al., 1979). Carrillo e Dluzen (1993) demonstraram que a ablação da eminência mediana e núcleo arqueado reduziu a concentração de VIP na hipófise, confirmando a importância da conexão hipotálamo-hipófise na sua regulação. O VIP tem sido proposto como forte candidato a fator liberador da PRL, já que estimula a secreção de PRL tanto *in vivo* como *in vitro* (SHAAR et al., 1979; KATO et al., 1978). Além disso, o efeito estimulador do VIP sobre a secreção de PRL pode ser neutralizado por antagonistas e anticorpos anti-VIP em algumas situações. Abe et al. (1985) descreveram que o aumento da secreção da PRL induzido pelo éter pode ser bloqueado pela administração de anticorpo anti-VIP. A resposta da

PRL ao estímulo da sucção foi parcialmente inibida pelo mesmo anticorpo. Por outro lado, o VIP é também sintetizado na hipófise (ARNAOUT et al., 1986) onde poderia exercer efeitos parácrinos ou autócrinos (NAGY et al., 1988). Estudos realizados *in vitro* confirmam uma ação direta do VIP sobre os lactotrofos (MATSUSHITA et al., 1983). O VIP pode estar envolvido na hipersecreção de PRL associada com a formação de prolactinomas induzida por estrogênio, pois grandes doses de estradiol estimulam a concentração do VIP na hipófise (PRYSOR-JONES et al., 1988; CARRILLO et al., 1991). Samson et al. (1989) demonstraram que a ocitocina pode ser mediadora da ação do VIP sobre a secreção de PRL.

Os opióides centrais exercem efeito estimulatório sobre a secreção de PRL (PARROT & GOODE, 1993) e podem ser importantes na regulação da liberação de PRL induzida pelo estresse e pela sucção (FERLAND et al., 1978). No entanto, a importância dos opióides endógenos na secreção basal de PRL permanece em discussão. A administração de morfina estimula a atividade de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos, enquanto reduz a atividade dopaminérgica, em núcleos hipotalâmicos (HASKINS et al., 1981; FERLAND et al., 1979; JONHSTON & NEGRO-VILAR, 1986; KOENIG et al., 1979). Embora esteja bem estabelecido o efeito dos opióides sobre a atividade dopaminérgica na eminência mediana, alguns autores não encontraram correlação entre os efeitos dos opióides e o sistema dopaminérgico (DELITALA et al., 1983; LOX & PAU, 1993). Spampinato et al. (1979) demonstraram o envolvimento da 5HT como mediadora da ação de encefalinas sobre a secreção de PRL. Além disso, o uso de antagonistas da 5HT bloqueiam o efeito inibitório da morfina sobre os neurônios dopaminérgicos, indicando que a serotonina poderia mediar esse efeito (DEMAREST & MOORE,

1981). Por outro lado, neurônios opiatérgicos localizados no núcleo arqueado podem estar sob controle dopaminérgico (NOHTOMI et al., 1984). Esse controle poderia explicar a inibição da secreção de β endorfina pelo aumento da atividade dopaminérgica, em mulheres hiperprolactinêmicas (SEKI et al., 1995). Além disso, parece haver interações importantes entre as catecolaminas, os opióides endógenos e os esteróides sexuais sobre a regulação da secreção da PRL (PLOSKER et al., 1990).

O GABA exerce efeito estimulatório e inibitório sobre a secreção de PRL (MIODUSZEWSKI et al., 1976). O efeito estimulatório é devido, em parte, à inibição da atividade dopaminérgica dos TIDA, e o efeito inibitório é exercido na hipófise, através da ativação de receptores GABA-B (LAMBERTS & MacLEOD, 1978; WALDMEIER ET AL., 1978; LOCATELLI et al., 1979; LUX et al., 1992). A administração intracerebroventricular de GABA pode ter efeitos opostos sobre a secreção de PRL, dependendo da dose utilizada (VIJAYAN & McCANN, 1978). Por outro lado, a administração sistêmica de GABA não alterou os níveis basais de PRL sérica, mas inibiu a secreção de PRL induzida por 5HT (LAMBERTS & MacLEOD, 1978). Embora ainda em discussão, a ocitocina pode exercer efeito facilitatório ou inibitório sobre a secreção de PRL interagindo com a PRL e o VIP, via um complexo sistema de retroalimentação (RICHARD et al., 1991). O controle da secreção basal de PRL pode envolver, também, a participação de receptores adrenérgicos centrais (De CASTRO E SILVA & ANTUNES-RODRIGUES, 1989; SHIN & BARTON, 1993), histaminérgicos (NAVARRO et al., 1993), kappa e outros receptores opióides (KEHOE et al., 1993; MANZANARES et al., 1993). Outros peptídeos e neuromoduladores como angiotensina II (STEELE, 1992), galanina (WYNICK et al., 1993), peptídeo natriurético atrial (STEELE, 1990), neurotensina (VIJAYAN et al.,

1988), substância P (ARONIN et al., 1986) e neuropeptídeo Y (REZNIKOV & McCANN, 1993) também parecem ser importantes na regulação da secreção basal de PRL.

1.2.1.1. REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE PRL INDUZIDA PELA SUCCÃO

A secreção de PRL durante a lactação é mantida por um reflexo neuroendócrino desencadeado pelo estímulo da sucção mamilar. A estimulação mecânica de receptores sensoriais do mamilo desencadeia um impulso neural que, através da medula espinhal e do mesencéfalo, alcança o hipotálamo. Esse estímulo promove um rápido aumento da PRL plasmática, alcançando valores máximos em 15-30 minutos. A DA e o TRH parecem ser os mediadores desse aumento, já que a sucção mamilar reduz a liberação hipotalâmica de DA e aumenta a de TRH (de GREEF et al., 1987). A DA parece ter maior efeito inibitório sobre a síntese e armazenamento da PRL enquanto o TRH estimula a liberação da PRL já formada (MENA et al., 1989). A eficácia do TRH em mediar a liberação da PRL induzida pela sucção aumentou quando os níveis de DA foram reduzidos previamente (de GREEF & VISSER, 1981). Na verdade, uma redução transitória dos níveis hipotalâmicos de DA parece ser essencial para a ação de outros reguladores da liberação de PRL provocada pela sucção. Nagy e Frawley (1990) descreveram que os lactotrofos de ratas lactantes apresentam maior suscetibilidade ao efeito estimulatório do TRH e da angiotensina II e menor sensibilidade à DA. Os lactotrofos localizados em diferentes regiões da hipófise também respondem de forma distinta ao estímulo da sucção

(NAGY et al., 1991). O TRH pode ser importante nos primeiros dias de lactação e durante o estímulo agudo da sucção e não na sucção continuada (van HAASTEREN et al., 1996). Plotsky e Neill (1982) mostraram que a estimulação elétrica do nervo mamário produz uma diminuição transitória da secreção de DA na circulação porta acompanhada por aumento da PRL sérica. Além disso, a sucção diminui o mRNA da tirosina hidroxilase no núcleo arqueado (WANG et al., 1993). É possível que, durante a lactação, os TIDA alterem suas características funcionais tornando-se insensíveis ao estrogênio e à morfina (CALLAHAN et al., 1988; HIGUCHI et al., 1992). No entanto, a brevidade da redução da DA parece insuficiente para induzir o aumento importante das concentrações de PRL que ocorre com a sucção. A observação de que a retirada do lobo posterior da hipófise aumenta os níveis basais da PRL indica a participação da DA, originada na hipófise posterior, na inibição da secreção de PRL. Por outro lado, o estímulo da sucção mamilar não aumentou os níveis de PRL nos animais lobectomizados, sugerindo que além da DA o lobo posterior pode conter fatores liberadores envolvidos na regulação da secreção de PRL induzida pela sucção (MURAI & BEN-JONATHAN, 1987). O TRH, a angiotensina II e a ocitocina foram considerados candidatos a fatores liberadores de PRL originados no lobo posterior da hipófise. A investigação, utilizando extratos da hipófise posterior, evidenciou que a maior atividade liberadora de PRL foi devida à ocitocina (MORI et al., 1990). Por outro lado, a utilização de antagonistas da ocitocina, do TRH e da angiotensina II não bloqueou a atividade liberadora de PRL da neuro-hipófise, sugerindo que outro fator neurohipofisário possa atuar como estimulador da secreção de PRL (HYDE & BEN-JONATHAN, 1987). É possível que um peptídeo pequeno, não identificado no momento, seja responsável pela atividade liberadora da PRL proveniente da hipófise

posterior (HYDE & BEN-JONATHAN, 1988). A serotonina pode ser um mediador importante entre o estímulo mamilar e a ativação hipotalâmica da hipófise anterior e/ou posterior. A imunização passiva contra vasopressina (AVP) atenuou a liberação de PRL induzida pela sucção. Embora os dados em relação à importância da AVP na regulação da PRL sejam confusos, parece haver uma interação importante entre a regulação da PRL e a homeostase hidroeletrólítica. Também foi identificada atividade liberadora de PRL no lobo intermediário da hipófise (LAUDON et al., 1990). O lobo intermediário consiste de terminais túbero-hipofisários dopaminérgicos e melanócitos produtores de pró-opiomelanocortina (POMC); é suprido pelos vasos porta curtos e tem uma função integrativa na regulação da secreção de PRL. Os melanotrofos podem ser inibidos pela DA liberada por esses terminais (LINDLEY et al., 1988). O hormônio estimulante dos melanócitos (α MSH) foi implicado, principalmente, na regulação da secreção de PRL basal e induzida pelo estresse, e não na induzida pela sucção (KHORRAM et al., 1984). Existem evidências de que outros sistemas, como o serotoninérgico, participam do aumento da secreção de PRL induzido pela sucção mamilar (MENA et al., 1976). A ativação de receptores GABA-B inibiu a secreção de PRL induzida por 25 minutos de sucção. A lesão cirúrgica da eminência mediana evitou esse efeito, sugerindo que a ação inibitória do GABA seja hipotalâmica (LUX et al., 1986).

1.2.1.2. REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE PRL INDUZIDA PELO ESTRESSE

Diferentes formas de estresse físico e emocional determinam aumento rápido de PRL, incluindo procedimentos cirúrgicos e anestésicos, exercício físico e

hipoglicemia. Dependendo do agente estressor estudado e das condições hormonais, ocorrem grandes variações no ritmo e na intensidade da resposta secretora e, em algumas situações, o estresse pode causar, inclusive, inibição da secreção de PRL (RIEGLE & MEITES, 1976; REIS et al., 1996; CALIGARIS & TALEISNIK, 1983; GALA, 1990). Neill (1970) demonstrou que o estresse induzido por éter, laparotomia ou hemorragia induz aumento da liberação de PRL. Os níveis de PRL obtidos em animais anestesiados com éter e decapitados foram mais altos do que os dos animais sacrificados por decapitação sem anestesia, mas foram mais baixos do que os submetidos à laparotomia com éter. Vários autores descreveram aumento dos níveis de PRL após muitos tipos de estímulo, desde manipulação do animal, transferência de um laboratório a outro, exposição isolada ou repetida ao éter, imobilização, e injeção de salina (KRULICH et al., 1974; SMITH & GALA, 1977). A liberação de PRL induzida por estresse é o resultado de interações neuroendócrinas complexas que permanecem sob investigação. Embora o aumento agudo dos níveis de PRL, provocado por vários tipos de estresse, possa resultar da diminuição da atividade dos neurônios TIDA, é provável que fatores estimuladores específicos estejam envolvidos. Shin (1980) demonstrou que o bloqueio de receptores dopaminérgicos não impede a liberação de PRL induzida pelo estresse. Lesões do núcleo paraventricular suprimem completamente a liberação de PRL induzida pelo estresse, sugerindo que os neuropeptídeos sintetizados nessa região, como VIP, peptídeo histidina-isoleucina (PHI), TRH, ocitocina, vasopressina, encefalina e angiotensina possam ser candidatos a fatores liberadores de PRL (MINAMITANI et al., 1987). Há evidências de que a serotonina esteja envolvida no aumento da PRL induzido pelo estresse (JORGENSEN et al., 1992; CHAOULOFF, 1993). O éter é um agente liberador de PRL que pode

ativar a função de neurônios secretores de serotonina, e dessa forma, estimular a liberação de um fator liberador de PRL. Algumas evidências indicam que o VIP e o PHI podem ser mediadores importantes da liberação aguda da PRL induzida pelo éter ou pela injeção de um precursor da serotonina (KAJI et al., 1985, 1985a). O aumento da secreção da PRL induzido pelo estresse pode envolver também o sistema gabaérgico. A ativação de receptores GABA-B inibe a resposta da PRL ao estresse de imobilização. Esse efeito parece não envolver o sistema dopaminérgico mas sim a modulação do efeito serotoninérgico (LUX et al., 1991). A liberação de PRL induzida pelo estresse de imobilização envolve a ativação de receptores β 2-adrenérgicos centrais (HAANWINCKEL et al., 1991) e uma das consequências da ativação adrenérgica é a liberação de histamina (SELTZER & DONOSO, 1985). A AVP pode exercer um efeito permissivo em relação à liberação de PRL induzida pelo estresse de imobilização e pela histamina (KJOER et al., 1993).

1.2.2. REGULAÇÃO PERIFÉRICA DA SECREÇÃO DE PRL

Muitos hormônios periféricos como tiroxina, testosterona e glicocorticóides podem influenciar a secreção da PRL. O estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (HARBUSZ & LIGHTMAN, 1992). Por outro lado, a adrenalectomia potencializa a liberação de PRL induzida pelo estresse e os glicocorticóides bloqueiam essa resposta (HARMS et al., 1975). Após tireoidectomia as células produtoras de PRL sofrem atrofia e hipofunção, o que é revertido com a administração de tiroxina (OSAWA & KUROSUMI, 1993). Os níveis séricos de T3 e T4 alteram a liberação de

PRL induzida pelo TRH. O T3 inibe a síntese de PRL em cultura de células hipofisárias e, essa inibição não é revertida pelo estradiol (MAURER, 1982). No entanto, os hormônios tireoidianos parecem influenciar a secreção de PRL e a resposta dos lactotrofos ao TRH, apenas em condições patológicas (SNYDER et al., 1973). A administração de testosterona induz um aumento da liberação de PRL, possivelmente devido à sua conversão central em estrogênios. O tratamento de ratos com DHT (dihidrotestosterona) e com progesterona reduziu a concentração de PRL e do mRNA da PRL em hipófises de ratos que receberam estradiol (TONG et al., 1989).

Os esteróides sexuais exercem função importante no controle “fino” da secreção de PRL, tanto em humanos como em ratos, e o estrogênio é um importante regulador fisiológico da síntese e secreção de PRL. O efeito estimulador do estradiol sobre a liberação de PRL foi descrito muitas vezes, tanto em ratos como em humanos (FERLAND et al., 1980; FRANTZ et al., 1972) e está relacionado com os aumentos fisiológicos dos níveis de PRL que ocorrem durante a gestação, a puberdade e o pico pré-ovulatório. Foram propostos três mecanismos para o aumento de PRL induzido por estradiol: a) efeito direto na adeno-hipófise; b) modulação de fatores hipotalâmicos inibidores ou liberadores; c) alterações na responsividade da adeno-hipófise aos secretagogos de PRL (LAMBERTS & MAC LEOD, 1990).

O estradiol aumenta a síntese de PRL, atuando diretamente na hipófise através do aumento da incorporação de aminoácidos precursores na molécula de PRL (MAURER & GORSKI, 1977), do mRNA da pré-PRL e da PRL (VICIAN et al., 1979; SHIMOKAWA et al., 1992; YAMAMOTO et al., 1986), e da transcrição do gene da PRL no animal intacto (MAURER, 1982a). Foram identificados receptores

estrogênicos em lactotrofos de hipófises normais e adenomatosas (STEFANEANU et al., 1994).

A identificação de estradiol triciado em neurônios hipotalâmicos que contêm tirosina hidroxilase (SAR, 1984) indica que o estradiol pode agir diretamente nos neurônios dopaminérgicos. A tirosina hidroxilase é a enzima responsável pelo passo limitante da síntese das catecolaminas. A redução da liberação de DA pelos TIDA pode refletir menor atividade ou diminuição na síntese dessa enzima. Toney et al. (1992) descreveram aumento da PRL plasmática e da concentração do metabólito da DA, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), na eminência mediana, após tratamento com 17β estradiol, o que reflete a maior atividade dos TIDA. A administração de um agonista dopaminérgico, bromocriptina (BCP), e do anticorpo contra PRL bloquearam esses aumentos, sugerindo que o efeito do estradiol na atividade dos TIDA pode ser mediado pela PRL. Além disso, a demonstração *in vivo* e *in vitro* da atividade antidopaminérgica do estradiol (FERLAND et al., 1979; CRAMER et al., 1979; RAYMOND et al., 1978) sugere que esse seja o principal mecanismo pelo qual o estradiol estimula a secreção de PRL. Muitos estímulos da secreção de PRL modificam temporariamente o tônus dopaminérgico e assim, a DA poderia agir como um regulador da intensidade de ativação dos lactotrofos pelos fatores liberadores. Além disso, a ativação de receptores D2 pode modificar a responsividade dos lactotrofos a diversos fatores moduladores, como a endotelina-1 que, nesse caso, pode ser estimuladora da secreção de PRL (KANYICKSKA et al., 1995). Por outro lado, vários estudos têm indicado outros mecanismos que podem ser importantes como mediadores da ação hiperprolactinêmica do estradiol. A liberação de PRL induzida por estradiol também está associada à liberação de TRH e 5HT (de

Greff et al., 1985). O estradiol aumenta a secreção de TRH, o número de receptores para TRH na hipófise e a resposta da PRL ao TRH (CANNON et al., 1991; de LÉAN et al., 1977; WILLOUGHBY et al., 1985). O estradiol pode reduzir o *turnover* de 5HT no núcleo accumbens, da mesma forma que ocorre no proestro (SHIMIZU & BRAY, 1993). Johnson e Crowley (1983) demonstraram que o estradiol pode estimular a secreção de PRL ativando neurônios serotoninérgicos localizados na área pré-óptica e no núcleo amigdalóide cortical. Em outro estudo, o mecanismo estimulador da 5HT foi bloqueado pelo estradiol, sugerindo que este hormônio pode inibir e não facilitar a atividade serotoninérgica central (WILLOUGHBY et al., 1985). Crowley (1982) demonstrou que o estradiol promoveu aumento da PRL sérica acompanhado de aumento do *turnover* de norepinefrina na eminência mediana e no núcleo arqueado. A ocitocina pode ter uma função importante no pico de liberação da PRL que ocorre na tarde do proestro (JOHNSTON & NEGRO-VILAR, 1988). O bloqueio da ocitocina reduz a liberação de PRL induzida por estradiol (SAMSON et al., 1986). O estrogênio regula a síntese e liberação de neurotensina no hipotálamo (ALEXANDER, 1993; WATANOBE & TAKEBE, 1993), modula receptores da angiotensina II (AT1) no núcleo arqueado (SELTZER et al., 1993), altera o número e distribuição de células imunorreativas à galanina no hipotálamo (BLOCH et al., 1993) e reduz a expressão do mRNA do neuropeptídeo Y (BASKIN et al., 1995). Também existem evidências da ação moduladora do estradiol sobre o efeito inibidor da secreção de PRL induzida pelos opióides (DESJARDINS et al., 1993; SINGH et al., 1992; WEILAND & WISE, 1990). O estrogênio pode induzir a secreção de um fator liberador, do lobo hipofisário neurointermediário, responsável pelo aumento tanto da atividade secretora como do número de células produtoras de PRL (ELLERKMANN

et al., 1991). Esses dados permitem afirmar que o controle do estradiol sobre a liberação de PRL envolve mais de um sistema neurotransmissor e que, provavelmente, promove uma interação entre esses sistemas (de GREEF et al., 1985).

A administração crônica de estrogênio é um método bem estabelecido para indução de hiperplasia dos lactotrofos e adenomas em ratas de cepas suscetíveis. Um aumento da síntese de DNA e aumento do peso da hipófise foi encontrado após 24 horas de tratamento estrogênico (TSUKAHARA et al., 1994). A formação de adenoma é dependente da dose e duração do tratamento. A administração de 17β estradiol, em ratas Wistar, mostrou que após 8 semanas houve aumento máximo da liberação da PRL e peso hipofisário acompanhados de assimetria característica de crescimento adenomatoso. Com 16 semanas de tratamento estrogênico o peso das hipófises diminuiu e estas apresentaram hemorragias e necrose, como no processo degenerativo tumoral (TATÁR et al., 1991). El-Azouzi et al. (1990) mostraram aumento progressivo do peso da hipófise e dos níveis de PRL sérica, além de hiperplasia dos lactotrofos aos 30 dias de tratamento com dietilestilbestrol (DES), em ratas Fischer 344 (F344). Após 60 dias houve alterações irreversíveis e formação de tumor hemorrágico. Esta cepa é hipersensível ao estímulo estrogênico e apresenta grande suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral induzido pelo estradiol (WIKLUND et al., 1981).

Os efeitos da administração crônica de estrogênios no controle hipotalâmico dopaminérgico não estão completamente esclarecidos. Vários estudos indicam que o estradiol pode induzir hiperplasia dos lactotrofos inibindo a liberação de DA na eminência mediana (EL-AZOUZI et al., 1990; MORGAN et al., 1985). Arbogast e Voogt (1993) demonstraram que o tratamento com estradiol durante 7 dias diminui o

mRNA e a atividade da tirosina hidroxilase no núcleo arqueado. A administração de estradiol aumenta consideravelmente o peso da hipófise em ratas intactas e este efeito é potencializado por neurolépticos, antagonistas da DA, e inibido por agonistas dopaminérgicos (SCHREIBER et al., 1984, 1987). A administração prolongada de estradiol pode provocar alterações citopatológicas nos neurônios dopaminérgicos e redução progressiva de DA no núcleo arqueado (SARKAR et al., 1982; CASANUEVA et al., 1982) e esse poderia ser o estágio inicial da ação proliferativa do estradiol sobre os lactotrofos. A redução da atividade dopaminérgica não parece ser a única explicação, já que o estradiol estimulou menos o crescimento de hipófises implantadas na cápsula renal do que as hipófises *in situ*. Além disso, 41 % das hipófises *in situ* desenvolveram tumor, enquanto apenas 18% das implantadas desenvolveram tumor. Os autores sugerem que haveria um fator hipotalâmico responsável pela tumorigênese e que este poderia ser estimulado pelo estradiol (WELSCH et al., 1971). O mecanismo da tumorigênese induzida pelo estradiol é desconhecido, mas foi sugerido que fatores hipofisários dependentes do estradiol também poderiam promover o crescimento celular. O tratamento prolongado com estradiol aumentou a concentração do VIP na hipófise, e esse aumento foi cinco vezes maior nas ratas Fischer 344 (PRYSOR-JONES et al., 1988). A imunorreatividade de substância semelhante à galanina aumenta em lactotrofos com hiperplasia induzida por estradiol (HSU et al., 1990). Vários fatores de crescimento, como $TGF\beta_1$, $TGF\alpha$, NGF, FGF, EGF e IGF-I podem estar envolvidos na mediação da tumorigênese induzida pelo estradiol (BURNS & SARKAR, 1993; BORGUNDAAG et al., 1992; MISSALE et al., 1993; SCHECHTER et al., 1993; CHAIDURUN et al., 1994; MOUIHATE & LESTAGE, 1995; MICHELS et al., 1993). Ainda, foi sugerido que

os ratos suscetíveis, como os F344, apresentariam uma deficiência genética que levaria à perda de um mecanismo de controle da proliferação (WIKLUND & GORSKI, 1982). Elias e Weiner (1984) mostraram que a suscetibilidade à ação tumorigênica do estradiol é correlacionada com a habilidade de induzir um fluxo arterial direto para a adeno-hipófise, diluindo a DA. Van Nesselrooij et al. (1991), usando ressonância magnética, não encontraram alterações na vascularização hipofisária induzida pelo tratamento prolongado com estradiol. Finalmente, a hiperprolactinemia, a hiperplasia lactotrófica e o processo de formação de adenoma, induzidos pelo estradiol, poderiam iniciar diretamente nos lactotrofos. O aumento dos níveis de PRL sérica estimularia a atividade dopaminérgica e os fatores liberadores de PRL seriam suprimidos. A hiperatividade dos TIDA, e o próprio estradiol, provocariam a deterioração desses mesmos neurônios. A redução da inibição dopaminérgica, também promovida por aumento da hipófise ou pela alteração no fluxo sanguíneo, levaria à hiperplasia irreversível.

1.3 HIPERPROLACTINEMIA

A hiperprolactinemia é uma causa freqüente de alterações do ciclo menstrual, galactorréia e infertilidade. Altas concentrações de PRL exercem efeito inibitório sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovário porém, o sítio primário de inibição parece ser hipotalâmico. Várias evidências sugerem que a hiperprolactinemia reduz a atividade do GnRH através dos sistemas dopaminérgico e opióide, moduladores da secreção pulsátil desse hormônio. Além disso, a hiperprolactinemia, induzida

experimentalmente em ratos, reduz receptores para GnRH na hipófise. A conseqüente diminuição da secreção de gonadotrofinas é acompanhada de inibição da resposta dos gonadotrofos à retroalimentação positiva exercida normalmente pelo estrogênio.

A hiperprolactinemia pode ser devida a muitas causas, primárias ou secundárias. As secundárias incluem hipotireoidismo, cirrose hepática, insuficiência renal ou distúrbios hipotalâmicos. Outra situação freqüente é a hiperprolactinemia de causa farmacológica. Existe um grande número de medicamentos que interferem com os neurotransmissores envolvidos na regulação da secreção de PRL, principalmente a DA, e são responsáveis pela causa mais freqüente de hiperprolactinemia na prática clínica. Excluídas as causas secundárias, os adenomas hipofisários secretores de PRL, prolactinomas, são a segunda causa mais comum de hiperprolactinemia. Os prolactinomas são classificados em micro e macroadenomas, de acordo com o volume menor ou maior do que 10 mm, respectivamente. O diagnóstico preciso só poderia ser realizado pela identificação de células imunorreativas à PRL por imunohistoquímica. No entanto, como a retirada cirúrgica dos tumores não é realizada freqüentemente, o diagnóstico é realizado por sinais radiológicos, associados à hiperprolactinemia, sintomas e evolução clínica. O tratamento de escolha é a BCP, agonista dopaminérgico capaz de reduzir os níveis prolactinêmicos e restaurar os ciclos ovulatórios em 80-90% dos casos, além de diminuir o tamanho dos tumores em 60 % dos casos (CHIODINI et al., 1981; CUNNAH & BESSER, 1991). Mulheres que apresentam hiperprolactinemia sintomática, persistente, com tomografia computadorizada da sela túrcica ou ressonância magnética normais, e sem qualquer causa conhecida de hiperprolactinemia são consideradas, por exclusão, como portadoras de hiperprolactinemia idiopática (CORENBLUM & TAYLOR, 1988).

A administração de BCP em animais de experimentação reduz a atividade mitótica, o peso da hipófise e o tamanho de tumores hipofisários (LLOYD et al., 1975; DAVIES et al., 1974; PAWLIKOWSKI et al., 1978; KALBERMAN et al., 1980). A BCP também diminui a síntese de DNA e as concentrações de PRL sérica e hipofisária, em ratas (JACOBI & LLOYD, 1981). A BCP liga-se a receptores D2 na membrana dos lactotrofos e inibe a exocitose da PRL via redução dos níveis de AMPc, o que leva ao acúmulo intracelular de PRL. Com isso, há uma diminuição da síntese de PRL e da atividade mitótica, além da possível degradação da PRL intracelular acumulada (DANNIES & RUDNICK, 1980). A BCP diminui os níveis de PRL plasmática em ratos tratados com DES, variando de acordo com a cepa e a dose de tratamento estrogênico (JACKSON et al., 1993). O tratamento com BCP também reduz a síntese de DNA e a secreção de PRL em tumores desenvolvidos espontaneamente em ratos, e pode diminuir os receptores estrogênicos em adenomas hipofisários humanos (PRYSOR-JONES & JENKINS, 1981; STEFANEANU et al., 1994). Os prolactinomas apresentam receptores dopaminérgicos D2 com constante de dissociação e número de sítios de ligação semelhantes aos do tecido hipofisário normal (CRONIN et al., 1980) e a densidade desses receptores pode ser 50% menor em prolactinomas resistentes à BCP (PELLEGRINI et al., 1989).

1.4. FÁRMACOS COM AÇÃO ANTIESTROGÊNICA

O tamoxifeno (TAM) é um antiestrogênio não esteróide, que se liga a receptores estrogênicos e apresenta propriedades farmacológicas complexas já que

pode exercer efeitos opostos em diferentes espécies. Além disso, existem também sítios de ligação antiestrogênicos específicos em órgãos alvo do estrogênio, como o útero (GULINO & PASQUALINI, 1983). As respostas ao tamoxifeno são dependentes do tecido examinado, da dose utilizada e do grau de impregnação estrogênica, podendo ter efeito aditivo ou antagonico ao estradiol. A ligação aos seus próprios receptores poderia ser responsável pela ação antagonica do TAM, em relação aos efeitos do estradiol. No rato, tem efeito agonista parcial no útero, antagonista na glândula mamária e, em relação à hipófise os dados são contraditórios (LIN & BUTTLE, 1991; NAGY et al., 1980; PRYSOR-JONES et al., 1983). A administração de uma dose de TAM potencializou o efeito do estradiol sobre a secreção de PRL, em ratas. Quando o tratamento com TAM foi repetido, 48 e 24 horas antes e simultaneamente com o estradiol, essa potencialização foi revertida (GILNA & MARTIN, 1986). O tamoxifeno, administrado em ratas ovariectomizadas, reduziu os níveis de PRL sérica e o peso hipofisário induzidos por estímulo estrogênico (JORDAN & KOERNER, 1976; LYLE et al., 1984). Lieberman et al. (1983) demonstraram *in vitro* a inibição direta e reversível do tamoxifeno sobre a síntese de PRL induzida por estradiol. Os efeitos agonistas ou antagonistas dependem da presença ou ausência de estradiol no meio de cultura. Martinez-Câmpos et al. (1986) mostraram, em cultura de células hipofisárias normais, que a relação dose resposta do tamoxifeno é bifásica, causando estimulação com as doses mais baixas e antagonizando os efeitos estimulatórios do estradiol nas doses mais altas. O efeito antiproliferativo do TAM sobre o crescimento uterino, demonstrado com a administração de TAM nos últimos 5 dias de tratamento curto com estradiol (50 µg/2 semanas), mostrou a ação antiestrogênica deste fármaco, sugerindo que essa ação seja

mediada por uma inibição competitiva pela ligação ao receptor estrogênico (SPRITZER et al., 1995). Nesse esquema de tratamento o TAM reduziu a concentração de PRL sérica, mostrando sua ação antiestrogênica também na hipófise. Spritzer et al. (1996), associando TAM (60 e 120) a 300µg de estradiol, também por 2 semanas, verificaram redução dos níveis de PRL sérica e do peso hipofisário. Por outro lado, quando o TAM foi associado ao tratamento prolongado (10 semanas) com 300µg de estradiol, também foi demonstrada a ação antiestrogênica do TAM no útero, enquanto na hipófise não houve efeito no percentual de lactotrofos nem nos níveis de PRL sérica. Esse conjunto de dados confirmam a complexidade da ação do TAM na hipófise e a importância da duração do tratamento, das doses empregadas, e principalmente, do grau de impregnação estrogênica. Como o TAM se liga ao receptor estrogênico com menor afinidade do que o próprio estradiol, nos desenhos experimentais onde as concentrações de estradiol sejam mais altas, é possível que haja predomínio da ação estrogênica do estradiol sobre a antiestrogênica do TAM.

A Progesterona (P) é considerada um fármaco com ação antiestrogênica bem estabelecida. Estradiol e progesterona têm efeitos antagonistas ou sinérgicos nos tecidos alvo, como endométrio e mama: estradiol estimula o crescimento celular e a P tende a inibir os efeitos estrogênicos, induzindo diferenciação celular em células sensibilizadas com estradiol (CLARKE & SUTHERLAND, 1990; KUTTENN et al., 1986). A progesterona modula os efeitos estrogênicos diminuindo os receptores de estradiol e estimulando a 17βhidroxiesteróide desidrogenase, que converte estradiol em estrona (GOMPEL et al., 1986), enquanto os receptores de P são aumentados por estradiol (OHTA et al., 1993). Esses efeitos foram demonstrados tanto nos órgãos

alvo clássicos, glândula mamária e útero, como na hipófise (El AYAT & MAHESH, 1984; SMANIK et al., 1983; BLAUSTEIN & BROWN, 1984; HAUG, 1979).

A progesterona é capaz de exercer uma série de efeitos sobre o sistema nervoso central. Existem grandes concentrações de receptores para progesterona no hipotálamo (MacLUSKY & McEWEN, 1980) e, foram descritos efeitos da progesterona sobre neurotransmissores centrais como DA, serotonina, noradrenalina, opióides e GABA (MERCHANTHALER et al., 1995; SHIMIZU & BRAY, 1993; BRESSION et al., 1985; CANONACO et al., 1993; SHOUBE et al., 1985). Arbogast e Voogt (1993) descreveram que a administração apenas de P não mostrou efeito, mas quando co-administrada com estradiol reverteu o efeito estrogênico nos níveis de PRL sérica, mRNA e atividade da tirosina hidroxilase no núcleo arqueado de ratos. A administração concomitante de P e estradiol pode potencializar o efeito estimulatório sobre a PRL plasmática, provavelmente por um mecanismo envolvendo aumento do TRH nos vasos porta. Por outro lado, a injeção apenas de P não altera a concentração de TRH mas aumenta os níveis de DA no sistema porta (HUANG et al., 1995). A P pode atuar diretamente em neurônios dopaminérgicos do núcleo arqueado que contêm receptores de P (FOX et al., 1990). A administração de P atenua a atividade dopaminérgica na eminência mediana durante a fase de plateau do pico pré-ovulatório de PRL (ARBOGAST & BEN-JONATHAN, 1990). A P parece também estar envolvida com a regulação da PRL durante o estresse. O tratamento de ratas ovariectomizadas com P bloqueou a resposta da PRL ao estresse (MILENKOVIC et al., 1986; JAHN & DEIS, 1986; CALIGARIS & TALEISNIK, 1983). Além disso, os níveis séricos de P aumentam pela exposição ao éter, indicando um possível

mecanismo de retroalimentação da P sobre a PRL, em resposta ao estresse (DEIS et al., 1989).

As interações estradiol-progesterona na hipófise estão menos esclarecidas (FINK, 1988; ATTIA, 1980). A P pode reverter o efeito do estradiol sobre a liberação de PRL, *in vitro*, enquanto a incubação apenas com P não produz alterações na liberação de PRL (FERLAND et al., 1980; VICIAN et al., 1979; LAMBERTS et al., 1987; SHIMOKAWA et al., 1992). Por outro lado, foi demonstrada uma redução de 30-50% na liberação espontânea da PRL, em cultura primária de células hipofisárias, com a adição de um progestogênio (GIGUÈRE et al., 1982). Estudos realizados *in vivo*, em ratas e em mulheres, mostraram que a administração de P promove tanto aumento (CALIGARIS et al., 1974; HUANG et al., 1995; RAKOFF & YEN, 1978) como redução da secreção de PRL (REIER et al., 1974; OLIVEIRA et al., 1993; BRANN et al., 1988). O efeito facilitatório ou inibitório parece depender do tempo de administração e da dose de progesterona usada. A injeção isolada de 4 mg de progesterona não alterou os níveis de PRL sérica, mas reverteu o aumento induzido pelo estradiol. Por outro lado, a administração de 10 mg de P aumentou a secreção de PRL sérica (CHEN & MEITES, 1970). Deve ser considerado o tipo de progestogênio utilizado, já que alguns podem ter estrutura química que lhes confirmam propriedades estrogênicas intrínsecas o que pode gerar confusão na interpretação dos dados (BAKER et al., 1973). Sitruk-Ware et al. (1985) mostraram redução da PRL sérica em pacientes normoestrogênicas, com hiperprolactinemia e tratadas com linestrenol. A administração de acetato de noretisterona (NA) diminuiu os níveis de PRL sérica em 6 de 10 pacientes hiperprolactinêmicas (MALLMANN & SPRITZER, 1996). Oliveira et al. (1993) demonstraram que o NA reduz a concentração de PRL

sérica, o peso da hipófise e o número de lactotrofos em ratas com hiperprolactinemia induzida pela administração prolongada de estradiol.

1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERPROLACTINEMIA

Existem vários modelos experimentais que têm sido utilizados para a identificação dos mecanismos intracelulares que regulam a síntese e a secreção de PRL. Considerando a complexidade da regulação da secreção da PRL, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos procurando investigar cada mecanismo regulatório em particular.

A investigação realizada *in vitro* envolve cultura de células tumorais (GH3, MtTW15, 7315a, MMQ) ou culturas primárias de lactotrofos. Além disso, a combinação de várias técnicas é mais um recurso que tem contribuído para o esclarecimento da regulação da secreção de PRL. A correlação de resultados obtidos por métodos bioquímicos ou hibridização *in situ* e imunocitoquímica, por exemplo, acrescentou dados importantes nessas investigações. A linhagem de células GH3, derivada de adenomas hipofisários induzidos por estrogênio, tem sido usada como modelo para investigar a síntese e a liberação do hormônio do crescimento (GH) e da PRL. Várias características importantes dos lactotrofos foram demonstradas originalmente nessas células. Estas oferecem a vantagem de permitir o trabalho com células puras, não misturadas com outras células hipofisárias, sempre presentes na cultura de lactotrofos. No entanto, apresentam algumas desvantagens como: não respondem à DA, podem não ser funcionalmente homogêneas, armazenam pequenas

quantidades hormonais e, além da PRL, secretam GH. Além disso, as células tumorais podem ter características funcionais diferentes das células hipofisárias normais e podem mudar essas características com o tempo. As linhagens GH3 não respondem à DA devido à ausência de receptores dopaminérgicos D2, enquanto as 7315a e MtTW15 apresentam defeitos na subunidade α da proteína G. A linhagem MMQ foi derivada da 7315a e secreta apenas PRL, embora apresente várias anormalidades nas subunidades da proteína G (FORGET et al., 1993).

Os modelos utilizados para o estudo *in vivo* da regulação da secreção de PRL incluem medidas da secreção basal da PRL, sob manipulação farmacológica, ou em estados hiperprolactinêmicos. Os estímulos mais importantes para a secreção de PRL são a sucção, o estresse e os esteróides sexuais, principalmente o estrogênio. Embora muitos elementos da via final comum desses estímulos sejam similares, há várias diferenças entre a magnitude, o curso temporal e os efeitos sobre a homeostase que são acionados por cada um. Assim, a indução de hiperprolactinemia pode ser produzida por estresse, sucção mamilar, administração de estrogênios ou implante de uma hipófise, central ou periféricamente.

Os modelos experimentais utilizados para reproduzir situações de estresse, e seus efeitos, são semelhantes mas não idênticos. Além disso, os mecanismos envolvidos em cada uma das adaptações fisiológicas também podem diferir conforme o estímulo estressor. Os agentes mais utilizados para promover estresse são a exposição ao éter e a imobilização. O aumento dos níveis de PRL induzido pelo estresse é um fenômeno de curta duração mesmo quando o estresse é aplicado por um período prolongado. Desta forma, esse modelo tem sido amplamente aceito para o

estudo da regulação a curto prazo da secreção da PRL e sua correlação com diversas condições hormonais.

O implante de uma hipófise adicional na cápsula renal produz aumento da secreção de PRL devido à perda da inibição dopaminérgica hipotalâmica sobre essa hipófise. Por outro lado, a hiperprolactinemia promovida pela secreção da hipófise ectópica pode exercer retroalimentação negativa sobre a atividade secretória da hipófise que permanece na sela túrcica (ADLER, 1986). Dessa maneira, este modelo não parece adequado para o estudo da regulação da secreção de PRL já que não são preservados os mecanismos regulatórios fisiológicos. Este modelo poderia ser adequado para estudar os efeitos da PRL, a hiperprolactinemia crônica ou o mecanismo da autoregulação. O implante hipofisário no hipotálamo determina aumento dos níveis de PRL no líquido e tem sido usado para avaliar as ações centrais da PRL, inclusive a autoregulação. Em ratos submetidos a implante hipotalâmico de hipófise, Grattan e Averill (1991) observaram um bloqueio expressivo da secreção de PRL induzida pelo éter.

Alguns modelos utilizam a administração de fármacos que possam interferir nos sistemas de neurotransmissores envolvidos nessa regulação. Entre eles, a administração de estrogênios tem sido utilizada para induzir hiperprolactinemia e para estudo das interações centrais e periféricas de diversos hormônios, neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos na regulação da secreção de PRL.

A indução de hiperprolactinemia pela administração de estrogênios tem sido realizada de acordo com desenhos experimentais diversos. A administração de estradiol varia tanto em relação à dose, duração e via de administração, como em relação aos fármacos utilizados e à cepa, mais ou menos sensível à ação do estradiol.

Ratos da cepa Fischer 344 apresentam uma hipersensibilidade ao estímulo estrogênico, com grande suscetibilidade à formação de tumor hipofisário induzido pelo estradiol (WIKLUND et al., 1981). As diferentes cepas de ratos utilizadas também podem mostrar diferenças quanto à magnitude e dinâmica temporal da depleção hipofisária de PRL, e de sua liberação, além da responsividade aos efeitos inibitórios da dopamina (PHELPS et al., 1991; MOY & LAWSON, 1992; LAWSON & PARKER, 1992; ARITA et al., 1990). Os protocolos experimentais diferem também em relação ao tempo de observação do efeito do estradiol, além da grande variação no número e frequência de injeções. Alguns autores relatam esquemas de tratamento em que são avaliados efeitos rápidos dos esteróides sexuais, onde o pico de liberação de PRL é determinado em horas (HORN & FINK, 1985), enquanto outros observam alterações produzidas pelo tratamento crônico.

Considerando que não há uma padronização de protocolos, torna-se importante o desenvolvimento de um modelo experimental de hiperprolactinemia, dependente da administração de estrogênio, e o estabelecimento de alguns parâmetros fundamentais para a análise dos efeitos do tratamento estrogênico.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo experimental de hiperprolactinemia dependente de estrogênio e avaliar os efeitos de um progestogênio, de um antiestrogênio e de um agonista da dopamina sobre a proliferação e a função lactotrófica.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar valores de referência para as variáveis estudadas, PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos, em ratas castradas e intactas usadas como controle;
- Avaliar se as variações de PRL sérica durante o ciclo estral das ratas podem interferir na comparação dos resultados entre ratas intactas e os grupos experimentais;
- Verificar o efeito do benzoato de estradiol administrado em duas doses (50 e 300 µg/semana), por diferentes tempos de tratamento, sobre os níveis de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos;
- Validar o modelo experimental através da determinação dos efeitos da administração de um agonista dopaminérgico (bromocriptina) associado ao tratamento estrogênico sobre os parâmetros descritos acima;

- Estabelecido o modelo experimental, avaliar os efeitos de um progestogênio, o acetato de noretisterona, associado ao estrogênio sobre os níveis de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos.
- Investigar o efeito da associação de um antiestrogênio, tamoxifen, a BCP ou a NA sobre os níveis de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos em ratas submetidas a tratamento prolongado com benzoato de estradiol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar, pesando entre 150 e 250 g, com 80 a 120 dias de idade no início dos experimentos, provenientes do biotério do Instituto de Biociências, UFRGS. Os animais foram alimentados com ração e água à vontade. A manipulação das ratas seguiu a rotina do biotério e foram mantidas em ciclo claro/escuro de 12 horas com temperatura de $22 \pm 4^\circ \text{C}$.

Foram colocadas no máximo 6 ratas em cada caixa desde o início dos tratamentos. Os animais permaneceram no biotério onde receberam as injeções de acordo com os protocolos experimentais. Algumas horas antes da decapitação as ratas eram levadas para o laboratório e deixadas em suas caixas para adaptação ao ambiente, com o máximo de silêncio possível. As ratas eram sacrificadas na sala ao lado onde se encontravam as caixas e a retirada dos animais das caixas foi feita em menos de 15 segundos, evitando o contato dos mesmos com cheiro de sangue, ruído ou qualquer estresse previsível no momento da decapitação. Todas as decapitações foram realizadas entre 9:30 e 13:30 horas, exceto nas ratas do proestro da tarde que foram sacrificadas às 17:30 horas.

2.2 FÁRMACOS

Os fármacos utilizados foram hexahidrobenzoato de estradiol (Benzoginoestril[®], SARSA), acetato de noretisterona (Primolut-nor[®], SCHERING), bromocriptina (Parlodel[®], SANDOZ ou Bagren[®], SERONO) e tamoxifeno (Nolvadex[®], ICI/WELLCOME). O estradiol era diluído em óleo de arroz (0,25 ml/dose). A bromocriptina era diluída em NaCl 0,9% de forma a obter a dose desejada em 0,2 ml, o tamoxifeno em etanol/ NaCl 0,9% (1:10) com volume de 0,2 ml/dose e o acetato de noretisterona em etanol (40 mg/ml), fazendo uma solução mãe à qual era adicionado NaCl 0,9% (1:20) sendo administrado em volume de 0,25 ml por dose. O grupo controle recebeu 0,25 ml do mesmo óleo onde era diluído o estradiol (veículo oleoso) e/ou 0,2 ml de veículo aquoso, uma solução de etanol/NaCl 0,9 % (1:10).

2.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Com exceção dos grupos de ratas intactas e dos utilizados para o estudo do ciclo estral, todos os outros grupos foram submetidos à ovariectomia bilateral (OVX), sob anestesia com éter, 48 horas antes do início dos tratamentos. As injeções foram realizadas por via subcutânea, sendo semanais para o estradiol (2, 4 ou 10 semanas) e diárias para bromocriptina, noretisterona e tamoxifeno (nos últimos 5 ou 12 dias). Quando essas drogas eram associadas, as injeções eram realizadas consecutivamente. As ratas foram sacrificadas em guilhotina, 12 a 24 horas após a última injeção. Imediatamente após a decapitação era coletado sangue troncular e retirada a hipófise.

O sangue foi centrifugado (1000 x g, por 10 minutos) e o soro armazenado a - 20° C para dosagem de prolactina por radiomunoensaio. Após a retirada da hipófise posterior, as hipófises anteriores foram pesadas em balança eletrônica e colocadas em formalina a 10 % para fixação e posterior coloração pela técnica de imunohistoquímica, para contagem do percentual de lactotrofos.

2.3.1. Grupos Controle

Para estabelecer valores basais das variáveis examinadas, 3 grupos controle foram constituídos:

2.3.1.1. *Intactas*: As ratas que compunham este grupo eram submetidas à falsa cirurgia de castração e recebiam injeções de veículo oleoso.

2.3.1.2. *Ovariectomizadas*: As ratas eram ovariectomizadas bilateralmente e recebiam injeções de veículo oleoso.

2.3.1.3. *Ciclo Estral*: Um grupo de ratas intactas foi classificado de acordo com as características celulares do esfregaço vaginal e sacrificado em cada fase do ciclo estral: PM (proestro sacrificado pela manhã), PT (proestro sacrificado à tarde), E (estro), DI (diestro I), DII (diestro II).

2.3.2. Grupos Experimentais

2.3.2.1. Grupos tratados com Benzoato de Estradiol (BE)

Com o objetivo de induzir hiperprolactinemia e testar eventuais efeitos hipofisários, foram utilizados diferentes esquemas de administração de BE, classificados em curto (2 semanas), intermediário (4 semanas) e prolongado (10 semanas). Em cada grupo, as ratas recebiam injeções semanais de BE, 50 ou 300 µg/dose/rata (E50 e E300, respectivamente). A figura 1A esquematiza os protocolos de tratamento. Estes grupos, tratados com BE em diferentes doses e tempos, foram também utilizados para comparação com os grupos tratados com outros fármacos associados ao BE. Nestes casos, as ratas recebiam veículo aquoso nos últimos 5 ou 12 dias de tratamento.

2.3.2.2. Grupos tratados com outros fármacos associados ao BE

As figuras 1B e 1C ilustram os esquemas de tratamento associados ao BE.

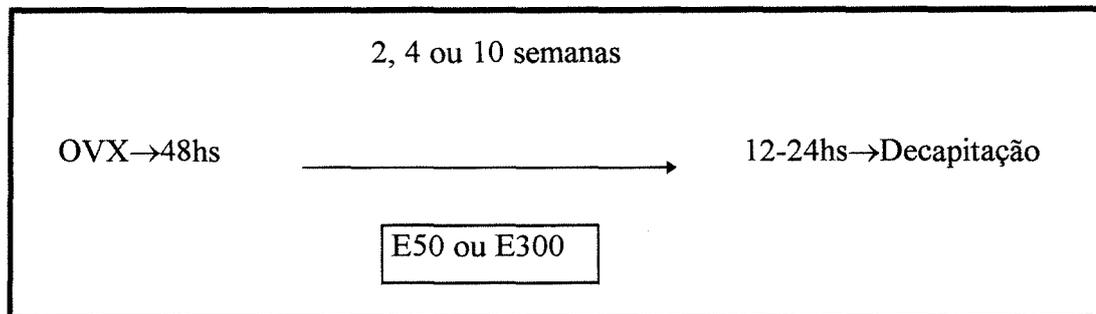
2.3.2.2.1. Bromocriptina (BCP)

Associado ao tratamento semanal de BE estes grupos receberam, nos últimos 5 ou 12 dias, bromocriptina nas doses de 0,05 ou 0,6 mg/dose/dia.

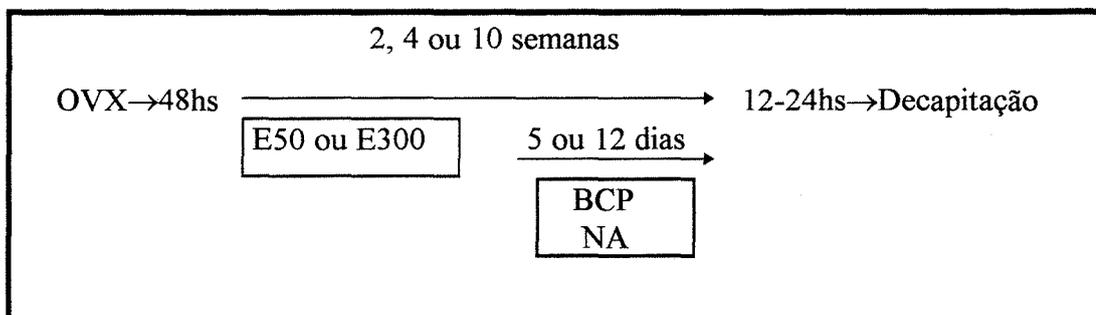
2.3.2.2.2. Acetato de Noretisterona (NA)

As ratas destes grupos receberam 0,5 mg ou 0,1 mg de acetato de noretisterona, diariamente, nos últimos 5 ou 12 dias de tratamento com BE.

A



B



C

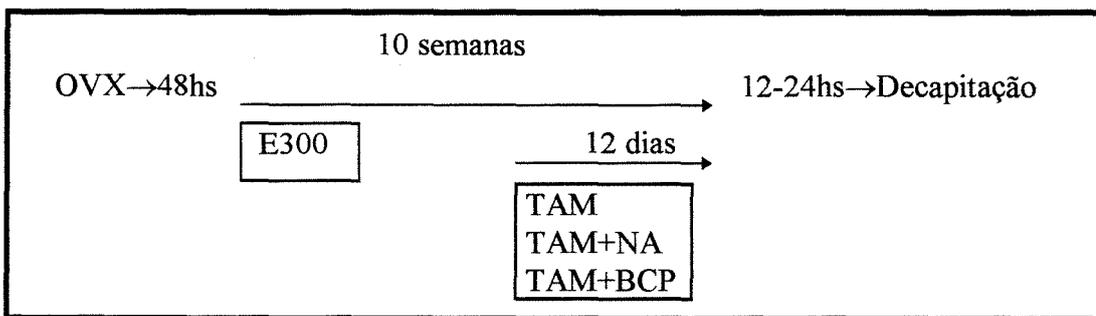


Figura 1. Protocolo experimental. A: Esquemas de tratamento com benzoato de estradiol em doses semanais de 50 (E50) ou 300 $\mu\text{g}/\text{rata}$ (E300) realizados durante 2 (curto), 4 (intermediário) ou 10 semanas (prolongado). B: Esquemas de tratamento associado ao BE nos últimos 5 ou 12 dias. BCP: Bromocriptina; NA: Acetato de noretisterona. C: Tamoxifeno (TAM) isolado ou associado a bromocriptina (BCP) ou acetato de noretisterona (NA) nos últimos 12 dias de tratamento prolongado (10 semanas) com E300.

2.3.2.2.3. *Tamoxifeno associado à BCP ou ao NA*

Associado ao tratamento prolongado com benzoato de estradiol (300 µg/rata/semana), as ratas destes grupos receberam tamoxifeno (TAM) nas doses de 20 ou 60 µg/rata/dia, durante os últimos 12 dias. Outros grupos foram injetados com TAM + BCP na dose de 0,05 mg, ou com TAM + NA na dose de 0,1 mg, nos últimos 12 dias de tratamento prolongado com BE. As combinações incluíram as doses de 20 e 60 µg de TAM.

2.4. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

2.4.1. Níveis séricos de PRL, peso da hipófise e percentual de lactotrofos nos grupos controle

Experimentos 1A-1C.

Foram realizados três experimentos utilizando 19, 11 e 20 ratas, respectivamente, nas seguintes condições experimentais: em cada experimento a metade das ratas foi submetida à ovariectomia bilateral (OVX) e a outra metade sofreu falsa cirurgia, isto é, estresse cirúrgico da laparotomia sem retirada das gônadas (ratas intactas). As ratas dos grupos controle receberam injeções subcutâneas de veículo oleoso semanalmente.

Experimento 2.

O ciclo estral de 17 ratas intactas foi acompanhado através do esfregaço vaginal, coletado sempre entre 8-9 horas da manhã e examinado ao microscópio óptico para definição da fase do ciclo em que se encontravam. Foram utilizadas 4-5 ratas em cada fase (PM, PT, E, DI, DII) e a decapitação foi realizada às 17:30 hs num grupo de ratas em proestro (PT) enquanto as demais foram sacrificadas entre 11:30 e 13:30 horas do mesmo dia em que foi definida a fase do ciclo.

2.4.2. Efeitos do benzoato de estradiol (BE) sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos

Experimentos 3A-3F.

Cinquenta ratas foram ovariectomizadas e divididas em 6 grupos, com 6-10 ratas cada um. Dois dias após, as ratas dos experimentos 3A-3C receberam injeções semanais de BE (50 µg/rata) e foram decapitadas após 2, 4 ou 10 semanas, respectivamente. Nos outros 3 experimentos (3D-3F) as ratas foram tratadas com 300 µg/semana de BE durante os mesmos períodos. As 10 ratas do grupo controle foram submetidas à falsa cirurgia, injetadas com veículo oleoso (0,25 ml/semana) e sacrificadas após 10 semanas.

2.4.3. Efeitos da Bromocriptina associada ao BE sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos

Experimento 4.

Vinte e sete ratas receberam injeções semanais de E50 e foram divididas em grupos de acordo com os seguintes esquemas de tratamento:

- *Curto*: E50 foi administrado durante 2 semanas a 16 ratas. Um grupo de 8 ratas recebeu injeções diárias de bromocriptina (BCP) na dose de 0,6 mg, durante os últimos 5 dias, enquanto a outras oito ratas foi administrado veículo aquoso.
- *Intermediário*: Onze ratas receberam E50 durante 4 semanas e foram divididas em 2 grupos. A um grupo de 6 ratas foi administrado diariamente veículo aquoso e a outro, de 5 ratas, BCP (0,6 mg) durante os últimos 12 dias.

Experimento 5.

Outras 55 ratas foram injetadas, semanalmente, com E300 e tratadas como segue:

- *Curto*: Em 16 ratas o tratamento com E300 durou 2 semanas, e nos últimos 12 dias elas foram divididas em 2 grupos de 8 ratas. Um grupo recebeu injeções diárias de veículo aquoso e o outro BCP na dose de 0,6 mg/dose/dia.
- *Intermediário*: Um grupo de 16 ratas recebeu E300 por 4 semanas, sendo que 8 delas foram injetadas com BCP (0,6 mg) e 8 com veículo aquoso diariamente nos 12 dias finais.
- *Prolongado*: Vinte e três ratas foram tratadas com E300 por 10 semanas e, nos últimos 12 dias, 8 ratas receberam injeções diárias de veículo aquoso, a 5 ratas foi

administrado 0,05 mg/dose/dia de BCP e outras 10 ratas foram tratadas com 0,6 mg/dose/dia de BCP.

2.4.4. Efeitos do NA associado ao BE sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos

Experimento 6.

Trinta e uma ratas receberam injeções semanais de E50 e foram divididas em grupos da seguinte maneira:

- *Curto*: 17 ratas foram ovariectomizadas e após 48 horas receberam injeções semanais de E50, durante 2 semanas. Durante a segunda semana, 9 animais foram também injetados com NA por 5 dias e outras 8 ratas com veículo aquoso;
- *Intermediário*: 14 ratas foram tratadas com injeções semanais de E50, durante 4 semanas. A metade foi tratada com injeções diárias de NA (0,5 mg) e a outra metade recebeu veículo aquoso nos 12 dias finais do tratamento com E50.

Experimento 7.

Após a castração, 50 ratas foram injetadas semanalmente com E300 e divididas em grupos de acordo com os seguintes esquemas de tratamento:

- *Curto*: 16 ratas foram tratadas com injeções semanais de E300, durante 2 semanas. Estas ratas foram subdivididas em 2 grupos que receberam, respectivamente, veículo aquoso e NA nos últimos 12 dias de tratamento.

- *Intermediário*: 16 ratas foram injetadas com E300 por 4 semanas e subdivididas em 2 grupos de 8 ratas tratadas com injeções diárias de NA (0,5 mg) e veículo aquoso, respectivamente nos 12 últimos dias;
- *Prolongado*: Neste experimento, 18 ratas ovariectomizadas foram injetadas semanalmente com E300 por 10 semanas. Durante as duas últimas semanas foram também injetadas diariamente com NA 0,1 mg (10 ratas) ou veículo aquoso (8 ratas) por 12 dias.

2.4.5. Efeitos do Tamoxifeno (TAM) isolado ou associado ao NA ou à BCP sobre os níveis de PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos

Experimento 8.

As 40 ratas componentes deste experimento foram ovariectomizadas e injetadas com BE, 300µg/semana/rata durante 10 semanas. Nos últimos 12 dias, os grupos foram subdivididos e receberam injeções diárias da seguinte forma: veículo aquoso (10 ratas), TAM 20 µg/rata (5 ratas), TAM 60 µg/rata (5 ratas), NA 0,1 mg (10 ratas), BCP 0,05 mg (5 ratas), TAM 20 + NA (5 ratas), TAM 60 + NA (5 ratas), TAM 20 + BCP (5 ratas), TAM 60 + BCP (5 ratas).

2.5. DOSAGEM DE PROLACTINA

A concentração de prolactina sérica foi medida por radioimunoensaio de duplo anticorpo utilizando material fornecido pelo National Institute of Diabetes &

Digestive & Kidney Diseases (NIDDK), composto de: PRL de rato (r-PRL-I-6), anticorpo para PRL de rato produzido em coelho (anti-rat-PRL-S-7) e preparado de referência de PRL de rato (r-PRL-RP-3) usado para a curva padrão. O segundo anticorpo foi cedido gentilmente pelos Professores Dr. José Antunes Rodrigues e Dra. Ana Lúcia Favaretto do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A PRL foi marcada com ^{125}I pelo método da Cloramina T obtendo 70 % de incorporação (teste com TCA) com atividade específica de 280 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, e purificada em coluna de Sephadex G50 (40 x 0,9 cm) usando tampão fosfato 0,01 M com albumina bovina a 1 % para a eluição.

Foram realizados 3 ensaios de modo que todas as amostras de cada experimento fossem dosadas no mesmo ensaio. Para avaliar a variação inter-ensaio foi dosado um *pool* de plasma de ratas normais em todos os ensaios. As amostras foram dosadas sempre em duplicata e a curva padrão em quadriplicata.

A cada tubo foi adicionado tampão fosfato 0,01 M com 0,1 % de soroalbumina bovina, 100 μl da amostra pura ou diluída no mesmo tampão, 100 μl da ^{125}I -PRL com aproximadamente 10.000 cpm e 100 μl do anticorpo anti-PRL diluído em soro de coelho normal a 1% (1:3.000 a 1:4.000). A curva padrão foi obtida adicionando-se 100 μl de rPRL-RP-3 diluído a 1:50 em tampão fosfato 0,01 M com albumina a 1 % de forma a conter 19,5 a 5.000 pg/tubo. Após incubação à temperatura ambiente por 12-18 horas (pernoite) acrescentaram-se 200 μl do segundo anticorpo, anti-IgG de coelho, diluído em uma solução com EDTA 0,05 M e PEG 5% (1:35). Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente os tubos foram centrifugados a 4° C por 25 minutos (centrífuga Incibras, 1.200 x g), o sobrenadante

foi aspirado com bomba a vácuo e a radioatividade do precipitado foi medida em contador gama (LKB), com eficiência de 82%.

O resultado foi expresso em ng/ml de prolactina, considerando-se a curva padrão como referência. A sensibilidade dos ensaios foi de 2 ng/ml e os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio foram de 9,5 e 15 %, respectivamente.

2.6. MEDIDA DO PESO DA HIPÓFISE ANTERIOR

O peso úmido da hipófise anterior foi aferido em todos os experimentos, utilizando uma balança eletrônica (SHANGPING, Shangai Bal. Inst. Fact.) com sensibilidade de até 0,1 mg.

2.7. CONTAGEM DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS À PROLACTINA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Inicialmente, as hipófises fixadas em formalina a 10 % foram incluídas em blocos de parafina. Os cortes foram realizados em série, com espessura de 5 micra e montados em lâminas previamente preparadas com 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma). Após seleção de uma área com boa celularidade, três cortes de cada bloco foram corados de acordo com a técnica de imuno-histoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981 modificada por COUTINHO, 1988).

O anticorpo primário anti-PRL de rato (anti-r-PRL-IC-5) foi obtido através do National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, pelo National Hormone and Pituitary Program, Maryland, USA. O anticorpo secundário, anti Ig G

de coelho biotinizada, o reagente avidina-biotina (ABC) e o soro normal fazem parte do kit ABC (Vector Laboratories, Inc.). O cromógeno utilizado foi o diamino-benzidina - DAB (Serva, Heidelberg). O DAB foi diluído em tampão TRIS-HCl (50 mg/10 ml) e estocado a -20° C até o momento da utilização quando 1,2 ml desta solução mãe eram diluídos em 1,8 ml de tampão fosfato (PBS) e adicionados 3 ml de PBS + 20 μ l de H_2O_2 . Os demais reagentes foram diluídos em PBS.

Antes da coloração propriamente dita, as lâminas foram desparafinadas com xilol e álcool em concentrações decrescentes até a rehidratação em água destilada por 5 minutos. Com o objetivo de inibir a ação da peroxidase endógena, as lâminas foram colocadas em uma solução de metanol (Merck) e peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% por 30 minutos. Após lavagem em PBS por 20 minutos, os cortes foram incubados com soro normal de cabra (1:25) à temperatura ambiente por 20 minutos, para diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos.

Escorrido o soro normal, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído a 1:3.000 em câmara úmida, a 4° C por 12-18 horas (pernoite). Seguiu-se a incubação dos cortes com o anticorpo secundário diluído a 1:200 por 30 minutos e, após nova lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com o ABC (1:200) durante 60 minutos. Finalmente foi realizada a coloração utilizando a mistura de DAB sobre os cortes durante 5 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada, contracoradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com bálsamo.

Como controles foram utilizados cortes de hipófise humana que sofreram o mesmo processamento quando do controle positivo e, no caso do controle negativo, o anticorpo primário foi substituído pelo soro normal.

Uma vez coradas, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico usando objetiva de 40 aumentos à qual foi sobreposta uma lente reticulada com 100 espaços de 1 mm x 1 mm. Em áreas escolhidas ao acaso, foram contadas 200 células nucleadas, registrado o número de células contendo PRL e o resultado foi expresso em percentual de células coradas em relação ao número total de células contadas. A contagem foi realizada por 3 examinadores, permitindo o cálculo da média das contagens para cada hipófise. O percentual de células imunorreativas à prolactina foi referido como percentual de lactotrofos.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ou mediana e amplitude, quando especificado no texto. Os dados de peso hipofisário e percentual de lactotrofos foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls para comparações múltiplas ou pelo teste t de Student para comparar médias de dois grupos de amostras independentes. Os valores de PRL foram submetidos à análise de variância não paramétrica de Kruskal Wallis para comparação de três ou mais grupos e teste de Mann-Whitney quando a comparação foi feita entre dois grupos. Considerou-se significativa toda diferença com valor de p inferior a 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. NÍVEIS SÉRICOS DE PRL, PESO DA HIPÓFISE E PERCENTUAL DE LACTOTROFOS EM RATAS DOS GRUPOS CONTROLE

3.1.1. Concentrações de PRL sérica nos grupos controle

3.1.1.1. *Níveis séricos de PRL de ratas ovariectomizadas e intactas*

Com os objetivos de determinar os valores normais dos grupos controle (ovariectomizadas e intactas), bem como verificar a reprodutibilidade dos níveis séricos de PRL nestes grupos, foram realizados três experimentos em condições experimentais semelhantes. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Tabela 1.

Nos grupos de ratas ovariectomizadas, as médias dos níveis séricos de PRL variaram entre $5,0 \pm 0,8$ e $9,0 \pm 2,3$ ng/ml, enquanto nos grupos de ratas intactas variaram entre $6,0 \pm 1,24$ e $9,1 \pm 0,45$ ng/ml. As médias não foram estatisticamente diferentes entre os experimentos do grupo de ratas intactas ou do grupo de ratas ovariectomizadas. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre as

médias dos grupos OVX e intactas. As medianas também são apresentadas (OVX: 5,2 - 8,3 ng/ml; Intactas: 4,5 - 9,3 ng/ml) mostrando que seus valores são muito próximos dos valores das médias.

Tabela 1: Concentrações de PRL sérica (ng/ml) em ratas ovariectomizadas e intactas.

Experimento	OVX				Intacta			
	média	EP	mediana	amplitude	média	EP	mediana	amplitude
1A	5,8	1,0	5,4	3,4 - 13,2	9,1	0,45	9,3	6,8 - 11,4
1B	5,0	0,8	5,2	2,0 - 8,9	7,3	1,2	6,2	5,8 - 11
1C	9,0	2,3	8,3	1,5 - 19,6	6,0	1,24	4,5	1,7 - 13,3

EP: erro padrão da média. OVX: ovariectomizadas. Foram utilizados 4-9 animais em cada grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

3.1.1.2. Níveis séricos de PRL durante o ciclo estral

A determinação da concentração sérica de PRL em ratas intactas, durante as diferentes fases do ciclo estral, foi realizada com o intuito de verificar se havia flutuações significativas deste hormônio que pudessem interferir com a comparação dos resultados entre ratas intactas e os grupos experimentais. As médias encontradas em cada fase foram: Proestro manhã (PM): $5,68 \pm 0,69$; Proestro tarde (PT): $10,42 \pm 5,39$; Estro (E): $4,84 \pm 0,38$; Diestro I (DI): $6,37 \pm 2,8$; Diestro II (DII): $3,92 \pm 0,29$. Verificou-se que não houve diferença significativa entre as médias das concentrações de PRL de cada grupo, embora nas ratas em proestro sacrificadas à tarde haja maior dispersão entre os dados. Além disso, verificou-se que não existe diferença

significativa entre os valores de PRL obtidos em ratas intactas (sem especificação da fase do ciclo estral) e aqueles observados em qualquer fase do ciclo estral.

3.1.2. Peso da hipófise nos grupos controle

Os pesos hipofisários obtidos nos grupos de ratas ovariectomizadas e intactas são apresentados na Tabela 2.

Considerando os dois experimentos em que o peso hipofisário foi avaliado, a média do peso da hipófise em ratas ovariectomizadas foi de 9,3 mg e em ratas intactas variou entre $8,0 \pm 0,7$ e $10,1 \pm 0,5$ mg. A variação das medianas do peso das hipófises das ratas OVX foi de 9,2 (6,7 - 11) a 9,4 mg (8,8 - 13,4) enquanto das ratas intactas foi de 7,7 (6,8 - 9,8) a 9,4 mg (8,1 - 13,4). Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos OVX e intacta nem entre as médias do mesmo grupo.

Tabela 2: Peso da hipófise (mg) em ratas ovariectomizadas e intactas.

Experimento	OVX				Intacta			
	média	EP	mediana	amplitude	média	EP	mediana	amplitude
1A	9,3	0,4	9,2	6,7 - 11	10,1	0,5	9,4	8,1 - 13,4
2B	9,3	0,2	9,4	8,8 - 9,5	8,0	0,7	7,7	6,8 - 9,8

EP: erro padrão da média. OVX: ovariectomizadas. Foram utilizados 4-10 animais em cada grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

3.1.3. Percentual de lactotrofos nos grupos controle

A Figura 2 mostra o percentual de lactotrofos em relação ao total de células contadas, obtido em ratas OVX ($17,5 \pm 0,98$) e intactas ($23,2 \pm 0,56$). Houve diminuição significativa no percentual de lactotrofos das ratas OVX em relação ao encontrado nas ratas intactas ($p < 0,05$).

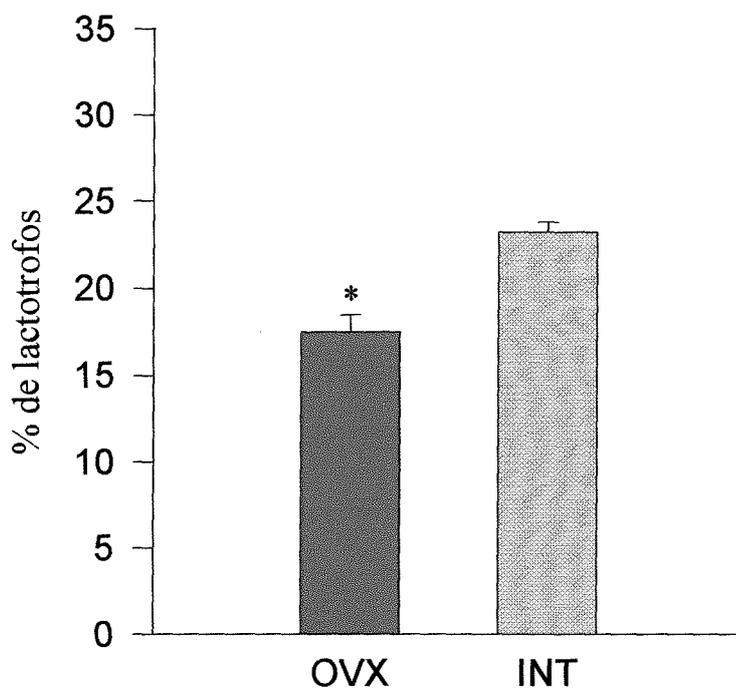


Figura 2. Percentual de lactotrofos em relação ao total de células contadas em ratas ovariectomizadas (OVX) e ratas intactas (INT). Número de animais: 4 para cada grupo. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão da média.

* $p < 0,05$ em relação às intactas.

3.2 EFEITOS DO BENZOATO DE ESTRADIOL NOS NÍVEIS DE PRL SÉRICA, PESO HIPOFISÁRIO E PERCENTUAL DE LACTOTROFOS

3.2.1. Níveis séricos de PRL nos grupos tratados com BE

A etapa seguinte consistiu em determinar as concentrações de PRL sérica em ratas tratadas com benzoato de estradiol (50 ou 300 µg) por diferentes tempos de observação, em comparação com um grupo controle de ratas intactas. A Tabela 3 mostra que, exceto em relação ao grupo que recebeu 50 µg/2 semanas, os outros grupos que receberam BE, 50 ou 300 µg/semana, alcançaram níveis de PRL sérica significativamente maiores do que os das ratas intactas, em todos os tempos examinados.

Tabela 3: Níveis de PRL sérica em ratas tratadas com E50 ou E300 durante 2, 4 ou 10 semanas.

Tratamento	Duração	PRL (ng/ml)
Intacta		9,1 ± 0,45 (9)
E 50	2 semanas	25,3 ± 8,8 (8)
	4 semanas	61,0 ± 18,8 (6)*
	10 semanas	83,6 ± 24 (8)*
E 300	2 semanas	166,2 ± 39,3 (7)*
	4 semanas	115,8 ± 23,6 (8)*
	10 semanas	100,6 ± 21,9 (8)*

O número de animais usado em cada tratamento é indicado entre parênteses. E50: benzoato de estradiol 50 µg/semana/rata; E300: benzoato de estradiol 300 µg/semana/rata. *p < 0,05 em relação ao grupo de ratas intactas.

3.2.2 Peso da hipófise nos grupos tratados com BE

O mesmo experimento permitiu avaliar e comparar o peso hipofisário entre os grupos. Como pode ser observado na Tabela 4, entre os grupos de ratas que receberam 50 µg de benzoato de estradiol (E50), apenas aquele com tratamento prolongado (10 semanas) apresentou aumento significativo do peso da hipófise. Por outro lado, as ratas que receberam a dose mais elevada de benzoato de estradiol (300 µg) tiveram aumento estatisticamente significativo do peso da hipófise já a partir de 2 semanas de tratamento.

Tabela 4: Peso da hipófise em diferentes tratamentos com BE.

Tratamento	Duração	Peso da hipófise (mg)
Intacta		10,1 ± 0,5 (9)
E 50	2 semanas	10,2 ± 0,4 (8)
	4 semanas	11,3 ± 0,5 (5)
	10 semanas	13,8 ± 0,7 (10)*
E 300	2 semanas	13,5 ± 0,9 (8)*
	4 semanas	15,1 ± 0,5 (8)*
	10 semanas	14,2 ± 0,8 (6)*

Entre parênteses: número de animais de cada tratamento. E50: benzoato de estradiol 50 µg/semana; E300: benzoato de estradiol 300 µg/semana. *p < 0,05 em relação ao grupo de ratas intactas.

3.2.3. Percentual de lactotrofos nos diferentes tratamentos com BE

A Figura 3 mostra o percentual de lactotrofos (número de lactotrofos/total de células contadas x 100) nos diferentes grupos tratados com E50 (Figura 3A) ou E300 (Figura 3B) em relação às ratas intactas.

O percentual de lactotrofos das ratas que receberam E50 foi semelhante ao das ratas intactas em todos os tempos testados (2, 4 e 10 semanas). Já nos grupos tratados com E300, o número de lactotrofos foi significativamente maior do que o das ratas intactas, tanto com 2 e 4 como com 10 semanas de tratamento. Todos os tratamentos com BE induziram aumento significativo no número de lactotrofos quando comparados com o grupo de ratas ovariectomizadas.

3.3 EFEITOS DA BROMOCRIPTINA ASSOCIADA AO BE SOBRE OS NÍVEIS DE PRL SÉRICA, PESO HIPOFISÁRIO E PERCENTUAL DE LACTOTROFOS

Dispondo dos dados obtidos com diferentes esquemas de administração de benzoato de estradiol, nesta etapa do trabalho procurou-se determinar os efeitos da BCP associada ao tratamento com BE sobre a concentração de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos.

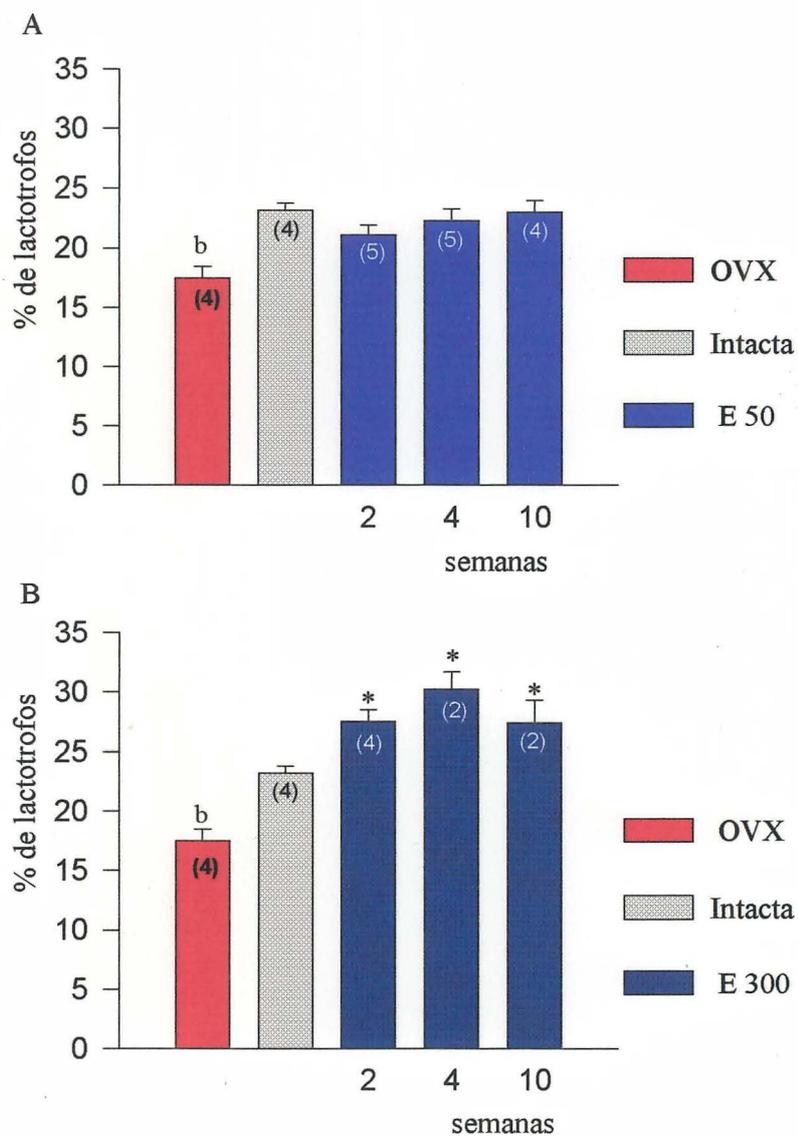


Figura 3. Percentual de lactotrofos nos diferentes grupos tratados com benzoato de estradiol. O número de animais de cada experimento é indicado entre parênteses. A: 50 $\mu\text{g}/\text{semana}$ (E50); B: 300 $\mu\text{g}/\text{semana}$ (E300); OVX: ratas ovariectomizadas. * $p < 0,05$ em relação à intacta; b: $p < 0,05$ em relação a todos os grupos.

3.3.1 Níveis séricos de PRL nos grupos tratados com BCP associada ao tratamento com BE

3.3.1.1. Concentração sérica de PRL nos grupos tratados com BCP associada ao tratamento com E50

Conforme mencionado em material e métodos, a adição de BCP ao tratamento com BE foi realizada durante 5 ou 12 dias. Como pode ser observado na Tabela 5, os níveis séricos de PRL do grupo que recebeu E50 por 2 semanas e BCP (0,6 mg) nos últimos 5 dias não foram diferentes significativamente do grupo controle (E50 + veículo), embora o percentual de redução da concentração de PRL do grupo tratado com BCP em relação ao que recebeu veículo tenha sido de 61 %. Já o grupo tratado por 4 semanas com E50 e que recebeu BCP durante os últimos 12 dias mostrou diminuição significativa nas concentrações de PRL sérica em relação ao grupo que recebeu E50 e veículo aquoso. Neste esquema de tratamento houve 78 % de redução nos níveis séricos de PRL.

Tabela 5: Concentração sérica de PRL nos grupos tratados com BCP (0,6 mg) associada ao tratamento com E50.

E50	Duração		PRL (ng/ml)		% de redução em relação ao E50 + V
	V ou BCP		E50 + V	E50 + BCP	
2 semanas	5 dias		25,3 ± 8,8 (8)	9,8 ± 1,6 (8)	↓ 61 %
4 semanas	12 dias		61,0 ± 18,8 (6)	13,5 ± 1,7 (5)*	↓ 78 %

Entre parênteses: número de animais de cada grupo. E50: Benzoato de estradiol 50 µg/semana; BCP: Bromocriptina; V: Veículo; *p<0,05 em relação ao grupo tratado com E50 + V.

3.3.1.2. Níveis de PRL sérica nos grupos tratados com BCP associada a E300

Na Tabela 6 são apresentados os valores de PRL sérica obtidos em ratas tratadas com E300 por tempo curto, intermediário ou prolongado (2, 4 ou 10 semanas) associado com BCP (0,6 ou 0,05 mg) nos últimos 12 dias de tratamento. Em todos os tempos estudados a BCP, na dose de 0,6 mg, diminuiu significativamente os valores de PRL sérica quando comparados com os grupos tratados com E300 + veículo. Além disso, pode ser observado que o percentual de redução dos níveis de PRL nestes grupos tratados com a dose maior de BCP foi de 88 a 92 %. Apenas o grupo que recebeu uma dose mais baixa de BCP (0,05 mg) não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo tratado apenas com E300, embora o percentual de redução tenha sido de 58,4%. Verificou-se uma resposta dependente da dose de BCP nas ratas tratadas com E300 por 10 semanas, evidenciada pela diferença estatística observada entre os grupos tratados com 0,05 e 0,6 mg de BCP.

Tabela 6: Níveis de PRL sérica nos grupos tratados com BCP (0,6 ou 0,05 mg/rata) associada a E300.

E300	Duração		PRL (ng/ml)		% de redução em relação ao E300 + V
	V ou BCP		E300 + V	E300 + BCP	
2 semanas	12 dias		166,2 ± 39,3 (7)	26,3 ± 4,3 (6)*	↓ 85 %
4 semanas	12 dias		115,8 ± 23,6 (8)	25,6 ± 2,7 (8)*	↓ 88 %
10 semanas	12 dias		100,6 ± 21,9 (8)	42,0 ± 12 (5) ^{a,c}	↓ 58,4 %
				7,9 ± 2,7 (10) ^{b*}	↓ 92 %

O número de animais usado em cada tratamento é indicado entre parênteses. E300: 300 µg/semana; V: veículo; a: BCP 0,05 mg; b: BCP 0,6 mg; *p<0,05 em relação ao grupo tratado com E300 + V. c: p<0,05 em relação ao grupo tratado com BCP 0,6 mg.

3.3.2. Efeitos da BCP associada ao BE sobre o peso da hipófise

Os efeitos do tratamento com BCP (0,6 mg) sobre o peso hipofisário nos grupos tratados com BE, 50 e 300 µg/semana, são apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. O grupo que recebeu BCP nos últimos 5 dias de tratamento com E50 por 2 semanas mostrou redução de 13,4 % do peso da hipófise em relação ao grupo que recebeu E50 + veículo, mas essa redução não foi estatisticamente significativa. A BCP (0,6 mg), administrada durante 12 dias, diminuiu o peso da hipófise em todos os outros grupos. O percentual de redução do peso hipofisário variou de 17,6 a 31,2 %. O efeito da BCP sobre o peso da hipófise de ratas tratadas com E300 por 10 semanas foi dependente da dose.

Tabela 7: Efeitos da BCP (0,6 mg) associada a E50 sobre o peso da hipófise.

E50	Duração		Peso da Hipófise (mg)		% de redução em relação ao E50 + V
	V ou BCP		E50 + V	E50 + BCP	
2 semanas	5 dias		10,2 ± 0,4 (8)	8,8 ± 0,4 (7)	↓ 13,4 %
4 semanas	12 dias		11,3 ± 0,5 (5)	8,1 ± 1,2 (5)*	↓ 28 %

Entre parênteses: número de animais. E50: Benzoato de estradiol 50 µg/semana; V: Veículo; BCP: Bromocriptina; *p<0,05 em relação ao grupo tratado com E50 + V.

Tabela 8: Efeitos da BCP (0,6 mg) associada ao E300 sobre o peso da hipófise.

E300	Duração		Peso da hipófise (mg)		% de redução em relação ao E300 + V
	V ou BCP		E300 + V	E300 + BCP	
2 semanas	12 dias		13,5 ± 0,9 (8)	9,3 ± 0,4 (8) *	↓ 31,2 %
4 semanas	12 dias		15,1 ± 0,5 (8)	10,7 ± 0,6 (8)*	↓ 29,2 %
10 semanas	12 dias		14,2 ± 0,8 (6)	14,8 ± 0,9 (5) ^{a,c}	
				11,7 ± 0,7 (6) ^{b*}	↓ 17,6%

Entre parênteses: número de animais; E300: Benzoato de estradiol 300µg/semana; V: Veículo; BCP: Bromocriptina; a: BCP 0,05 mg; b: BCP 0,6 mg; *p<0,05 em relação ao grupo tratado com E300 + V. c: p<0,05 em relação ao grupo tratado com BCP 0,6 mg.

3.3.3. Percentual de lactotrofos em hipófises de ratas tratadas com BCP associada ao BE

A Figura 4 mostra os percentuais de lactotrofos (número de lactotrofos/total de células contadas x 100) dos grupos tratados com BCP (0,6 mg/dose) nos últimos 5 ou 12 dias de tratamento com E50 durante 2 (Figura 4A) ou 4 semanas (Figura 4B). Na Figura 5 são apresentados os percentuais de lactotrofos dos grupos que receberam BCP associada com E300 por 2 e 4 semanas (Figura 5A e 5B). Observa-se que, quando a BCP foi associada a uma dose menor de BE (50 µg), não houve diferença significativa no percentual de lactotrofos dos grupos tratados com BCP em relação aos grupos tratados com E50 + veículo. Por outro lado, nos grupos que foram tratados com E300 a BCP diminuiu significativamente o número de lactotrofos. Com o tratamento por 2 semanas (Figura 5A), o percentual de lactotrofos no grupo tratado com BCP foi semelhante ao verificado no grupo de ratas intactas.

As Figuras 6 e 7 mostram os cortes das hipófises coradas pela técnica de imunohistoquímica dos grupos de ratas intactas (Figura 6A) e dos que foram tratados, durante 2 semanas, com E50 (Figura 6B) e E300 isolado (Figura 7A) ou associado à BCP (Figura 7B). Observa-se claramente que o tratamento com E50 não determinou alterações no número de células coradas em relação ao grupo de ratas intactas, que recebeu apenas veículo. Por outro lado, a dose de 300/µg, administrada por apenas 2 semanas, promoveu um aumento no número de células coradas em relação às intactas e a adição da BCP ao E300 nos últimos 12 dias reduziu esse número.

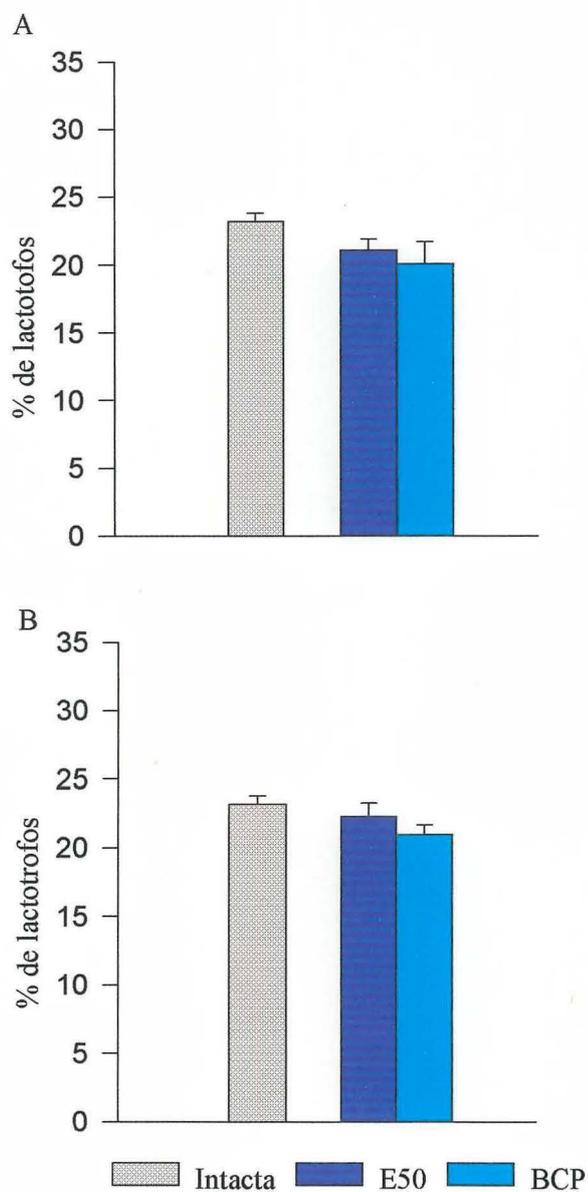


Figura 4. Efeito da bromocriptina associada a E50 sobre o percentual de lactotrofos. Número de animais: 4-6 em cada grupo. E50: 50 μ g/semana de BE + Veículo; BCP: Bromocriptina (0,6 mg/rata); A: 2 semanas de E50 + 5 dias de BCP; B: 4 semanas de E50 + 12 dias de BCP. Não houve diferença estatística entre os grupos em A ou B.

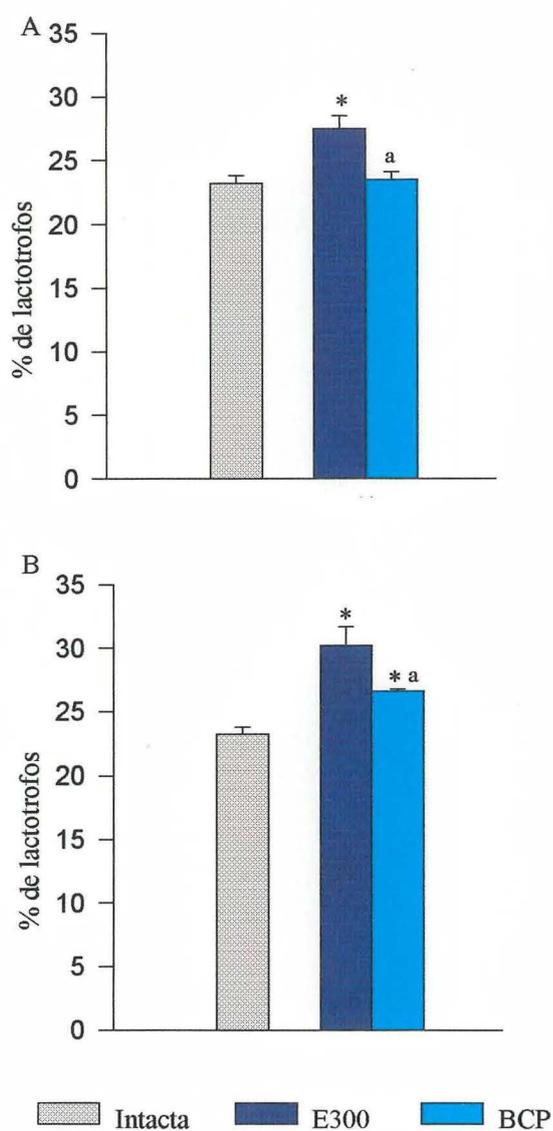
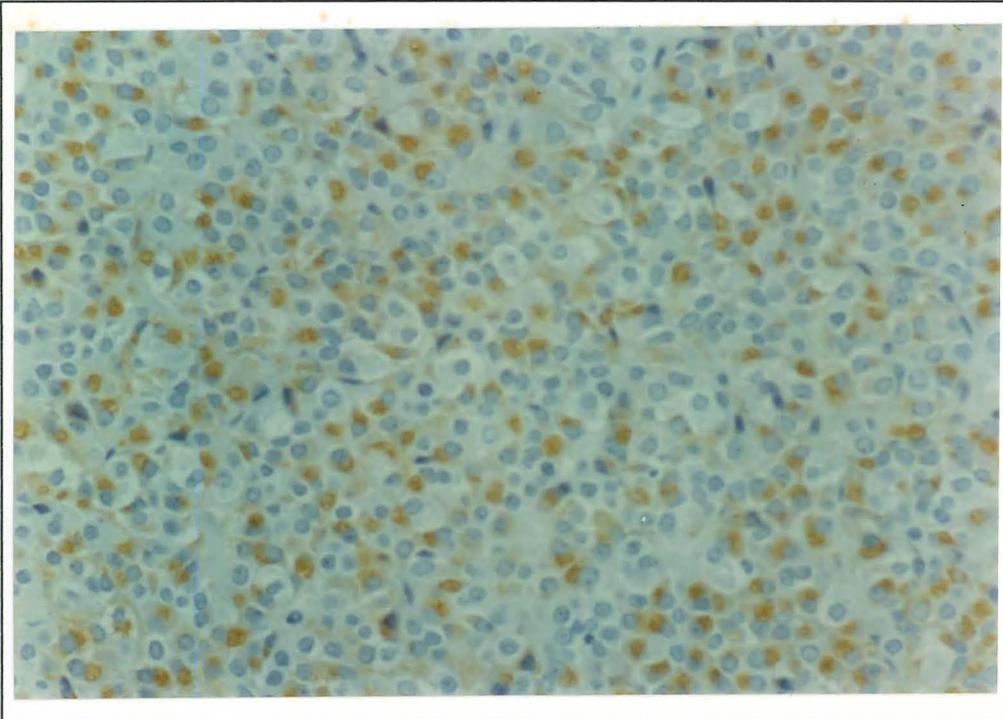


Figura 5. Efeito da bromocriptina associada a E300 sobre o percentual de lactotrofos. Número de animais: 2-4 em cada grupo. E300: 300 μ g/semana de BE + Veículo; BCP: Bromocriptina (0,6 mg/rata); A: 2 semanas de E300 + 12 dias de BCP; B: 4 semanas de E300 + 12 dias de BCP. * $p < 0,05$ em relação à intacta. a: $p < 0,05$ em relação ao E300 + veículo.

A



B

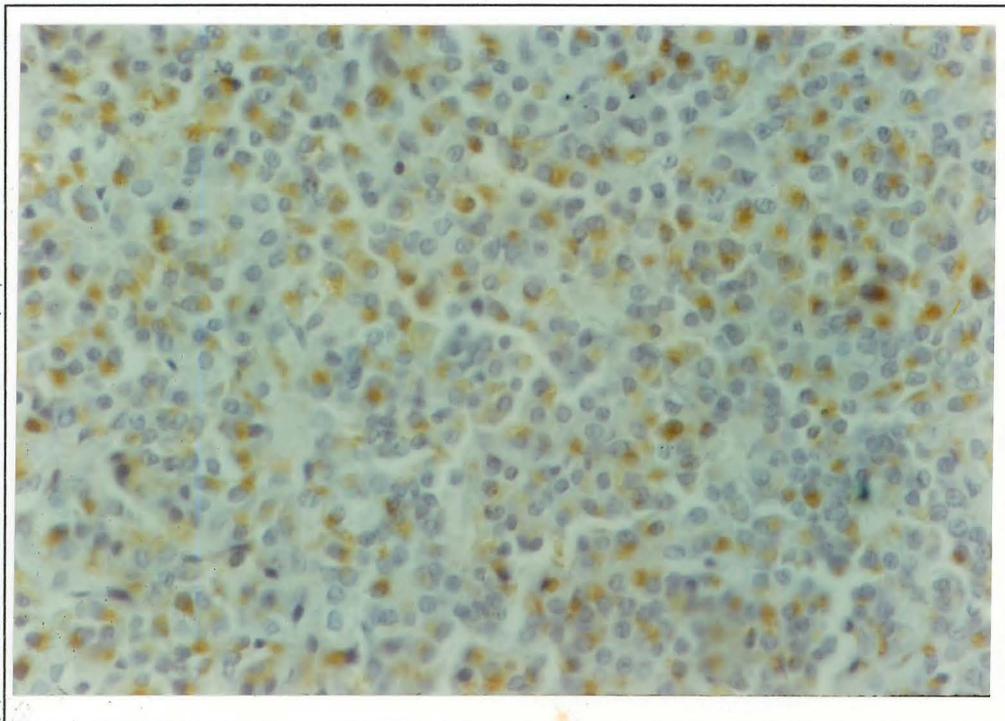


Figura 6. Cortes hipofisários de rata intacta (A) ou tratada com E50 durante 2 semanas (B). Os cortes foram corados com hematoxilina e submetidos à coloração imunohistoquímica pelo método avidina-biotina-peroxidase. A cor marrom representa as células imunorreativas à PRL. Objetiva: 40 aumentos.

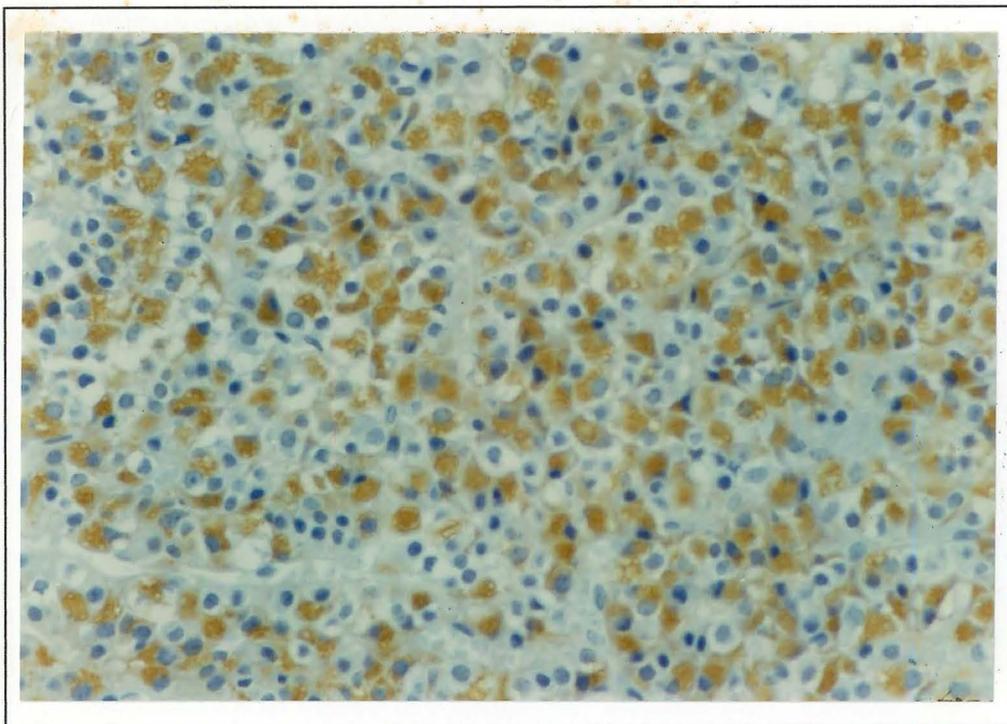
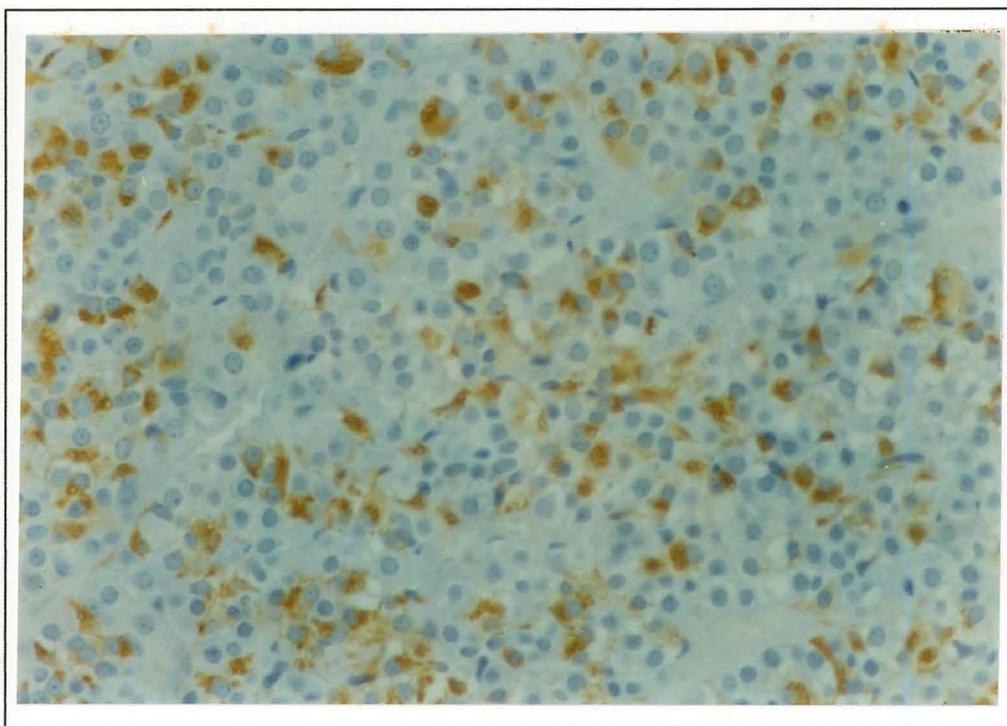
A**B**

Figura 7. Cortes hipofisários de ratas tratadas com E300 durante 2 semanas + veículo (A) ou BCP nos últimos 12 dias (B). Os cortes foram corados com hematoxilina e submetidos à coloração imunohistoquímica pelo método avidina-biotina-peroxidase. Objetiva: 40 aumentos. A cor marrom representa as células imunorreativas à PRL.

3.4. EFEITOS DO ACETATO DE NORETISTERONA ASSOCIADO AO TRATAMENTO COM BE SOBRE OS NÍVEIS DE PRL SÉRICA, PESO HIPOFISÁRIO E PERCENTUAL DE LACTOTROFOS

Estabelecidos os parâmetros do modelo experimental, procurou-se avaliar os efeitos do acetato de noretisterona (NA) associado ao tratamento com BE sobre a concentração de PRL sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos.

3.4.1. Níveis séricos de PRL nos grupos tratados com NA associado ao tratamento com BE

3.4.1.1. Efeitos do NA associado ao tratamento com E50 sobre os níveis de PRL sérica

A Tabela 9 mostra as concentrações de PRL sérica dos grupos que receberam 0,5 mg de acetato de noretisterona (NA) nos últimos 5 ou 12 dias de tratamento com E50. Observa-se que os níveis de PRL não foram estatisticamente diferentes entre os grupos tratados com E50 + NA e os que receberam E50 + veículo, nos dois tempos de tratamento estudados. No entanto, houve uma redução de 49% nos níveis de PRL quando o NA foi administrado por 12 dias.

Tabela 9: Efeito do NA (0,5 mg) associado ao tratamento com E50 sobre os níveis de PRL sérica.

E50	Duração		PRL (ng/ml)		% de redução em relação ao E50 + V
	V ou NA		E50 + V	E50 + NA	
2 semanas	5 dias		25,3 ± 8,8 (8)	18,5 ± 4,2 (8)	↓ 27 %
4 semanas	12 dias		61,0 ± 18,8 (6)	30,7 ± 8,8 (8)	↓ 49 %

Entre parênteses: número de animais. E50: Benzoato de estradiol 50 µg/semana; V: veículo; NA: Acetato de noretisterona. Não houve diferença significativa entre os grupos E50 + NA e E50 + V, tratados por 2 ou 4 semanas.

3.4.1.2. Níveis de PRL sérica nos grupos tratados com NA associado a E300

Os efeitos do NA (0,5 ou 0,1 mg/rata) associado ao tratamento com E300 sobre a PRL sérica são apresentados na Tabela 10. O tratamento com NA nos últimos 12 dias de tratamento com E300 por duas e quatro semanas não provocou alterações significativas nos níveis séricos de PRL, embora tenha havido uma tendência de redução de 31-40%. O tratamento com a dose de 0,1 mg de NA associado com E300 por 10 semanas diminuiu significativamente as concentrações de PRL sérica quando comparado com E300 + veículo.

Tabela 10: Efeito da associação de NA ao tratamento com E300 sobre a concentração de PRL sérica.

E300	Duração		PRL (ng/ml)		% de redução em relação ao E300 + V
	V ou NA		E300 + V	E300 + NA	
2 semanas	12 dias		166,2 ± 39,3 (7)	99,9 ± 15,3 (8) ^a	↓ 40 %
4 semanas	12 dias		115,8 ± 23,6 (8)	79,6 ± 6,9 (8) ^a	↓ 31 %
10 semanas	12 dias		100,6 ± 21,9 (8)	34,5 ± 10,5 (10) ^{b*}	↓ 66 %

O número de animais usado em cada tratamento é indicado entre parênteses. E300: Benzoato de estradiol 300 µg/semana; V: Veículo; NA: Acetato de noretisterona; a: NA 0,5 mg; b: NA 0,1 mg; *p<0,05 em relação ao grupo E 300 + V.

3.4.2. Peso da hipófise nos grupos tratados com NA associado ao BE

3.4.2.1. Efeitos no peso da hipófise do NA associado ao E50

Na Tabela 11 são apresentados os efeitos da associação de NA (0,5 mg/dose) ao tratamento com E50 sobre o peso da hipófise. Essa associação não alterou significativamente o peso hipofisário em relação ao grupo tratado com E50 + veículo, sendo que o percentual de redução foi de 7,4% no grupo tratado por 5 dias com NA enquanto no grupo tratado por 12 dias o peso da hipófise diminuiu 16,8 %.

Tabela 11: Peso da hipófise nos grupos tratados com NA (0,5 mg) associado ao E50.

E50	Duração		Peso da Hipófise (mg)		% de redução em relação ao E50 + V
	V ou NA		E50 + V	E50 + NA	
2 semanas	5 dias		10,2 ± 0,4 (8)	9,44 ± 0,4 (9)	↓7,45%
4 semanas	12 dias		11,3 ± 0,5 (5)	9,4 ± 0,5 (8)	↓16,8%

Entre parênteses: número de animais. E50: Benzoato de estradiol 50 µg/semana; V: Veículo; NA: Acetato de noretisterona. Não houve diferença estatística entre os grupos E50 + NA e E50 +V, tratados por 2 ou 4 semanas.

3.4.2.2. Efeitos do NA associado ao tratamento com E300 sobre o peso da hipófise

A Tabela 12 mostra o peso da hipófise dos grupos tratados com E 300 durante 2, 4 ou 10 semanas associado ao NA nos últimos 12 dias. Observa-se que a dose de 0,5 mg de NA provocou uma redução significativa do peso hipofisário, em todos os tempos estudados. No grupo tratado com 0,1 mg de NA associado ao tratamento por

10 semanas com E300 o peso da hipófise não foi diferente estatisticamente do grupo E 300 + veículo, mostrando um percentual de redução de 4 %.

Tabela 12: Peso da hipófise nos grupos tratados com NA (0,5 ou 0,1 mg), associado ao tratamento com E300.

E300	Duração		Peso da Hipófise (mg)		% de redução em relação ao E300 + V
	V ou NA		E300 + V	E300 + NA	
2 semanas	12 dias		13,5 ± 0,9 (8)	10,7 ± 0,5 (8) ^{a*}	↓20,7 %
4 semanas	12 dias		15,1 ± 0,5 (8)	12 ± 0,88 (8) ^{a*}	↓20,5 %
10 semanas	12 dias		14,2 ± 0,8 (6)	13,54 ± 0,9 (5) ^b	↓4%

Entre parênteses: número de animais de cada tratamento. E300: Benzoato de estradiol 300 µg/semana; V: Veículo; NA: Acetato de noretisterona; a: NA 0,5 mg/rata; b: NA 0,1 mg/rata. * p<0,05 em relação ao grupo tratado com E300 + V.

3.4.3 Percentual de lactotrofos em ratas tratadas com NA associado ao BE

Os efeitos no percentual de lactotrofos observados com a associação de NA (0,5 ou 0,1 mg) ao tratamento com E50 ou E300 são apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Não houve diferença significativa no percentual de lactotrofos dos grupos tratados com NA associado com a dose mais baixa de BE (50 µg /semana) em relação aos grupos tratados com E50 + veículo (Figura 8, A e B). Dos grupos que receberam E300 (Figura 9, A e B), os grupos tratados por 2 e 4 semanas mostraram redução significativa no percentual de lactotrofos quando o NA (0,5 mg) foi associado nos últimos 12 dias de tratamento. No grupo tratado com NA associado com E300 por 2 semanas, o percentual de lactotrofos não diferiu significativamente daquele verificado nas ratas intactas. O grupo tratado com E300 por 10 semanas

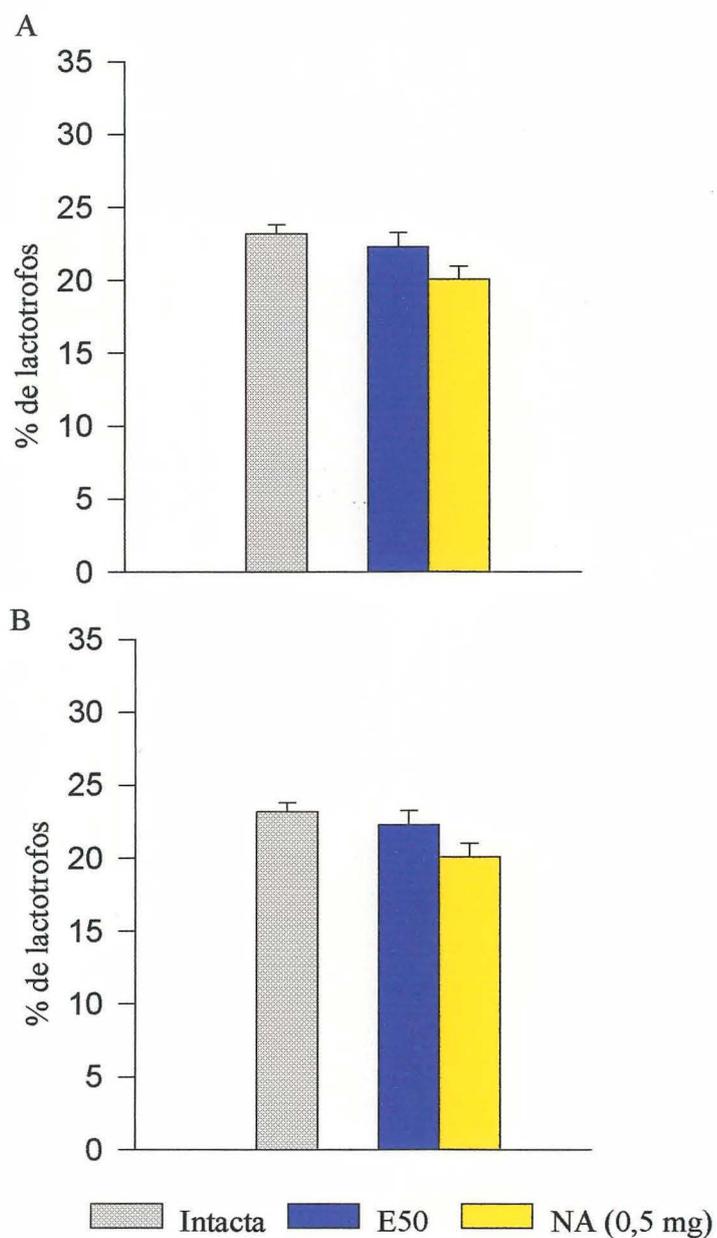


Figura 8. Efeito do NA associado a E50 sobre o percentual de lactotrofos. Número de animais: 4-5 em cada grupo. E50: 50 μg /semana de BE + Veículo; NA: Acetato de noretisterona (0,5 mg); A: 2 semanas de E50 + 5 dias de NA; B: 4 semanas de E50 + 12 dias de NA. Não houve diferença estatística entre os grupos A ou B.

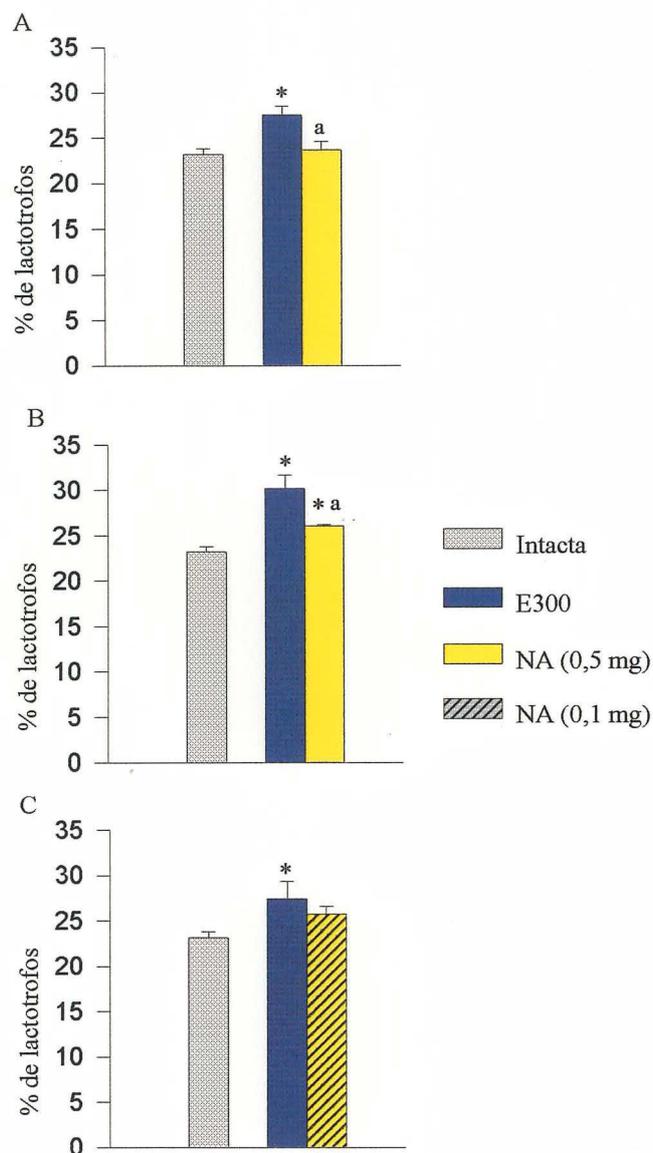


Figura 9. Efeito do NA associado a E300 sobre o percentual de lactotrofos. Número de animais: 2-6 em cada grupo. E300: 300 μg /semana de BE + Veículo; NA: Acetato de noretisterona; A: 2 semanas de E300 + 12 dias de NA (0,5 mg); B: 4 semanas de E300 + 12 dias de NA (0,5 mg); C: 10 semanas de E300 + 12 dias de NA (0,1 mg). * $p < 0,05$ em relação à intacta. a: $p < 0,05$ em relação ao E300 + veículo.

(Figura 9C) não apresentou diferença significativa no percentual de lactotrofos quando o NA foi associado na dose de 0,1 mg/rata.

3.5 EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO TAMOXIFENO ISOLADO OU ASSOCIADO AO NA OU À BCP SOBRE OS NÍVEIS DE PRL SÉRICA, PESO DA HIPÓFISE E PERCENTUAL DE LACTOTROFOS

Partindo de resultados obtidos anteriormente neste laboratório, que demonstraram que o TAM na dose de 120 µg não reduzia significativamente os níveis de PRL sérica e o percentual de lactotrofos quando associado ao tratamento prolongado com E300, nesta fase do trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da associação de doses menores de TAM, com NA e BCP também em doses baixas.

3.5.1 Efeitos do TAM e do NA associados ao tratamento prolongado com BE

3.5.1.1 Efeitos das associações de TAM e NA sobre a PRL sérica

A Figura 10 mostra o efeito das associações de TAM, nas doses de 20 ou 60 µg, e NA (0,1 mg) sobre os níveis séricos de PRL em ratas tratadas com E300 durante 10 semanas. Observa-se que as duas doses de tamoxifeno testadas não modificaram os níveis de PRL sérica em relação ao grupo tratado com E300 + veículo. A associação dessas mesmas doses com NA provocou uma redução da PRL sérica que não foi estatisticamente significativa. Houve diferença significativa no grupo tratado com NA em relação ao E300, conforme mostrado anteriormente, e em relação ao TAM (20 e 60 µg).

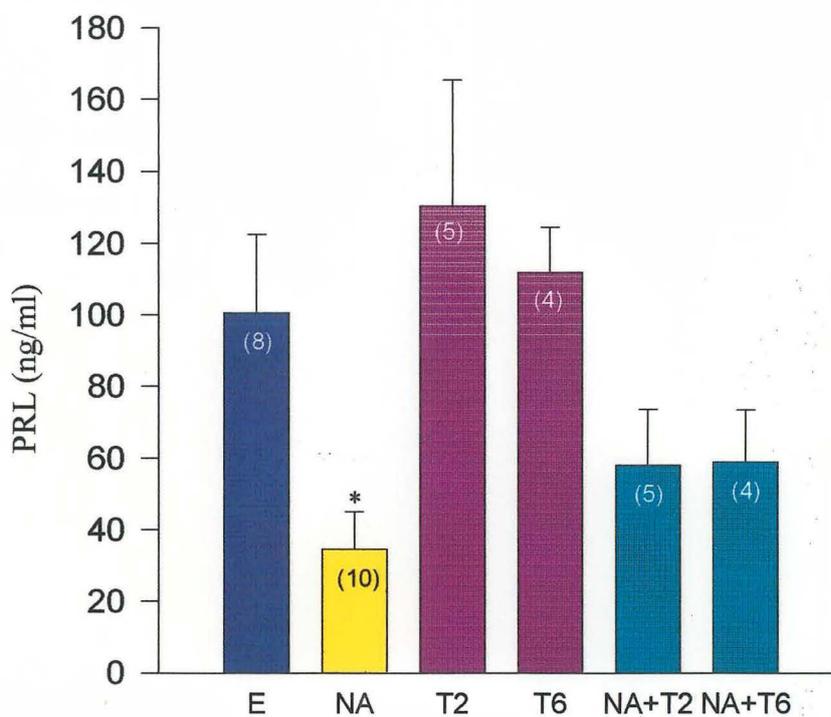


Figura 10. Efeitos do tamoxifeno associado ao NA sobre a PRL sérica. E: Benzoato de estradiol (300 μ g/semana); NA: Acetato de noretisterona (0,1 mg); T2: Tamoxifeno, 20 μ g; T6: Tamoxifeno, 60 μ g; NA + T2: Acetato de noretisterona e Tamoxifeno 20 μ g; NA + T6: Acetato de noretisterona e Tamoxifeno 60 μ g. Entre parênteses é indicado o número de animais de cada tratamento. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão da média. * $p < 0,05$ em relação a E, T2 e T6.

3.5.1.2 Efeitos das associações de TAM e NA sobre o peso da hipófise

Os efeitos das associações de TAM (20 ou 60 µg) com NA (0,1 mg) sobre o peso da hipófise de ratas tratadas com E300 durante 10 semanas são apresentados na Figura 11. Observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos quanto às médias dos pesos hipofisários.

3.5.2 Efeitos do TAM e da BCP associados ao tratamento prolongado com BE

3.5.2.1 Efeitos da associação de TAM com BCP sobre a PRL sérica

A Figura 12 mostra os efeitos da associação de BCP (0,05 mg) ao tamoxifeno, nas doses de 20 ou 60 µg, sobre os níveis séricos de PRL de ratas tratadas com E300 durante 10 semanas. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

3.5.2.2 Efeitos da associação de TAM com BCP sobre o peso hipofisário

A Figura 13 mostra os efeitos da associação de TAM (20 ou 60 µg) com BCP (0,05 mg) sobre o peso da hipófise de ratas tratadas com E300 durante 10 semanas. Estas associações não alteraram significativamente o peso da hipófise, quando comparadas ao grupo de ratas tratadas apenas com E300.

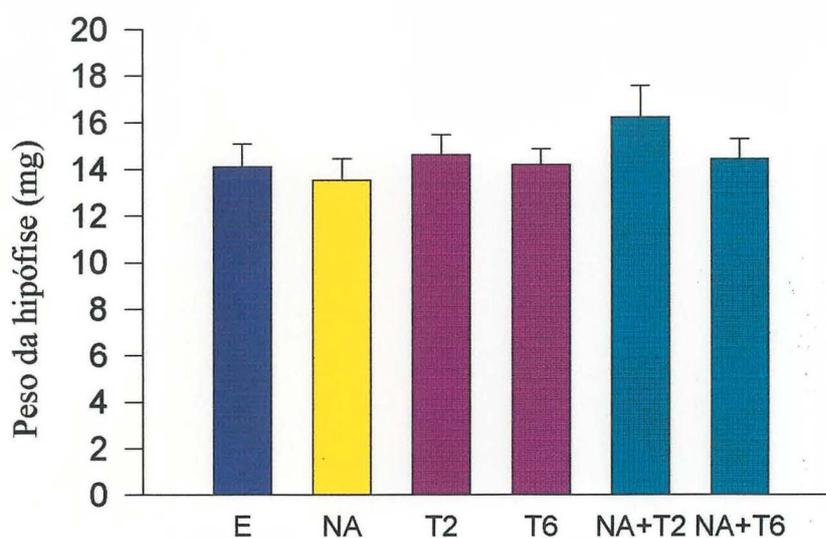


Figura 11. Efeitos do TAM associado ao NA 0,1 mg sobre o peso da hipófise. E: Benzoato de estradiol (300 μ g/semana); NA: Acetato de noretisterona (0,1 mg); T2: Tamoxifeno, 20 μ g; T6: Tamoxifeno, 60 μ g; NA + T2: Acetato de noretisterona e Tamoxifeno 20 μ g; NA + T6: Acetato de noretisterona e Tamoxifeno 60 μ g. Número de animais: 4-5 em cada grupo. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos.

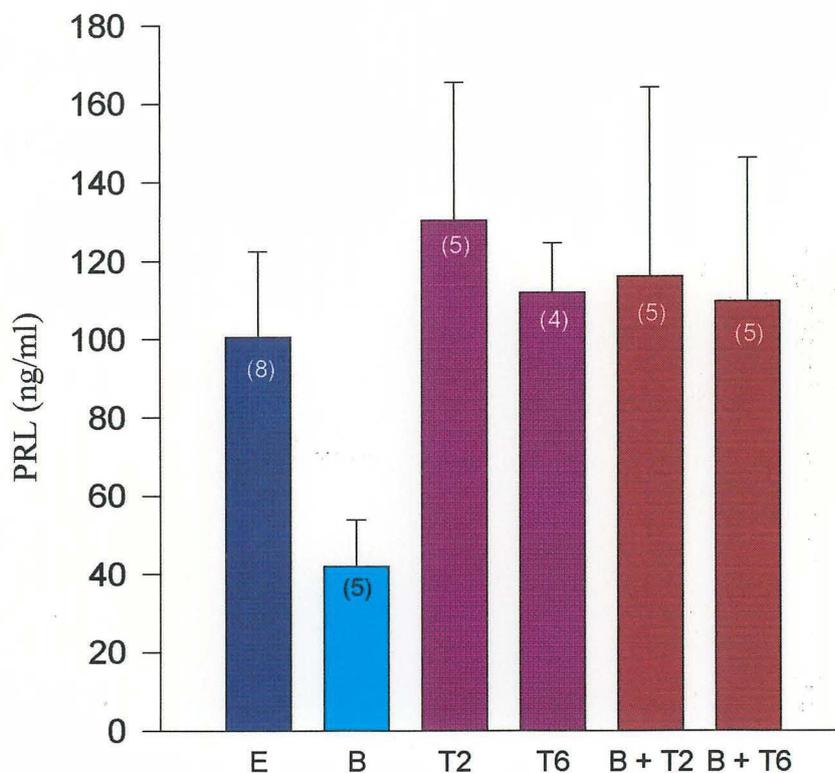


Figura 12. Efeitos da associação de TAM com BCP sobre a PRL sérica. E: Benzoato de estradiol (300 μ g/semana); B: Bromocriptina (0,05 mg); T2: Tamoxifeno, 20 μ g; T6: Tamoxifeno, 60 μ g; B + T2: Bromocriptina e Tamoxifeno 20 μ g; B + T6: Bromocriptina e Tamoxifeno 60 μ g. Entre parênteses é indicado o número de animais. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos.

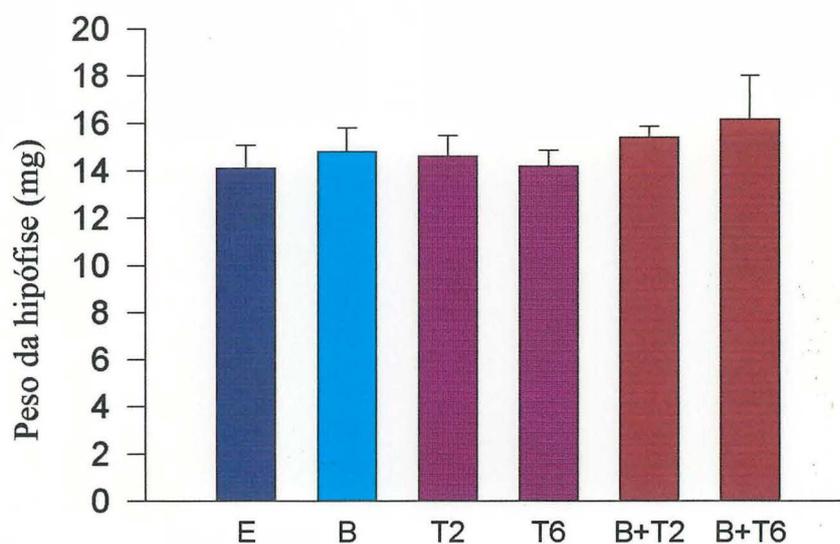


Figura 13. Efeitos da associação de TAM e BCP sobre o peso hipofisário. E: Benzoato de estradiol (300 μ g/semana); B: Bromocriptina (0,05 mg); T2: Tamoxifeno, 20 μ g; T6: Tamoxifeno, 60 μ g; B + T2: Bromocriptina e Tamoxifeno 20 μ g; B + T6: Bromocriptina e Tamoxifeno 60 μ g. Número de animais: 4-5 em cada grupo. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos.

3.5.3 Percentual de lactotrofos dos grupos tratados com as associações de TAM com BCP e NA

Na Tabela 13 são apresentadas as médias dos percentuais de lactotrofos obtidos em hipófises de ratas tratadas durante 10 semanas com E300 e nos últimos 12 dias com tamoxifeno (20 ou 60 μg), BCP (0,05 mg), NA (0,1 mg) e as associações de TAM com NA e BCP. Observa-se, que os valores encontrados são muito próximos entre si. Verificou-se uma redução significativa no grupo TAM 20 + NA em relação aos grupos E300, NA, TAM20 e intactas.

Tabela 13: Percentual de lactotrofos na hipófise de ratas tratadas com as associações de TAM com NA e BCP.

Tratamento	% lactotrofos
Intactas	23,2 \pm 0,56 (4)
E300	27,4 \pm 1,9 (2)
BCP	21,55 \pm 0,25 (2)
NA	25,7 \pm 0,9 (2)
TAM 20	25,5 \pm 1,27 (2)
TAM 60	24,7 \pm 1,9 (2)
TAM 20 + NA	18,9 \pm 0,6 (2)*
TAM 60 + NA	25,45 \pm 2,05 (2)
TAM 20 + BCP	21,9 \pm 0,6 (2)
TAM 60 + BCP	20,8 \pm 1 (2)

Entre parênteses está indicado o número de animais de cada grupo. E300: Benzoato de estradiol 300 μg /semana + veículo; BCP: Bromocriptina (0,05 mg); NA: Acetato de noretisterona (0,1 mg); TAM 20: Tamoxifeno 20 μg ; TAM 60: Tamoxifeno 60 μg . * $p < 0,05$ em relação às intactas, E300, NA e TAM 20. Todos os grupos foram tratados com E300 durante 10 semanas e nos últimos 12 dias receberam os demais fármacos ou veículo (intactas).

4. DISCUSSÃO

No contexto da proposta central deste trabalho de estabelecer um modelo adequado para estudar as interações entre o estradiol e o controle da secreção de PRL em ratas hiperprolactinêmicas, foi importante determinar valores de referência dos animais dos grupos controle para as variáveis estudadas, ou seja, níveis de prolactina sérica, peso da hipófise e percentual de lactotrofos. No modelo experimental utilizado neste trabalho, as ratas foram ovariectomizadas e tornadas hiperprolactinêmicas por indução com estradiol.

No que se refere aos níveis de PRL sérica das ratas ovariectomizadas, a comparação entre os dados obtidos em experimentos repetidos em três momentos distintos mostrou a reprodutibilidade do modelo, uma vez que as médias das ratas ovariectomizadas não diferiram significativamente entre os experimentos. Os dados apresentados aqui estão de acordo com vários autores: Milenkovic et al. (1986) e Oliveira et al. (1993), encontraram 9,9 ng/ml e $3,52 \pm 0,61$ ng/ml de prolactina sérica, respectivamente, em ratas Wistar ovariectomizadas, e Pilotte et al. (1984) apresentaram como controle ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, com $3 \pm 0,6$ ng/ml de prolactina sérica.

Como a PRL é sabidamente luteotrófica em roedores, a maioria dos autores utiliza como controle ratas ovariectomizadas, ou ratas intactas com a especificação da fase do ciclo estral em que as mesmas se encontram. De Léan et al. (1977) usaram como controle ratas intactas com valores de PRL sérica semelhantes aos encontrados neste trabalho. Apesar de vários relatos descritos na literatura indicarem a pouca variação da PRL durante o ciclo estral, houve a preocupação de avaliar a variação nas concentrações de PRL sérica durante as fases do ciclo estral e, nas condições experimentais do laboratório, se essa variação seria significativa em relação às ratas intactas usadas como controle, sem avaliação da fase do ciclo estral. Constatou-se que não houve diferença significativa entre as médias da concentração de PRL nas diferentes fases do ciclo, embora nas ratas em proestro sacrificadas à tarde a dispersão tenha sido maior. Os níveis séricos de PRL permanecem constantes e baixos durante o ciclo estral exceto na tarde de proestro (BLAKE et al., 1972; NEILL, 1970; LAFUENTE et al., 1993). A liberação de estradiol aumenta durante o proestro à tarde e durante o estro, relacionando-se com o aumento paralelo da PRL nessas fases (BEN-JONATHAN, 1985). O *turnover* de dopamina (DA) na eminência mediana e a concentração de DA portal são mais baixos no proestro em relação às outras fases e esta é inversamente relacionada com as concentrações de PRL plasmática (BEN-JONATHAN et al., 1977). Além disso, os níveis séricos de PRL de ratas intactas não foram diferentes daqueles encontrados em ratas sacrificadas em qualquer fase do ciclo estral. Por essa razão, os experimentos do presente trabalho sempre foram realizados pela manhã e para evitar que a manipulação do animal necessária para coleta do esfregaço interferisse nos níveis de PRL sérica, as ratas intactas foram sacrificadas sem observação da fase do ciclo.

Em relação ao peso da hipófise anterior, os dados também foram reprodutíveis, tanto em ratas OVX como em intactas. Os resultados descritos no presente trabalho são semelhantes aos obtidos por outros autores utilizando diferentes desenhos experimentais. El Azouzi et al. (1990), trabalhando com ratas Fischer 344, referem o peso total da hipófise como $13,0 \pm 1,0$ mg após 30 dias de ovariectomia. Experimentos com ratas Sprague-Dawley, após uma semana de castração, mostraram $12,2 \pm 0,4$ mg de peso total da hipófise (CHEN & MEITES, 1970). Outros autores relatam pesos semelhantes em ratas ovariectomizadas, variando de 7 a 13 mg (BLAKE et al., 1972; LU et al., 1971; ELIAS & WEINER, 1984; SARKAR et al., 1982). Lloyd e Landefeld (1986) usaram como controles ratas Wistar intactas com hipófises pesando 7,9 mg, enquanto Yamamoto et al. (1986) apresentaram o peso hipofisário dos controles intactos como 8,6 mg. OLIVEIRA (1993a) não observou diferença significativa entre o peso da hipófise de ratas OVX ($7,4 \pm 0,65$) e intactas ($7,15 \pm 0,67$).

Os resultados deste trabalho mostram que houve diminuição significativa no percentual de lactotrofos das ratas OVX em relação ao número encontrado nas ratas intactas. Os percentuais apresentados são coerentes com os encontrados por outros autores, tanto em ratas ovariectomizadas (SAKUMA et al., 1984) como em ratas intactas (TAKAHASHI & KAWASHIMA, 1982). Por outro lado, Lloyd e Landefeld (1986) encontraram em ratas intactas um percentual de lactotrofos um pouco mais alto do que os referidos no presente trabalho. Ibrahim et al. (1986) demonstraram que a percentagem de células imunorreativas à PRL em fêmeas diminuiu para níveis similares aos de machos após 30 dias de castração. Takahashi et al. (1984) mostraram redução da atividade mitótica em ratas ovariectomizadas em relação aos controles. A

castração também diminui o tamanho das células imunorreativas à PRL e dos grânulos secretórios (OSAMURA et al., 1982; GERSTEN & BAKER, 1970).

Considerando o grande número de animais necessário para o desenvolvimento do modelo experimental proposto e a boa reprodutibilidade das variáveis estudadas, foram utilizados os mesmos valores de referência para os grupos controle (ratas OVX e intactas) para fins de comparação com os dados obtidos nos demais grupos experimentais. Por outro lado, nas comparações efetuadas com os dados obtidos nos diferentes tratamentos, optou-se por utilizar ratas intactas como grupo controle uma vez que as mesmas representam mais fielmente o padrão fisiológico. As ratas OVX, embora tenham apresentado valores de PRL sérica e peso hipofisário semelhantes aos do grupo de ratas intactas, representam uma condição não fisiológica de depleção de estrogênio, como fica evidenciado pelos valores significativamente mais baixos do percentual de lactotrofos em relação às ratas intactas.

O estradiol é um importante regulador fisiológico da secreção de PRL. Vários autores demonstraram que o tratamento de ratas OVX com estradiol resulta em aumento da síntese e da secreção de PRL (LAWSON et al., 1993; MAURER, 1982a), além de aumento no tamanho e número de lactotrofos (LLOYD, 1983). Utilizando hibridização *in situ* e imunohistoquímica, Yamamoto et al. (1986) descreveram que o tratamento estrogênico prolongado não só aumenta a proliferação de células produtoras de PRL como estimula o acúmulo de mRNA da PRL em cada célula. Foi observado aumento da síntese de DNA na hipófise e de mRNA da PRL após 24 e 48 horas da injeção de estradiol, respectivamente (TSUKAHARA et al., 1994).

No modelo experimental utilizado neste trabalho, o efeito estimulatório do estradiol sobre a secreção de PRL foi demonstrado em todos os tempos examinados, quando foi usada a dose mais alta (300µg/semana). A dose mais baixa, 50 µg/semana, também aumentou os níveis séricos de PRL quando o tratamento foi realizado durante 4 ou 10 semanas. O tratamento durante 2 semanas com essa dose não aumentou significativamente a PRL sérica quando comparado com os níveis séricos de PRL das ratas intactas. Spritzer et al. (1995) descreveram aumento significativo da PRL sérica em ratas submetidas ao tratamento com E50 por 2 semanas em comparação com animais ovariectomizados. A diferença entre esses resultados ocorreu, provavelmente, porque o estímulo estrogênico foi fraco, em termos de dose e tempo, gerando respostas limítrofes. Esses resultados confirmam dados da literatura que demonstram que o efeito do estrogênio sobre a PRL sérica é dependente da dose, do tempo de administração e da suscetibilidade da cepa (CHEN & MEITES 1970). Murai e Ben-Jonhatan (1990) demonstraram que a injeção de 17βestradiol, em ratas Wistar ovariectomizadas, aumentou 5-6 vezes os níveis de PRL alcançando um máximo aos 180 minutos. O tratamento de ratas F344 com dietilestilbestrol (DES) durante 3, 9 e 12 semanas mostrou aumento da PRL sérica dependente da duração do tratamento (LLOYD, 1983). Maurer e Gorski (1977) mostraram aumento da síntese de PRL após 3-7 dias de tratamento com estradiol *in vivo*, em ratas Holtzman.

Experimentos realizados *in vitro* também demonstraram o aumento da produção de PRL, dependente da dose de estradiol, tanto em culturas primárias de lactotrofos de hipófises normais (LIEBERMAN et al., 1978), como em cultura de células provenientes de tumor hipofisário (HAUG & GAUTVIK, 1976).

A administração prolongada de estrogênios leva à hiperplasia e desenvolvimento de tumores em ratas de cepas suscetíveis (LLOYD, 1983; WELSCH et al., 1971; WILKLUND et al., 1981). A formação de adenoma também é dependente da dose e duração do tratamento. Chen e Meites (1970) mostraram aumento da PRL hipofisária e do peso da hipófise, dependentes da dose, usando BE durante 6 dias. Gottschall et al. (1986) mostraram aumento significativo do peso da hipófise anterior após 4 semanas de tratamento com 6 mg de 17 β estradiol em ratas F344. Wilklund et al. (1981) descreveram aumento do peso da hipófise dependente da dose (0,1 a 2,5 mg) após 8 semanas de tratamento com DES em ratas F344, enquanto em ratas Holtzman não houve esse aumento. Tatár et al. (1991) relataram aumento do peso da hipófise após 4, 8 e 16 semanas de tratamento com 2,5 mg/semana de 17 β estradiol e apenas as hipófises de ratas tratadas por 4 semanas mantiveram características normais. Em ratas F344 houve aumento da PRL (40 vezes) e do peso da hipófise (13 vezes) após implante de DES por 30 dias, além de hiperplasia dos lactotrofos (EL-AZOUZI et al., 1990). Esses efeitos foram reversíveis aos 30 dias e irreversíveis aos 60 dias. Já em 1975, Lloyd et al. demonstraram aumento da atividade mitótica e do peso hipofisário após uma dose de dipropionato de DES. O estímulo estrogênico induz hipertrofia das células produtoras de PRL, que apresentam maior número de grânulos secretórios grandes (OSAMURA et al., 1982; GERSTEN & BAKER, 1970). O tratamento com estradiol não só aumenta o percentual como o número total de lactotrofos (HU & LAWSON, 1994). Van Nesselrooij et al. (1991) descreveram aumento progressivo do número de células imunorreativas à PRL, alterações histopatológicas na hipófise e visualização dessas alterações por ressonância magnética, a partir de 9 dias de estímulo estrogênico.

Observou-se, neste trabalho, utilizando a dose mais baixa de BE (50µg/semana), que o peso da hipófise só aumentou significativamente após 10 semanas de tratamento, embora a PRL sérica já estivesse aumentada em ratas tratadas durante 4 semanas. Quando o número de lactotrofos foi comparado com o do grupo controle, verificou-se que o tratamento com 50µg/semana não provocou alterações proliferativas na hipófise. Utilizando a dose maior de BE (300 µg/semana) houve aumento significativo do peso da hipófise e do percentual de lactotrofos em todos os tempos de tratamento estudados. Esses dados indicam que as alterações proliferativas na hipófise só se desenvolvem com a dose mais alta de BE ou após administração prolongada da dose mais baixa. No entanto, o aumento dos níveis séricos de PRL observado em ratas tratadas com a dose de 50 µg/semana durante 4 semanas, sem alterações proliferativas da hipófise, sugere uma hiperprolactinemia “funcional” induzida por BE (SPRITZER et al., 1996). O estado de “hiperprolactinemia funcional”, assim como a hiperprolactinemia idiopática humana, constitui um modelo para o estudo dos mecanismos neuroendócrinos de regulação da secreção de PRL (RIBEIRO et al., 1996).

O desenvolvimento de um modelo onde se estabeleçam esquemas de tratamento que induzam hiperprolactinemia com ou sem alterações proliferativas da hipófise é de suma importância para o estudo das interações entre os diversos agentes, inibidores ou estimuladores, que regulam a liberação de PRL. Existem vários modelos experimentais que têm sido utilizados para a identificação dos mecanismos intracelulares que regulam a síntese e secreção de PRL, tanto *in vitro* como *in vivo* (LAMBERTS & MacLEOD, 1990). A investigação *in vivo* é bastante diversificada na literatura, devido a grande variabilidade existente entre os modelos experimentais

utilizados por cada autor, o que dificulta a comparação dos resultados. Como citado na introdução, essa diversidade inclui a utilização de cepas com diferente sensibilidade à ação estrogênica, fármacos de diferentes grupos farmacológicos, doses e duração do tratamento estrogênico. Além disso, muitos são os parâmetros observados como, peso da hipófise (KAPP & FOX, 1981; ARITA et al., 1990), síntese de DNA (JACOBI et al., 1977), atividade mitótica (LLOYD et al., 1975; TAKAHASHI et al., 1984), mRNA de PRL (AMARA et al., 1987; NOGAMI et al., 1985), conteúdo de PRL hipofisária (MOY & LAWSON, 1992), e transcrição do gene da PRL (MAURER et al., 1990; SCHULL & GORSKI, 1985). O percentual de lactotrofos é um parâmetro pouco estudado, embora tenha sido bem descrito o aumento de células imunorreativas à PRL com o tratamento estrogênico crônico (LLOYD, 1983; PRYSOR-JONES et al., 1988; LLOYD & LANDEFELD, 1986; YAMAMOTO et al., 1986). Desta forma, no presente trabalho desenvolveu-se um modelo experimental de hiperprolactinemia, reprodutível, que permite avaliar a resposta secretória dos lactotrofos ao estímulo estrogênico sem que este provoque alterações proliferativas na hipófise. Embora não se possa transpor resultados obtidos em ratos para humanos, de certa maneira é possível fazer uma analogia da hiperprolactinemia encontrada neste modelo experimental e a hiperprolactinemia idiopática humana.

Há muitas evidências de que a dopamina (DA) secretada pelos neurônios túbero-infundibulares e liberada nos vasos porta mantém os lactotrofos sob inibição tônica, sendo amplamente aceito este mecanismo como o regulador fisiológico primário da secreção de PRL. A DA pode inibir, estimular ou não produzir efeito na liberação de PRL, dependendo da concentração de DA usada e a duração do tratamento estrogênico a que os animais forem submetidos (PARKER & LAWSON,

1993). A DA e seus agonistas reduzem a síntese de PRL e o conteúdo de mRNA de PRL na hipófise (DAVIS, et al., 1989; MAURER, 1980). Os estrogênios estimulam a secreção de PRL através de mecanismos diversos, como, por exemplo, aumentando receptores de TRH na hipófise (De LÉAN et al., 1977) ou modulando a liberação de dopamina hipotalâmica nos vasos porta (CRAMER et al., 1979; CASANUEVA et al., 1982). A incubação prévia de células hipofisárias em cultura com estradiol reverteu o efeito inibitório de agonistas dopaminérgicos (RAYMOND et al., 1978; WEST & DANNIES, 1980), e o tratamento de ratas F344 com DES reduziu a síntese de DA na eminência mediana e a atividade dos TIDA (MORGAN et al., 1985). Assim, o estradiol poderia atuar diretamente no hipotálamo mediobasal reduzindo a atividade e os níveis de mRNA da tirosina hidroxilase (PASQUALINI, et al., 1993; ARBOGAST & VOOGT, 1993) ou, na hipófise, reduzindo a capacidade das células secretoras de PRL de internalizar a dopamina (GUDELSKY et al., 1981). O aumento da concentração de DOPAC (metabólito da DA) na eminência mediana, após a administração de 17 β estradiol, foi bloqueado pelo anticorpo contra PRL, indicando que os efeitos estimulatórios do estrogênio sobre a atividade dos TIDA podem ser mediados pela PRL (TONEY et al., 1992).

A bromocriptina (BCP), um agonista dopaminérgico, tem sido usada para tratamento clínico de hiperprolactinemia e para reduzir o tamanho de prolactinomas (JAQUET, 1993; TINDALL et al., 1982; CUNNAH & BESSER, 1991; BASSETTI et al., 1984). A BCP inibiu a síntese e liberação de PRL em células dissociadas e quando adicionada ao meio de incubação de cultura primária de hipófise de ratos (DANNIES & RUDNICK, 1980; CHEN et al., 1993). Experimentos realizados *in*

vivo mostraram que a administração de BCP simultaneamente ao estradiol reduziu os níveis de PRL plasmática e o peso da hipófise (HANDA & RODRIGUEZ, 1991).

No modelo experimental descrito nesta tese, os efeitos da BCP foram testados em ratas ovariectomizadas e injetadas com benzoato de estradiol em vários esquemas de tratamento (RIBEIRO et al., 1996). Quando a BCP foi associada nos últimos 5 dias de tratamento com E50, a concentração de PRL sérica não foi reduzida significativamente em relação ao grupo tratado com E50 + veículo, apesar de ter sido observada uma redução de 61%. Spritzer et al. (1996) mostraram redução significativa dos níveis de PRL quando a BCP e o estradiol foram administrados durante os mesmos tempos e doses. Neste caso, entretanto, as ratas tinham desenvolvido hiperprolactinemia com o uso de estradiol. É possível que para demonstrar o efeito da BCP seja necessário um estado prévio de hiperprolactinemia. No presente trabalho, o tratamento com E50 por 2 semanas não foi suficiente para elevar os níveis de PRL acima dos valores do grupo controle, considerados normais. Como já referido anteriormente neste capítulo, esta dose representa um estímulo estrogênico fraco, que pode gerar respostas limítrofes. Desta forma, quando a mesma dose de BE foi utilizada durante um tempo maior, 4 semanas, o tratamento associado com BCP durante os últimos 12 dias reduziu significativamente os níveis de PRL sérica. Nestes animais, o estímulo estrogênico gerou hiperprolactinemia significativa e o tempo de tratamento com BCP foi aumentado de 5 para 12 dias.

Por outro lado, a associação de BCP (0,6 mg) à dose maior de BE (300µg/semana) diminuiu os níveis de PRL sérica em todos os tempos estudados. Além disso, o efeito da BCP associada ao tratamento prolongado com E300 foi dependente da dose, confirmando dados da literatura obtidos em outros modelos

experimentais e clínicos. Kacsóh et al. (1993) descreveram diminuição progressiva da PRL liberada por células hipofisárias em cultura, com a adição de doses crescentes de BCP. Uma única dose de BCP reduziu a concentração de PRL sérica, após 6 horas, em ratas F344 com tumor hipofisário induzido por estradiol (EGUCHI et al., 1995). Chen et al. (1993) demonstraram redução da liberação da PRL com a adição de BCP, em cultura primária de lactotrofos. O tratamento de mulheres hiperprolactinêmicas com BCP, durante 30 dias, reduziu a PRL sérica de 68 para 18 ng/ml (LOX & PAU, 1993). Mallman e Spritzer (1996) obtiveram redução dos níveis séricos de PRL em todas as mulheres hiperprolactinêmicas do estudo, no primeiro mes de tratamento com BCP.

A BCP administrada por 12 dias reduziu o peso da hipófise em todos os esquemas de tratamento estrogênico. Quanto ao percentual de lactotrofos, em trabalhos anteriores do laboratório observou-se que a BCP administrada nos últimos 5 dias de tratamento com E300/2 semanas não foi suficiente para diminuir este percentual (RIBEIRO et al., 1995). No presente trabalho, o tratamento com BCP durante 12 dias reduziu significativamente o percentual de lactotrofos tanto em ratas que receberam E300 durante 2 e 4 semanas, como nas tratadas durante 10 semanas. Estes resultados confirmam a necessidade de aumentar o tempo de tratamento com BCP para verificar alterações proliferativas nos lactotrofos, especialmente quando se utiliza estímulo curto com BE.

Kalberman et al. (1980) mostraram que a injeção de BCP reduziu o peso de tumores induzidos por estradiol, além de inibir a atividade da DNA polimerase e a incorporação de timidina triciada. Lloyd et al. (1975) demonstraram que a BCP antagoniza o efeito estrogênico sobre a atividade mitótica, a secreção de PRL, o peso

hipofisário e a PRL hipofisária. A BCP reduziu o peso da hipófise *in vivo* (LYLE et al., 1984; HANDA & RODRIGUEZ, 1991), a síntese de DNA na hipófise (KOMOLOV et al., 1985), o índice de mitoses (PAWLIKOWSKI et al., 1978; PÉREZ et al., 1986) e a liberação da PRL, *in vitro* (KACSÓH et al., 1993). A adição de BCP reverteu *in vitro* os efeitos do DES sobre a proliferação celular avaliados por análise do ciclo celular e por imunocitoquímica em células dissociadas (PHELPS & HYMER, 1988). McComb et al. (1986) descreveram que a administração de BCP promoveu uma redução reversível da proliferação espontânea de células imunorreativas à PRL, induzida pelo envelhecimento, em ratas de 23 meses. O presente trabalho, por sua vez, relata a redução no percentual de lactotrofos, obtida com a administração de BCP em ratas com hiperprolactinemia induzida pelo estradiol (RIBEIRO et al., 1996).

Existem dados contraditórios na literatura com relação à interação progesterona/estradiol na regulação da PRL, principalmente devido aos diferentes protocolos experimentais utilizados, doses empregadas, duração dos tratamentos, administração de estrogênio prévio ou não. Os progestogênios exercem atividade antiestrogênica através de diferentes mecanismos incluindo a redução de receptores estrogênicos nos tecidos-alvo em geral e na hipófise, em particular (ATTARDI, 1981; GOMPEL et al., 1985; BLAUSTEIN & BROWN, 1984). Outro mecanismo é o aumento da atividade da 17 β hidroxiesteróide desidrogenase que diminui a disponibilidade tecidual de estrogênio ativo via conversão do estradiol em estrona (GOMPEL et al., 1986, EL AYAT & MAHESH, 1984). A progesterona (P) pode agir de modo sinérgico ou antagônico ao estradiol na regulação da secreção de PRL. Alguns autores descrevem um aumento da liberação de PRL após tratamento com

progesterona, em animais sensibilizados com estradiol (BABU & VIJAYAN, 1984; CARÓN et al., 1994). Caligaris et al. (1974) referem que os níveis de PRL sérica aumentaram após 12 horas e diminuíram após 24 horas de tratamento com progesterona. Outros referem que o tratamento com progesterona bloqueia o aumento dos níveis de PRL sérica induzido por estradiol (GENAZZANI et al., 1990; BRANN et al., 1988). Várias linhas de evidências sugerem que a P não tem ação direta na hipófise, já que não foram localizados receptores de progesterona (PR) nos lactotrofos (FOX et al., 1990) e a P não tem efeito em alguns estudos *in vitro* (SHIMOKAWA et al., 1992). No entanto, outros autores demonstraram que a progesterona reverte o efeito estimulatório do estradiol na secreção de PRL, *in vivo* e *in vitro*, em ratas (REIER et al., 1974; CHEN & MEITES, 1970; HAUG & GAUTVIK, 1976; LAMBERTS et al., 1987), e em mulheres hiperprolactinêmicas (SITRUK-WARE et al., 1985). Giguère et al. (1982) observaram que a adição de um progestogênio puro, a promegestona (R5020), inibiu a liberação espontânea de PRL em cultura primária de células hipofisárias. Como já referido, o efeito hipofisário da P poderia ser exercido através da estimulação da 17 β hidroxisteroide desidrogenase (EL AYAT & MAHESH, 1984) ou redução dos receptores estrogênicos nos lactotrofos (SMANIK et al., 1983; BLAUSTEIN & BROWN, 1984). ATTARDI (1981) não encontrou ação da P sobre receptores estrogênicos na hipófise, enquanto Calderon et al. (1987) mostraram que a P suprimiu o aumento dos receptores estrogênicos dependendo das condições experimentais, inclusive o intervalo de tempo entre a administração de P e estradiol. A indução de PR em resposta ao tratamento estrogênico foi demonstrada na hipófise e hipotálamo mediobasal (Mac LUSKY & McEWEN, 1980; CALDERON et al., 1987). Por outro lado, a P regula

negativamente seus próprios receptores. Usando um antagonista da progesterona, van der Schoot et al. (1990) descreveram um aumento do peso da hipófise e da secreção de PRL induzidos pelo estradiol. A P pode ter efeitos estimulatórios e inibitórios nos TIDA. A injeção única de P suprimiu a atividade da tirosina hidroxilase, enquanto o tratamento crônico estimulou a atividade dessa enzima (BABU & VIJAYAN, 1984). A P aumenta a liberação de DA nos vasos porta (CRAMER et al., 1979a; HUANG et al., 1995) e reverte a redução da atividade e do mRNA da tirosina hidroxilase no núcleo arqueado, induzida por estradiol (ARBOGAST & VOOGT, 1993).

A associação de NA (0,5 mg) nos últimos 5 dias de tratamento com E50/2 semanas não alterou os níveis de PRL sérica, o peso da hipófise nem o percentual de lactotrofos em relação ao grupo tratado com E50 + veículo, possivelmente porque o estímulo estrogênico não foi suficiente para gerar hiperprolactinemia. Spritzer et al. (1995), utilizando doses diferentes de NA, demonstraram um efeito inibitório sobre a concentração de PRL sérica. Naquele caso, como já citado, o estímulo estrogênico foi capaz de gerar hiperprolactinemia. Por outro lado, quando o NA foi utilizado nos últimos 12 dias de tratamento em animais que receberam E50 por 4 semanas, observou-se uma redução parcial nos níveis de PRL sérica de 49% em relação aos animais que receberam E50 + veículo, sem significância estatística. É possível que a administração de NA por 12 dias em animais submetidos a estímulo estrogênico fraco (E50) diminua os PR de forma que não sejam observados efeitos significantes do progestogênio sobre a PRL sérica. Também deve ser considerado que o equilíbrio de doses entre BE e NA, como o que existe na relação fisiológica entre os níveis circulantes de estradiol e P, não foi alcançado com esse esquema de tratamento.

Assim, será importante no futuro realizar curvas de dose e de tempo/resposta mais amplas e/ou dosar os PR.

Um outro aspecto interessante do presente trabalho foram os resultados obtidos com a administração de NA nos últimos 12 dias de tratamento com BE na dose maior (E300), por 2 ou 4 semanas. Nesta situação, observou-se uma redução parcial dos níveis séricos de PRL, diminuição do peso hipofisário e do percentual de lactotrofos. Em estudos prévios realizados neste laboratório, a administração de NA por 5 dias em ratas tratadas com E300 durante 2 semanas, não havia alterado significativamente o percentual de lactotrofos (OLIVEIRA, 1993a). O conjunto destes dados sugere, portanto, que embora o efeito antiprolactinêmico seja evidente com apenas 5 dias de tratamento com NA em ratas que receberam E300, é preciso um período maior de tratamento (12 dias) para que se observe uma resposta antiproliferativa do NA.

Os mecanismos através dos quais a P atua sobre a secreção de PRL não estão ainda bem esclarecidos. Alguns estudos sugerem que o efeito antiestrogênico possa ser o responsável pela inibição da função lactotrófica. Sitruk-Ware et al. (1985) descreveram que o tratamento com linestrenol promoveu uma redução dos níveis de PRL sérica em mulheres hiperprolactinêmicas devido a microadenomas hipofisários. Esses níveis de PRL sérica foram comparados com os de um grupo de mulheres normais em que não foram observadas variações nos níveis de PRL em resposta ao tratamento com este progestogênio. Esse fato seria justificado pelo aumento no número de receptores estrogênicos relacionado com a maior celularidade tumoral, tornando efetiva a ação antagonista do progestogênio sobre o efeito estimulatório do estradiol, como já demonstrado *in vitro* e *in vivo* (HAUG & GAUTVIK, 1976;

SMANIK et al., 1983). Em hipófises de mulheres normais, devido ao menor número de lactotrofos, a ação sensibilizadora do estrogênio é menos importante e o efeito inibitório do progestogênio pode não ocorrer. Mallman e Spritzer (1996) demonstraram em mulheres hiperprolactinêmicas tratadas com NA uma correlação positiva entre os níveis estrogênicos e a redução dos níveis de PRL sérica com este tratamento, sugerindo que o efeito antiprolactinêmico do NA deve estar relacionado com sua ação antiestrogênica.

No que se refere aos efeitos do NA associado ao tratamento prolongado com E300, dados obtidos anteriormente neste laboratório (Oliveira et al., 1993) mostraram redução da PRL sérica, peso hipofisário e percentual de lactotrofos em ratas hiperprolactinêmicas. Naquele estudo foi utilizado NA na dose de 0,5 mg/dia, durante 12 dias. O efeito antagônico do NA observado sobre a secreção de PRL induzida por estradiol parece ter sido secundário à inibição do crescimento celular, já que houve redução tanto do peso da hipófise como do número de lactotrofos. No presente trabalho associou-se uma dose menor de NA ao tratamento prolongado com E300. O propósito da utilização desta dose de progestogênio era observar seu efeito isolado em ratas hiperprolactinêmicas e compará-lo ao efeito da sua associação com antiestrogênios. Considerando que as ações dos antiestrogênios são exercidas através de mecanismos diferentes, a associação desses fármacos poderia ter efeito aditivo. Oliveira (1993a) não encontrou efeito potencializador sobre a PRL sérica associando NA (0,5 mg) ao TAM ou à BCP. Ao avaliar o efeito do NA isolado, verificou-se que o efeito antiprolactinêmico foi significativo, apesar da baixa dose usada. Por outro lado, o peso da hipófise e o percentual de lactotrofos não foram alterados

significativamente com este tratamento, provavelmente por que a dose de 0,1 mg/dia não seja suficiente para exercer ação antiproliferativa.

Quando se associou NA (0,1 mg) e TAM (20 e 60 µg) ao tratamento prolongado com E300 observou-se ausência de alterações nos níveis de PRL sérica, bem como no peso da hipófise, em comparação com os grupos que receberam os fármacos isolados. Dados prévios do laboratório, utilizando ratas sob estímulo estrogênico menor (E50) por 2 semanas, haviam mostrado que a associação de NA (0,12 mg) ao TAM (60 µg) produz efeito aditivo sobre o crescimento uterino mas não sobre os níveis de PRL sérica, que diminuíram igualmente com o TAM isolado ou combinado ao NA (SPRITZER et al., 1995). A potencialização do efeito inibitório sobre o crescimento uterino pode estar relacionada com os diferentes mecanismos de ação do TAM e do NA. Como já citado anteriormente, o TAM tem afinidade pelo receptor estrogênico e atua como inibidor competitivo pela ligação a esse receptor. A P pode exercer efeitos antiestrogênicos diminuindo os receptores estrogênicos nos lactotrofos ou estimulando a atividade da 17βhidroxiesteróide desidrogenase, enzima responsável pela conversão do estradiol a um metabólito menos ativo, a estrona. Por outro lado, no presente trabalho, o tratamento combinado com NA e a dose menor de TAM promoveu uma redução no percentual de lactotrofos, o que, novamente, poderia ser explicado pelas diferenças dos mecanismos de ação antiestrogênica dos dois fármacos descritos acima. Estes resultados são preliminares e a investigação dos efeitos da associação desses fármacos deverá ser estendida com a utilização de outras combinações de doses.

Um outro aspecto que foi investigado em relação às interações de fármacos foi a combinação de TAM e BCP. Tumores hipofisários secretores de PRL possuem

receptores dopaminérgicos e são sensíveis à ação da dopamina e seus agonistas (CRONIN et al., 1980; BASSETTI et al., 1984). Utilizando células humanas de tumor hipofisário, Lamberts et al. (1986) demonstraram que o estradiol diminui a sensibilidade dessas células aos efeitos inibitórios da dopamina e que esse efeito estrogênico foi revertido pelo tamoxifeno. A administração de tamoxifeno a pacientes com prolactinomas aumentou o efeito inibitório da BCP sobre os níveis de PRL sérica (LAMBERTS et al., 1982; VÖLKER et al., 1982). Outros autores não encontraram sinergismo entre BCP e TAM tanto *in vivo* como *in vitro* (ARAFAH et al., 1983; PRYSOR-JONES et al., 1983; NAGY et al., 1980; de QUIJADA et al., 1980). A associação de BCP (0,6 mg) e tamoxifeno (120 µg) não produziu potencialização dos efeitos hipofisários estudados (OLIVEIRA, 1993a). No presente trabalho, foram utilizadas doses menores, tanto de BCP (0,05 mg) como de TAM (20 e 60 µg) e, da mesma forma, não foram encontrados efeitos dessas combinações tanto sobre os níveis de PRL sérica como sobre o peso da hipófise e percentual de lactotrofos. Em relação aos níveis séricos de PRL, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos houve uma tendência de inibição dos efeitos da BCP quando esta foi associada ao TAM. Neste caso (doses e modelo), o TAM poderia ter atuado como agonista do estradiol antagonizando o efeito da BCP. Como já referido neste capítulo, a atividade antidopaminérgica do estradiol está bem estabelecida. Bowman et al. (1983) demonstraram, em ratos, que o TAM pode ter atividade de agonista puro, agonista parcial e antagonista do estradiol, dependendo da dose utilizada. Estudos realizados *in vitro* mostraram que a atividade de agonista parcial foi bifásica; as concentrações mais altas de TAM mostraram maior atividade antagonista, em cultura de células GH4C1 (AMARA & DANNIES, 1986). Em experimentos realizados *in vivo* o TAM

agiu como agonista estrogênico parcial na indução de PRL hipofisária, em ratas (POWERS et al., 1989). Seria de interesse, para testar a hipótese de um efeito agonista parcial, a avaliação da atividade dopaminérgica dos TIDA em conjunto com a determinação dos efeitos do TAM sobre a proliferação e função lactotrófica.

Os dados do presente trabalho enfatizam a importância da interação estrogênio/antiestrogênio na expressão da hiperprolactinemia. Estudos posteriores poderão definir melhor a função dos antiestrogênios, os mecanismos moleculares através dos quais atuam em estados hiperprolactinêmicos e sua relação com a dopamina e seus agonistas, e/ou com os progestogênios. Além disso, o modelo experimental desenvolvido neste trabalho permite investigar mais profundamente as interações dos estrogênios com outros reguladores da secreção da PRL, como dopamina, progestogênios, e vários neurotransmissores e/ou neuromoduladores sabidamente importantes nessa regulação.

5. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos com os diferentes esquemas de tratamento estrogênico permitiram estabelecer duas condições de hiperprolactinemia: um estado de apenas hiperprolactinemia podendo ser considerada “funcional” e outro, com hiperprolactinemia acompanhada de aumento do peso hipofisário e proliferação de lactotrofos.

O protocolo experimental que utiliza 50 µg/semana de benzoato de estradiol, durante 4 semanas, seria o mais apropriado para o estudo das interações estradiol, dopamina e controle da secreção de PRL num estado de hiperprolactinemia “funcional”, visto que nesta situação observou-se aumento nos níveis de PRL sérica sem alterações proliferativas na hipófise.

O tratamento com injeções semanais de benzoato de estradiol na dose de 300 µg durante 2 semanas é suficiente para induzir aumento do peso hipofisário e do percentual de lactotrofos, sendo, portanto, adequado para estudar a hiperprolactinemia associada a alterações proliferativas na hipófise.

2. O efeito antiprolactinêmico e antiproliferativo da bromocriptina valida o modelo experimental, reproduzindo resultados esperados, conforme literatura, que descrevem classicamente o efeito inibitório da dopamina sobre a secreção de PRL.

3. Observou-se um efeito antiprolactinêmico parcial do acetato de noretisterona (0,5 mg) sob estímulo curto e intermediário com benzoato de estradiol. O efeito desse progestogênio sobre o peso da hipófise e sobre o percentual de lactotrofos só foi observado nesses períodos de estímulo estrogênico quando foi utilizada a dose mais elevada de BE (300µg/semana). O tratamento com uma dose mais baixa de NA (0,1 mg), associado ao tratamento prolongado com benzoato de estradiol 300µg/semana, reduziu a concentração de PRL sérica sem induzir alterações proliferativas.

4. As associações de TAM (20 ou 60 µg) e NA (0,1 mg) nos últimos 12 dias de tratamento prolongado com benzoato de estradiol (300µg/semana) não mostraram potencialização dos efeitos encontrados com a administração isolada desses fármacos sobre os níveis de PRL sérica e peso hipofisário. Quanto ao percentual de lactotrofos, houve sinergismo com a associação de NA e TAM, na dose de 20 µg, que induziu uma resposta antiproliferativa mais efetiva

5. As combinações de TAM (20 ou 60 µg) e BCP (0,05 mg), associadas ao benzoato de estradiol (300µg/semana) por 10 semanas, não mostraram alterações significativas tanto na PRL sérica como no peso hipofisário e no percentual de lactotrofos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H., ENGLER, D., MOLITCH, M.E., BOLLINGER-GRUBER, J., REICHLIN, S. Vasoactive Intestinal Peptide Is a Physiological Mediator of Prolactin Release in the Rat. **Endocrinology**, **122**: 1383-1390, 1985.
- ADLER, R.A. The Anterior Pituitary-Grafted Rat: A Valid Model of Chronic Hyperprolactinemia. **Endocrine Reviews**, **7**: 302-313, 1986.
- ALEXANDER, M. J. Estrogen-Regulated Synthesis of Neurotensin in Neurosecretory Cells of the Hypothalamic Arcuate Nucleus in the Female Rat. **Endocrinology**, **133**: 1809-1816, 1993.
- AMARA, J.F. & DANNIES, P.S. Characterization of antiestrogen stimulation of cell number and prolactin production. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **47**: 183-189, 1986.
- AMARA, J.F., ITALLIE, C.V., DANNIES, P.S. Regulation of Prolactin Production and Cell Growth by Estradiol: Difference in Sensitivity to Estradiol Occurs at Level of Messenger Ribonucleic Acid Accumulation. **Endocrinology**, **120**: 264-271, 1987.
- ANDRIES, M., TILEMANS, D., DENEFF, C. Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. **Biochemistry Journal**, **281**: 393-400, 1992.
- APUD, J., COCCHI, D., IULIANO, E., CASANUEVA, F., MÜLLER, E.E., RACAGNI, G. Determination of Dopamine in the Anterior Pituitary as an index of tuberoinfundibular dopaminergic function. **Brain Research**, **186**: 226-231, 1980.
- ARAFAH, B.M., WILHITE, B.L., RAINIERI, J., BRODKEY, J.S., PEARSON, O.H. Inhibitory Action of Bromocriptine and Tamoxifen on the Growth of Human Pituitary Tumors in Soft Agar. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **57**: 986-992, 1983.

- ARBOGAST, L.A., BEN-JONATHAN, N. The Preovulatory Prolactin Surge Is Prolonged by a Progesterone-Dependent Dopaminergic Mechanism. **Endocrinology**, **126**: 246-252, 1990.
- ARBOGAST, L.A. & VOOGT, J.L. Progesterone Reverses the Estradiol-Induced Decrease in Tyrosine Hydroxylase mRNA Levels in the Arcuate Nucleus. **Neuroendocrinology**, **58**: 501-510, 1993.
- AREY, B.J. & FREEMAN, M.E. Activity of Oxytocinergic Neurons in the Paraventricular Nucleus Mirrors the Periodicity of the Endogenous Stimulatory Rhythm Regulating Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **130**: 126-132, 1992.
- AREY, B.J. & FREEMAN, M.E. Activity of Vasoactive Intestinal Peptide and Serotonin in the Paraventricular Nucleus Reflects the Periodicity of the Endogenous Stimulatory Rhythm Regulating Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **131**: 736-742, 1992a.
- AREY, B.J., AVERILL, R.L.W., FREEMAN, M.E. A Sex-Specific Endogenous Stimulatory Rhythm Regulating Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **124**: 119-123, 1989.
- AREY, B.J., BURRIS, T.P., BASCO, P., FREEMAN, M.E. Infusion of Dopamine at Low Concentrations Stimulates the Release of Prolactin from α -Methyl-p-Tyrosine-Treated Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **203**: 60-63, 1993.
- ARITA, J., KOJIMA, Y., KIMURA, F. Changes in the Function of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons after Long-Term Estradiol Treatment in Fischer 344 Rats. **Neuroendocrinology**, **52**: 249-255, 1990.
- ARNAOUT, M.A., GARTHWAITE, T.L., MARTINSON, D.R., HAGEN, T.C. Vasoactive Intestinal Peptide Is Synthesized in Anterior Pituitary Tissue. **Endocrinology**, **119**: 2052-2057, 1986.
- ARONIN, N., COSLOVSKY, R., LEEMAN, S.E. Substance P and Neurotensin: Their Roles in the Regulation of Anterior Pituitary Function. **Annual Reviews of Physiology**, **48**: 537-549, 1986.
- ATTARDI, B. Facilitation and Inhibition of the Estrogen-Induced Luteinizing Hormone Surge in the Rat by Progesterone: Effects on Cytoplasmic and Nuclear Estrogen Receptors in the Hypothalamus-Preoptic Area, Pituitary and Uterus. **Endocrinology**, **108**: 1487-1496, 1981.
- ATTIA, M.A. Ovarian Steroids and Pituitary Functions in some Experimental Animals and in Man. **Reviews in Pure and Applied Pharmacological Sciences**, **1**: 327-341, 1980.

- BABU, G.N. & VIJAYAN, E. Hypothalamic Tyrosine Hydroxylase Activity and Plasma Gonadotropin and Prolactin levels in Ovariectomized-Steroid Treated Rats. **Brain Research Bulletin**, **12**: 555-558, 1984.
- BAKER, B.L., ESKIN, T.A., AUGUST, L.N. Direct Action of Synthetic Progestins on the Hypophysis. **Endocrinology**, **92**: 965-972, 1973.
- BASKIN, D.G., NORWOOD, B.J., SCHWARTZ, M.W., KOERNER, D.J. Estradiol Inhibits the Increase of Hypothalamic Neuropeptide Y Messenger Ribonucleic Acid Expression Induced by Weight Loss in Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, **136**: 5547-5554, 1995.
- BASSETI, M., SPADA, A., PEZZO, G., GIANNATTASIO, G. Bromocriptine Treatment Reduces the Cell size in Human Macroprolactinomas: A Morphometric Study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **58**: 268-273, 1984.
- BEN-JONATHAN, N. Dopamine: A Prolactin-Inhibiting Hormone. **Endocrine Reviews**, **6**: 564-589, 1985.
- BEN-JONATHAN, N., OLIVER, C., WEINER, H.J., MICAL, R., PORTER, J.C. Dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrus cycle and throughout pregnancy. **Endocrinology**, **100**: 452-458, 1977.
- BESSON, J., ROTSZTEJN, W., LABURTHE, M., EPEL-BAUM, J., BEAUDET, A., KORDON, C., ROSSELIN, G. Vasoactive Intestinal Peptide (VIP): Brain Distribution, Subcellular Localization and Effect of Deafferentation of the Hypothalamus in Male Rats. **Brain Research**, **165**: 79-85, 1979.
- BLAKE, C.A. Stimulation of Pituitary Prolactin and TSH Release in Lactating Proestrous Rats. **Endocrinology**, **94**: 503-508, 1974.
- BLAKE, C.A., WEINER, R.I., SAWYER, C.H. Pituitary Prolactin Secretion in Female Rats Made Persistently Estrous or Diestrous by Hypothalamic Deafferentation. **Endocrinology**, **90**: 862-866, 1972.
- BLAUSTEIN, J.D. & BROWN, T.J. Progesterone Decrease the Concentration of Hypothalamic and Anterior Pituitary Estrogen Receptors in Ovariectomized Rats. **Brain Research**, **304**: 225-236, 1984.
- BLOCH, G.J., ECKERSELL, C., MILLS, R. Distribution of galanin-immunoreactive cells within sexually dimorphic components of the medial preoptic area of the male and female rat. **Brain Research**, **620**: 259-268, 1993.
- BOOCKFOR, F.R. & FRAWLEY, L.S. Functional Variations among Prolactin Cells from Different Pituitary Regions. **Endocrinology**, **120**: 874-879, 1987.

- BOOCKFOR, F.R., HOEFLER, J.P., FRAWLEY, L.S. Cultures of GH3 Cells are Functionally Heterogeneous: Thyrotropin-Releasing Hormone, Estradiol and Cortisol Cause Reciprocal Shifts in the Proportions of Growth Hormone and Prolactin Secretors. **Endocrinology**, **117**: 418-420, 1985.
- BORGUNDAAG, B., KUDLOW, J.E., MUELLER, S.G., GEORGE, S.R. Dopamine Receptor Activation Inhibits Estrogen-Stimulated Transforming Growth Factor- α Gene Expression and Growth in Anterior Pituitary, but not in Uterus. **Endocrinology**, **130**: 3453-3458, 1992.
- BOWMAN, S.P., JONES, C.A., LEAKE, A., MORRIS, I.D. The biological activity a single dose of tamoxifen in the adult ovariectomized rat. **British Journal of Pharmacology**, **78**: 617-622, 1983.
- BRANN, D.W., RAO, I.M., MAHESH, V.B. Antagonism of Estrogen-Induced Prolactin Release by Progesterone. **Biology of Reproduction**, **39**: 1067-1073, 1988.
- BRESSION, D., BRANDI, A.M., PAGESY, P., Le DAFNIET, M., MARTINET, M., BRAILLY, S., MICHARD, M., PEILLON, F. *In Vitro* and *In Vivo* Antagonistic Regulation by Estradiol and Progesterone of the Rat Pituitary Domperidone Binding Sites: Correlation with Ovarian Steroid Regulation of the Dopaminergic Inhibition of Prolactin Secretion *in Vitro*. **Endocrinology**, **116**: 1905-1911, 1985.
- BURNS, G. AND SARKAR, D.K. Transforming Growth- β_1 -Like Immunoreactivity in the Pituitary Gland of the Rat: Effect of Estrogen. **Endocrinology**, **133**: 1444-1449, 1993.
- BURRIS, T.P. & FREEMAN, M.E. Low Concentrations of Dopamine Increase Cytosolic Calcium in Lactotrophs. **Endocrinology**, **133**: 63-68, 1993.
- BURRIS, T.P., NGUYEN, D.N., SMITH, S.G., FREEMAN, M.E. The Stimulatory and Inhibitory Effects of Dopamine on Prolactin Secretion Involve Different G-Proteins. **Endocrinology**, **130**: 926-932, 1992.
- CALDERON, J-J., MULDOON, T.G., MAHESH, V.B. Receptor-Mediated Interrelationships between Progesterone and Estradiol Action on the Anterior Pituitary-Hypothalamic Axis of the Ovariectomized Immature Rat. **Endocrinology**, **120**: 2428-2435, 1987.
- CALIGARIS, L. & TALEISNIK, S. Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, sex and daily rhythm. **Acta Endocrinologica**, **102**: 505-510, 1983.

- CALIGARIS, L., ASTRADA, J.J., TALEISNIK, S. Oestrogen and Progesterone influence on the Release of Prolactin in Ovariectomized Rats. **Journal of Endocrinology**, **60**: 205-215, 1974.
- CALLAHAN, P., JANIK, J., RABII, J. Time Course of the Insensitivity of Prolactin Release to Morphine Administration in the Lactating Female Rat. **Life Sciences**, **43**: 49-57, 1988.
- CANNON, M., HU, L., YE, J., LAWSON, D. Bioactivity of Plasma Prolactin in Ovariectomized, Diethylstilbestrol-Treated Long-Evans and Holtzman Rats after Thyrotropin-Releasing Hormone or Bromocriptine Administration. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **197**: 465-470, 1991.
- CANONACO, M., CARELLI, A., MAGGI, A. Steroid Hormones and Receptors of the GABA_A Supramolecular Complex. **Neuroendocrinology**, **57**: 974-984, 1993.
- CANONICO, P.L., VALDENEGRO, C.A., MacLEOD, R.M. The Inhibition of Phosphatidylinositol Turnover: A Possible Postreceptor Mechanism for the Prolactin Secretion-Inhibiting Effect of Dopamine. **Endocrinology**, **113**: 7-14, 1983.
- CARMELIET, P. & DENEFF, C. Immunocytochemical and Pharmacological Evidence for an Intrinsic Cholinomimetic System Modulating Prolactin and Growth Hormone Release in Rat Pituitary. **Endocrinology**, **123**: 1128-1139, 1988.
- CARÓN, R.W., SALICIONI, A.M., DEIS, R.P. Mifepristone Treatment Demonstrates the Participation of Adrenal Glucocorticoids in the Regulation of Oestrogen-induced Prolactin Secretion in Ovariectomized Rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, **48**: 385-389, 1994.
- CARRILLO, A.J., DOHERTY, P.C., GUAN, X., STURTEVANT, J.R., WALRO, D.G. Preferential Increase in Pituitary Prolactin *Versus* Vasoactive Intestinal Peptide as a Function of Estradiol Benzoate Dose in the Ovariectomized Rat. **Endocrinology**, **128**: 131-138, 1991.
- CARRILLO, A.J., DLUZEN, D.E. Ablation of the hypothalamic arcuate-median eminence region reduces the concentration of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary gland of male rats. **Brain Research**, **613**: 281-284, 1993.
- CASANUEVA, F., COCCHI, D., LOCATELLI, V., FLAUTO, C., ZAMBOTTI, F., BESTETTI, G., ROSSI, G.L., MÜLLER, E. Defective Central Nervous System Dopaminergic Function in Rats with Estrogen-Induced Pituitary Tumors, as Assessed by Plasma Prolactin Concentrations. **Endocrinology**, **110**: 590-599, 1982.
- CHAIDARUN, S.S., EGGO, M.C., STEWART, P.M., BARBER, P.C., SHEPPARD, M.C. Role of Growth Factors and Estrogen as Modulators of Growth, Differentiation,

- and Expression of Gonadotropin Subunit Genes in Primary Cultured Sheep Pituitary Cells. **Endocrinology**, **134**: 935-944, 1994.
- CHAOULOFF, F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. **Brain Research Reviews**, **18**: 1-32, 1993.
- CHEN, C., ZHANG, J., ISRAEL, J-M., CLARKE, I.J., VINCENT, J-D. Mechanism of the prolactin rebound after dopamine withdrawal in rat pituitary cells. **American Journal of Physiology**, **265** (Endocrinol. Metab., 28): E145-E152, 1993.
- CHEN, C.L. & MEITES, J. Effects of Estrogen and Progesterone on Serum and Pituitary Prolactin Levels in Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, **86**: 503-505, 1970.
- CHEN, C.L., AMENOMORI, Y., LU, K.H., VOOGT, J.L., MEITES, J. Serum Prolactin Levels in rats with Pituitary Transplants or Hypothalamic Lesions. **Neuroendocrinology**, **6**: 220-227, 1970.
- CHEN, Y.F. & RAMIREZ, V.D. Serotonin Stimulates Thyrotropin-Releasing Hormone Release from Superfused Rat Hypothalami. **Endocrinology**, **108**:2359-2366, 1981.
- CHIODINI, P., LIUZZI, A., COZZI, R., VERDE, G., OPIZZI, G., DALLABONZANA, D., SPELTA, B., SILVESTRINI, F., BORGHI, G., LUCCARELLI, G., RAINER, E., HOROWSKI, R. Size Reduction of Macroprolactinomas by Bromocriptine or Lisuride Treatment. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **53**: 737-743, 1983.
- CHIU, S., KOOS, R.D., WISE, P.M. Detection of Prolactin Receptor (PRL-R) mRNA in the Rat Hypothalamus and Pituitary Gland. **Endocrinology**, **130**: 1747-1752, 1992.
- CLARKE, C.L. & SUTHERLAND, R.L. Progestin Regulation of Cellular Proliferation. **Endocrine Reviews**, **11**: 266-301, 1990.
- CORENBLUM, B., TAYLOR, P.J. Idiopathic hyperprolactinemia may include a distinct entity with a natural history different from that of prolactin adenomas. **Fertility and Sterility**, **49**: 544-546, 1988.
- COUTINHO, L.M.B. Adenomas da hipófise: estudo imuno-histoquímico. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988.
- CRAMER, O.M., PARKER, Jr. C.R., PORTER, J.C. Estrogen Inhibition of Dopamine Release into Hypophysial Portal Blood. **Endocrinology**, **104**: 419-422, 1979.

- CRAMER, O.M., PARKER, Jr. C.R., PORTER, J.C. Stimulation of Dopamine Release into Hypophysial Portal Blood by Administration of Progesterone. **Endocrinology**, **105**: 929-933, 1979a.
- CRONIN, M.J., CHEUNG, C.Y., WILSON, C.B., JAFFE, R.B., WEINER, R.I. [³H]Spiperone Binding to Human Anterior Pituitaries and Pituitary Adenomas Secreting Prolactin, Growth Hormone, and Adrenocorticotrophic Hormone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **50**: 387-391, 1980.
- CRONIN, M.J., ROBERTS, J.M., WEINER, R.I. Dopamine and Dihydroergocryptine Binding to the Anterior Pituitary and Other Brain Areas of the Rat and Sheep. **Endocrinology**, **103**: 302-309, 1978.
- CROWLEY, W.R. Effects of Ovarian Hormones on Norepinephrine and Dopamine Turnover in Individual Hypothalamic and Extrahypothalamic Nuclei. **Neuroendocrinology**, **34**: 381-386, 1982.
- CRUMEYROLLE-ARIAS, M., LATOUCHE, J., JAMMES, H., DJIANE, J., KELLY, P.A., REYMOND, M.J., HAOUR, F. Prolactin Receptors in the Rat Hypothalamus: Autoradiographic Localization and Characterization. **Neuroendocrinology**, **57**: 457-466, 1993.
- CUNNAH, D. & BESSER, M. Management of prolactinomas. **Clinical Endocrinology**, **34**: 231-235, 1991.
- DANNIES, P.S. & RUDNICK, M.S. 2-Bromo- α -ergocryptine Causes Degradation of Prolactin in Primary Cultures of Rat Pituitary Cells after Chronic Treatment. **The Journal of Biological Chemistry**, **255**: 2776-2781, 1980.
- DAVIES, C., JACOBI, J., LLOYD, H.M., MEARES, J.D. DNA Synthesis and the Secretion of Prolactin and Growth Hormone by the Pituitary Gland of the Male Rat: Effects of Diethylstilboestrol and 2-Bromo- α -Ergocryptine Methanesulphonate. **Journal of Endocrinology**, **61**: 411-417, 1974.
- DAVIS, J.R.E., VIDAL, M.E., WILSON, E.M., SHEPPARD, M.C. Suppression of Prolactin Release and mRNA accumulation by two novel dopamine agonist agents. **Acta Endocrinologica (Copenh)**, **120**: 672-676, 1989.
- De CASTRO E SILVA, E.J., ANTUNES-RODRIGUES, J. Central Adrenoceptors and Basal Prolactin Release in the Rat. **Hormone and Metabolic Research**, **21**: 179-181, 1989.
- De GREEF, W.J. & VISSER, T.J. Evidence for the Involvement of Hypothalamic Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in Suckling-Induced Release of Prolactin. **Journal of Endocrinology**, **91**: 213-223, 1981.

- De GREEF, W.J., KLOOTWIJK, W., KARELS, B., VISSER, T.J. Levels of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in hypophysial stalk blood during oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. **Journal of Endocrinology**, **105**: 107-112, 1985.
- De GREEF, W.J., VOOGT, J.L., VISSER, T.J., LAMBERTS, S.W.J., van der SCHOOT, P. Control of Prolactin Release Induced by Suckling. **Endocrinology**, **121**: 316-322, 1987.
- De LÉAN, A., FERLAND, L., DROUIN, J., KELLY, P.A., LABRIE, F. Modulation of Pituitary Thyrotropin Releasing Hormone Receptor Levels by Estrogens and Thyroid Hormones. **Endocrinology**, **100**: 1496-1504, 1977.
- De QUIJADA, M., TIMMERMANS, H.A.T., LAMBERTS, W.J. Tamoxifen Suppresses Both the Growth of Prolactin-Secreting Pituitary Tumours and Normal Prolactin Synthesis in the rat **Journal of Endocrinology**, **86**: 109-116, 1980.
- DEIS, R.P., LEGUIZAMON, E., JAHN, G.A. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. **Journal of Endocrinology**, **120**: 37-43, 1989.
- DELITALA, G., DEVILLA, L., MUSSO, N.R. On the Role of Dopamine Receptors in the Naloxone-Induced Hormonal Changes in Man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **56**: 181-184, 1983.
- DEMAREST, K.T. & MOORE, K.E. Disruption of 5-Hydroxytryptaminergic Neuronal Function Blocks the Action of Morphine on Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons. **Life Sciences**, **28**: 1345-1351, 1981.
- DENEF, C. & ANDRIES, M. Evidence for Paracrine Interaction between Gonadotrophs and Lactotrophs in Pituitary Cell Aggregates. **Endocrinology**, **112**: 813-822, 1983.
- DESJARDINS, G.C., BRAWER, J.R., BEAUDET, A. Estradiol Is Selectively Neurotoxic to Hypothalamic β -Endorphin Neurons. **Endocrinology**, **132**: 86-93, 1993.
- DORSA, D.M., de KLOET, E.R., MEZEY, E., de WIED, D. Pituitary-Brain Transport of Neurotensin: Functional Significance of Retrograde Transport. **Endocrinology**, **104**: 1663-1666, 1979.
- EATON, M.J., GOPALAN, C., KIM, E. LOOKINGLAND, K.J., MOORE, K.E. Comparison of the effects of the dopamine D2 agonist quinolorane on tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity in male and female rats. **Brain Research**, **629**: 53-58, 1993.

- EGUCHI, K., KAWAMOTO, K., UOZUMI, T., ITO, A., ARITA, K., KURISU, K. In Vivo Effect of Cabergoline, a Dopamine Agonist, on Estrogen-Induced Rat Pituitary Tumors. **Endocrine Journal**, **42**: 153-161, 1995.
- EL AYAT, A.A.B. & MAHESH, V.B. Stimulation of 17 β -Hydroxy Steroid Dehydrogenase in the Rat Anterior Pituitary Gland by Progesterone. **Journal of Steroid Biochemistry**, **20**: 1141-1145, 1984.
- EL-AZOUZI, M., HSU, D.W., BLACK, P.M., JOLESZ, F., HEDLEY-WHYTE, E.T., KLIBANSKI, A., ZERVAS, N.T. The importance of dopamine in the pathogenesis of experimental prolactinomas. **Journal of Neurosurgery**, **72**: 273-281, 1990.
- ELIAS, K.A. & WEINER. Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **81**: 4549-4553, 1984.
- ELLERKMANN, E., NAGY, G.M., FRAWLEY, L.S. Rapid augmentation of Prolactin Cell Number and Secretory Capacity by an Estrogen-Induced Factor Released from the Neurointermediate Lobe. **Endocrinology**, **129**: 838-842, 1991.
- FAGIN, K.D. & NEILL, J.D. The Effect of Dopamine on Tyrotropin-Releasing Hormone-Induced Prolactin Secretion *In Vitro*. **Endocrinology**, **109**: 1835-1840, 1981.
- FERLAND, L., KLEDZIK, G.S., CUSAN, L., LABRIE, F. Evidence for a Role of Endorphins in Stress- and Suckling-Induced Prolactin Release in the Rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **12**: 267-272, 1978.
- FERLAND, L., LABRIE, F., EUVRARD, C., RAYNAUD, J-P. Antidopaminergic Activity of Estrogens on Prolactin Release at the Pituitary Level *In Vivo*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **14**: 199-204, 1979.
- FERLAND, L., LABRIE, F., KELLY, P.A., RAYMOND, V. Interactions between Hypothalamic and Peripheral Hormones in the Control of Prolactin Secretion. **Federation Proceedings**, **39**: 2917-2922, 1980.
- FINK, G. Oestrogen and Progesterone Interactions in the Control of Gonadotrophin and Prolactin Secretion. **Journal of Steroid Biochemistry**, **30**: 169-178, 1988.
- FORGET, H., PAINSON, J-C., DREWS, R.T., LAGACÉ, G., COLLU, R. MMQ cells: a model for evaluating the role of G proteins in the modulation of prolactin release. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **93**: 125-133, 1993.

- FOX, S.R., HARLAN, R.E., SHIVERS, B.D., PFAFF, D.W. Chemical Characterization of Neuroendocrine Targets for Progesterone in the Female Rat Brain and Pituitary. **Neuroendocrinology**, **51**: 276-283, 1990.
- FRANTZ, A.G., KLEINBERG, D.L., NOEL, G.L. Studies on Prolactin in Man. **Recent Progress in Hormone Research**, **28**: 527-590, 1972.
- FRAWLEY, L.S. & CLARK, C.L. Ovine Prolactin (PRL) and Dopamine Preferentially Inhibit PRL Release from the Same Subpopulation of Rat Mammotropes. **Endocrinology**, **119**: 1462-1466, 1986.
- GALA, R.R. The Physiology and Mechanisms of the Stress-Induced Changes in Prolactin Secretion in the Rat. **Life Sciences**, **46**: 1407-1420, 1990.
- GENAZZANI, A.R., PETRAGLIA, F., SILFERI, M., LATTESA, A.M., COUKOS, G., GENAZZANI, A.D., ARTINI, P., NAPPI, C., VOLPE, A. Progestins Modulate the Action of Estrogen on Gonadotropin-Release Hormone, Luteinizing Hormone and Prolactin in the rat. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, **29**: 197-202, 1990.
- GERSTEN, B.E. & BAKER, B.L. Local Action of Intrahypophyseal Implants of Estrogen as Revealed by Staining with Peroxidase-labeled Antibody. **American Journal of Anatomy**, **128**: 1-20, 1970.
- GIBBS, D.M. & NEILL, J.D. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. **Endocrinology**, **102**: 1895-1900, 1978.
- GIGUÈRE, V., MEUNIER, H., VEILLEUX, R., LABRIE, F. Direct Effects of Sex Steroids on Prolactin Release at the Anterior Pituitary Level: Interactions with Dopamine, Thyrotropin-Releasing Hormone, and Isobutylmethylxanthine. **Endocrinology**, **111**: 857-862, 1982.
- GILNA, P. & MARTIN, F. The Effect of Oestriol and Tamoxifen on Oestradiol Induced Prolactin Secretion in Anaesthetised Rats. **Acta Endocrinologica**, **112**: 71-78, 1986.
- GOMPEL, A., CHOMETTE, G., MALET, C., SPRITZER, P., PAVY, B., KUTTENN, F., MAUVAIS-JARVIS, P. Estradiol-Progestin Interaction In Normal Human Breast Cells In Culture. Ultrastructural Studies. **Breast Diseases-Senologia**, **1**: 149-156, 1985.
- GOMPEL, A., MALET, C., SPRITZER, P., LALARDRIE, J.P., KUTTENN, F., MAUVAIS-JARVIS, P. Progestin effect on cell proliferation and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human breast cells in culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **63**: 1174-1180, 1986.

- GOTTSCHALL, P.E., SARKAR, D.K., MEITES, J. Persistence of Low Hypothalamic Dopaminergic Activity after Removal of Chronic Estrogen Treatment. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**: 78-86, 1986.
- GRATTAN, D.R. & AVERILL, R.L.W. Intrahypothalamic Pituitary Grafts Elevate Prolactin in the Cerebrospinal Fluid and Attenuate Prolactin Release following Ether Stress. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **196**: 42-46, 1991.
- GRATTAN, D.R. & AVERILL, R.L.W. Absence of Short-loop Autoregulation of Prolactin During Late Pregnancy in the Rat. **Brain Research Bulletin**, **36**: 413-416, 1995.
- GROSVENOR, C.E. & MENA, F. Evidence that Thyrotropin Releasing Hormone and a Hypothalamic Prolactin- Releasing Factor May Function in the Release of Prolactin in the Lactating Rat. **Endocrinology**, **107**: 863-868, 1980.
- GUDELSKY, G.A. & PORTER, J.C. Release of Dopamine from Tuberoinfundibular Neurons into Pituitary Stalk Blood after Prolactin or Haloperidol Administration. **Endocrinology**, **106**: 526-529, 1980.
- GUDELSKY, G.A., NANSEL, D.D., PORTER, J.C. Role of Estrogen in the Dopaminergic Control of Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **108**: 440-444, 1981.
- GULINO, A & PASQUALINI, J.R. Modulation of tamoxifen-specific binding sites and estrogen receptors by estradiol and progesterone in the neonatal uterus of guinea pig. **Endocrinology**, **112**: 1871-1873, 1983.
- HAANWINCKEL, M.A., ANTUNES-RODRIGUES, J., de CASTRO E SILVA, E.J. Role of Central Beta-Adrenoceptors on Stress-Induced Prolactin Release Rats. **Hormone and Metabolic Research**, **23**: 318-320, 1991.
- HANDA, R.J. & RODRIGUEZ, E.W. A Characterization of Estrogen's Influence on Anterior Pituitary Androgen Receptor: Effect of Bromocriptine Treatment. **Neuroendocrinology**, **53**: 12-19, 1991.
- HARBUZ, M.S. & LIGHTMAN, S.L. Stress and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis: Acute, Chronic and immunological activation. **Journal of Endocrinology**, **134**: 327-339, 1992.
- HARMS, P.G., LANGLIER, P., McCANN, S.M. Modification of Stress-Induced Prolactin Release by Dexamethasone or Adrenalectomy. **Endocrinology**, **96**: 475-478, 1975.
- HASKINS, J.T., GUDELSKY, G.A., MOSS, R.L. PORTER, J.C. Iontophoresis of Morphine into the Arcuate Nucleus: Effects on Dopamine Concentrations in

- Hypophysial Portal Plasma and Serum Prolactin Concentrations. **Endocrinology**, **108**: 767-771, 1981.
- HAUG, E. & GAUTVIK, K.M. Effects of Sex Steroids on Prolactin Secreting Rat Pituitary Cells in Culture. **Endocrinology**, **99**: 1482-1489, 1976.
- HAUG, E. Progesterone Suppression of Estrogen-Stimulated Prolactin Secretion and Estrogen Receptor Levels in Rat Pituitary Cells. **Endocrinology**, **104**: 429-437, 1979.
- 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 Research**, **576**: 143-146, 1992.
- HORN, A.M. & FINK, G. Effects of 5-Hydroxytryptamine uptake blockers on the release of LH and Prolactin in several different experimental steroid models in the rat. **Journal of Endocrinology**, **104**: 397-406, 1985.
- HOUBEN, H., ANDRIES, M., DENEFF, C. Autoradiographic Demonstration of ¹²⁵I-Tyr⁴-Bombesin Binding Sites on Rat Anterior Pituitary Cells. **Peptides**, **15**: 1289-1295, 1994.
- HOYT, R.F. & TASHJIAN, A.H. Immunocytochemical Analysis of Prolactin Production by Monolayer Cultures of GH₃ Rat Anterior Pituitary Tumor Cells: 1. Long-Term Effects of Stimulation With Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH). **The Anatomical Record**, **197**: 153-162, 1980.
- HSU, D.W., EL-AZOUZI, M., BLACK, P.M., CHIN, W.W., HEDLEY-WHYTE, E.T., KAPLAN, L.M. Estrogen increase Galanin Immunoreactivity in Hyperplastic Prolactin-Secreting Cells in Fisher 344 Rats. **Endocrinology**, **126**: 3159-3167, 1990.
- HSU, S.M., RAINE, L., FRANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, **75**: 734-738, 1981.
- HU, L. & LAWSON, D. Distribution of Lactotroph Subpopulations in Different Regions of the Rat Pituitary. **Life Sciences**, **55**: 1553-1559, 1994.
- HUANG, S-W., TSAI, S-C., TUNG, Y-F., WANG, P.S. Role of Progesterone in Regulating the Effect of Estradiol on the Secretion of Thyrotropin-Releasing Hormone and Dopamine into Hypophysial Portal Blood in Ovariectomized Rats. **Neuroendocrinology**, **61**: 536-541, 1995.

- HYDE, J.F. & BEN-JONATHAN, N. Characterization of Prolactin-Releasing Factor in the Rat Posterior Pituitary. **Endocrinology**, **122**: 2533-2539, 1988.
- HYDE, J.P., MURAI, I., BEN-JONATHAN, N. The Rat Posterior Pituitary Contains a Potent Prolactin-Releasing Factor: Studies with Perfused Anterior Pituitary Cells. **Endocrinology**, **121**: 1531-1539, 1987.
- IBRAHIM, S.N., MOUSSA, S.M., CHILDS, G.V. Morphometric Studies of Rat Anterior Pituitary Cells after Gonadectomy: Correlation of Changes in Gonadotropes with the Serum Levels of Gonadotropins. **Endocrinology**, **119**: 629-637, 1986.
- JACKSON, M.D. Thyrotropin-Releasing Hormone. **The New England Journal of Medicine**, **306**: 145-155, 1982.
- JACKSON, N., WILDER, R., LAWSON, D. Reduction on Plasma Prolactin by Acute Administration of CB-154 in Ovariectomized F344 and Holtzman Rats Treated with Diethylstilbestrol: A Comparison of RIA and Nb₂ Lymphoma Bioassay. **Life Sciences**, **53**: 1273-1278, 1993.
- JACOBI, J. & LLOYD, H.M. Modulation by Dopamine Antagonists of DNA Synthesis in the Pituitary Gland of the Male Rat. **Neuroendocrinology**, **33**: 97-100, 1981.
- JACOBI, J., LLOYD, H.M., MEARES, J.D. Onset of oestrogen-induced prolactin secretion and DNA synthesis by the rat pituitary gland. **Journal of Endocrinology**, **72**: 35-39, 1977.
- JACOBS, L.S., SNYDER, P.J., WILBER, J.F., UTIGER, R.D., DAUGHADAY, W.H. Increased Serum Prolactin after Administration of Synthetic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) in Man. **Journal of Clinical Endocrinology**, **33**: 996-998, 1971.
- JAHN, G.A., DEIS, R.P. Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. **Journal of Endocrinology**, **110**: 423-428, 1986.
- JAQUET, P. Medical therapy of prolactinomas. **Acta Endocrinologica**, **129**: 31-33, 1993.
- JOHNSON, M.D. & CROWLEY, W.R. Acute Effects of Estradiol on Circulating Luteinizing Hormone and Prolactin Concentrations and on Serotonin Turnover in Individual Brain Nuclei. **Endocrinology**, **113**: 1935-1941, 1983.
- JOHNSTON, C.A. & NEGRO-VILAR, A. Maturation of the Prolactin and Proopiomelanocortin-Derived Peptide Responses to Ether Stress and Morphine: Neurochemical Analysis. **Endocrinology**, **118**: 797-804, 1986.

- JOHNSTON, C.A. & NEGRO-VILAR, A. Role of Oxytocin on Prolactin Secretion during Proestrus and in Different Physiological or Pharmacological Paradigms. **Endocrinology**, **122**:341-350, 1988.
- JOHNSTON, C.A., FAGIN, K.D., ALPER, R.H., NEGRO-VILAR, A. Prolactin Release after 5-Hydroxytryptophan Treatment Requires an Intact Neurointermediate Pituitary Lobe. **Endocrinology**, **118**: 805-810, 1986.
- JONES, T.H., BROWN, B.L., DOBSON, P.R.M. Paracrine Control of Anterior Pituitary Hormone Secretion. **Journal of Endocrinology**, **127**: 5-13, 1990.
- JORDAN, V.C. & KOERNER, S. Tamoxifen as an Anti-Tumour Agent: Role of Oestradiol and Prolactin. **Journal of Endocrinology**, **68**: 305-311, 1976.
- JORGENSEN, H., KNIGGE, U., WARBERG, J. Effect of Serotonin 5HT₁, 5HT₂, and 5HT₃ Receptor Antagonists on the Prolactin Response to Restraint and Ether Stress. **Neuroendocrinology**, **56**: 371-377, 1992.
- JORGENSEN, H., KNIGGE, U., WARBERG, J. Effect of Seletive Serotonin Receptor Agonists on Prolactin Secretion in Male Rats. **Neuroendocrinology**, **57**: 401-407, 1993.
- KACSÓH, B., TÓTH, B.E., AVERY, L.M., GROSVENOR, C.E. In vitro control of Prolactin (PRL) and Growth Hormone secretion of neonatal rat pituitary glands: Effects of ovine PRL, Salmon Calcitonin, Endothelin-3, Angiotensin II, Bromocryptine and Somatostatin. **Life Sciences**, **52**: 259-269, 1993.
- KADOWAKI, J., KU, N., OETTING, W.S., WALKER, A.M. Mammothroph Autoregulation: Uptake of Secreted Prolactin and Inhibition of Secretion. **Endocrinology**, **114**: 2060-2067, 1984.
- KAJI, H., CHIHARA, K., ABE, H., KITA, T., KASHIO, Y., OKIMURA, Y., FUJITA, T. Effect of Passive Immunization with Antisera to Vasoactive Intestinal Polypeptide and Peptide Histidine Isoleucine Amide on 5-Hydroxy-L-Tryptophan-Induced Prolactin Release in Rats. **Endocrinology**, **117**: 1914-1919, 1985.
- KAJI, H., CHIHARA, K., KITA, T., KASHIO, Y., OKIMURA, Y., FUJITA, T. Administration of Antisera to Vasoactive Intestinal Polypeptide and Peptide Histidine Isoleucine Attenuates Ether-Induced Prolactin Secretion in Rats. **Neuroendocrinology**, **41**: 529-531, 1985a.
- KALBERMANN, L.E., MACHIAVELLI, G.A., DE NICOLA, A.F., WEISSENBERG, L.S., BURDMAN, J.A. Synthesis of DNA in Oestrogen-Induced Pituitary Tumours in Rats: Effect of Bromocriptine. **Journal of Endocrinology**, **87**: 221-224, 1980.

- KANEMATSU, S. & SAWYER, C.H. Elevation of plasma prolactin after hypophysial stalk section in the rat. **Endocrinology**, **93**: 238-241, 1973.
- KANYICSKA, B., LIVINGSTONE, J.D., FREEMAN, M.E. Long Term Exposure to Dopamine Reverses the Inhibitory Effect of Endothelin-1 on Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **136**: 990-994, 1995.
- KAPP, R. & FOX, J.L. Responses of the Anterior Pituitary of ovariectomized rats to Oestradiol-17 β administration. **Acta Endocrinologica**, **96**: 175-181, 1981.
- KATO, Y., IWASAKI, Y., IWASAKI, J., ABE, H., YANAIHARA, N., IMURA, H. Prolactin Release by Vasoactive Intestinal Peptide in Rats. **Endocrinology**, **103**: 554-558, 1978.
- KEHOE, L., PARMAN, R., JANIK, J., CALLAHAN, P. Opiate Receptor Subtype Involvement in the Stimulation of Prolactin Release by β -Endorphin in Female Rats. **Neuroendocrinology**, **57**: 875-883, 1993.
- KHORRAM, O., de CASTRO, J.C.B., McCANN, S.M. Physiological Role of α -Melanocyte-Stimulating Hormone in Modulating the Secretion of Prolactin and Luteinizing Hormone in the Female Rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **81**: 8004-8008, 1984.
- KINEMAN, R.D., GETTYS, T.W., FRAWLEY, L.S. Paradoxical Effects of Dopamine (DA): G $_{i\alpha 3}$ Mediates DA Inhibition of PRL Release While Masking Its PRL-Releasing Activity. **Endocrinology**, **135**: 790-793, 1994.
- KING, T.S., STEGER, R.W., MORGAN, W.W. Effect of Hypophysectomy and Subsequent Prolactin Administration on Hypothalamic 5-Hydroxytryptamine Synthesis in Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, **116**: 485-491, 1985.
- KJOER, A., KNIGGE, U., VILHARDT, H., WARBERG, J. Involvement of Vasopressin in Histamine- and Stress-Induced Prolactin Release: Permissive, Mediating or Potentiating Role? **Neuroendocrinology**, **57**: 314-321, 1993.
- KOENIG, J.I., MAYFIELD, M.A., McCANN, S.M., KRULICH, L. Stimulation of Prolactin Secretion by Morphine: Role of the Central Serotonergic System. **Life Sciences**, **25**: 853-864, 1979.
- KOMOLOV, I.S., FEDOTOV, V.P., RAPPAY, G., FAZEKAS, I., GUDOSHNIKOV, V.I., BÁCZY, E. **Histochemistry**, **82**: 457-500, 1985.
- KRULICH, L., HEFCO, E., ILLNER, P., READ, C.B. The Effects of Acute Stress on the Secretion of LH, FSH, Prolactin and GH in the Normal Male Rat, with Comments on Their Statistical Evaluation. **Neuroendocrinology**, **16**: 293-311, 1974.

- KUTTENN, F., SPRITZER, P., MALET, C., GOMPEL, A., MAUVAIS-JARVIS, P. In: Courtois, Y., Forette, B., Kuole, P. (eds.). **Modern Trends in Aging Research**. Ed. John Libbey Eurotex Lin London, 101-108, 1986.
- LAFUENTE, A., MARCÓ, J., ESQUIFINO, A.I. Pulsatile prolactin secretory patterns throughout the oestrous cycle in the rat. **Journal of Endocrinology**, **137**: 43-47, 1993.
- LAMBERTS, S.W.J. & MacLEOD, R.M. The Interaction of the Serotonergic and Dopaminergic Systems on Prolactin Secretion in the Rat. **Endocrinology**, **103**: 287-295, 1978.
- LAMBERTS, S.W.J. & MacLEOD, R.M. Regulation of Prolactin Secretion at the Level of the Lactotroph. **Physiological Reviews**, **70**: 279-318, 1990.
- LAMBERTS, S.W.J., van KOETSVELD, P., VERLEUN, T. Prolactin Release-Inhibitory Effects of Progesterone, Megestrol Acetate, and Mifepristone (RU 38486) by Cultured Rat Pituitary Tumor Cells. **Cancer Research**, **47**: 3667-3671, 1987.
- LAMBERTS, S.W.J., VERLEUN, T., HOFLAND, L., OOSTEROM, R. Effect of Tamoxifen Administration on Prolactin Release by Invasive Prolactin-Secreting Pituitary Adenomas. **Neuroendocrinology**, **34**: 339-342, 1982.
- LAMBERTS, S.W.J., VERLEUN, T., HOFLAND, L., OOSTEROM, R. Differences in the Interaction between Dopamine and Estradiol on Prolactin Release by Cultured Normal and Tumorous Human Pituitary Cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **63**: 1342-1347, 1986.
- LAUDON, M., GROSSMAN, D.A., BEN-JONATHAN, N. Prolactin-Releasing Factor: Cellular Origin in the Intermediate Lobe of the Pituitary. **Endocrinology**, **126**: 3185-3192, 1990.
- LAWSON, D. & PARKER, P. The Effects of Estradiol on Pituitary Responsiveness to Dopamine in vitro: A Comparison of ovariectomized Fischer 344 and Holtzman Rats. **Life Sciences**, **50**: 235-243, 1992.
- LAWSON, D.M. & GALA, R.R. The Influence of Pharmacological Manipulation of Serotonergic and Dopaminergic Mechanisms on Plasma Prolactin in Ovariectomized, Estrogen-Treated Rats. **Endocrinology**, **102**: 973-981, 1978.
- LAWSON, D.M., HAISENLEDER, D.J., MARSHALL, J.C. A Comparison of the Temporal Effects of Estradiol and Diethylstilbestrol on Pituitary content of DNA, Prolactin mRNA and Prolactin and on serum Prolactin Levels in Ovariectomized Holtzman Rats. **Life Sciences**, **53**: 1267-1272, 1993.

- Le DAFNIET, M., BRANDI, A.M., BRESSION, D., RACADOT, T., PEILLON, F. Evidence of Receptors for Thyrotropin-Releasing Hormone in Human Prolactin-Secreting Adenomas. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **57**: 425-427, 1983.
- LEVY, A.D., LI, Q., RITTENHOUSE, P.A., VAN DE KAR, L.D. Investigation of the Role of 5-HT₃ Receptors in the Secretion of Prolactin, ACTH and Renin. **Neuroendocrinology**, **58**: 65-70, 1993.
- LIEBERMAN, M.E., JORDAN, V.C., FRITSCH, M., SANTOS, M.A., GORSKI, J. Direct and Reversible Inhibition of Estradiol-stimulated Prolactin Synthesis by Antiestrogens *in Vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, **258**: 4734-4740, 1983.
- LIEBERMAN, M.E., MAURER, R.A., GORSKI, J. Estrogen control of prolactin synthesis *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **75**: 5946-5949, 1978.
- LIN, C.L. & BUTTLE, H.L. Effect of Oestradiol benzoate and tamoxifen on the growth of and induction of progesterone receptors in the uterus and mammary gland of immature pigs. **Journal of Endocrinology**, **130**: 259-265, 1991.
- LINDLEY, S.E., GUNNET, J.W., LOOKINGLAND, K.J., MOORE, K.E. Effects of Alterations in the Activity of Tuberohypophysial Dopaminergic Neurons on the Secretion of α -Melanocyte Stimulating Hormone. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **188**: 282-286, 1988.
- LLOYD, H.M., MEARES, J.D., JACOBI, J. Effects of oestrogen and bromocryptine on *in vivo* secretion and mitosis in prolactin cells. **Nature**, **255**: 497-498, 1975
- LLOYD, R.V. & LANDEFELD, T.D. Detection of Prolactin Messenger RNA in Rat Anterior Pituitary by *In situ* Hybridization. **American Journal of Pathology**, **125**: 35-44, 1986.
- LLOYD, R.V. Estrogen-Induced Hyperplasia and Neoplasia in the Rat Anterior Pituitary Gland. An immunohistochemical Study. **American Journal of Pathology**, **113**: 198-206, 1983.
- LOCATELLI, V., COCCHI, D., FRIGERIO, C., BETTI, R., KROGSGAARD-LARSEN, P., RACAGNI, G., MÜLLER, E.E. Dual γ -Aminobutyric Acid Control of Prolactin Secretion in the Rat. **Endocrinology**, **105**: 778-785, 1979.
- LOX, C.D. & PAU, K.-Y.F. Beta-Endorphin Levels in Women with Elevated Prolactin and followig Bromocryptine Therapy. **General Pharmacology**, **24**: 1231-1233, 1993.

- LU, K-H, KOCH, Y., MEITES, J. Direct Inhibition by Ergocornine of Pituitary Prolactin Release. **Endocrinology**, **89**: 229-233, 1971.
- LUX-LANTOS, V., REY, E., LIBERTUN, C. Activation of GABA B Receptors in the Anterior Pituitary Inhibits Prolactin and Luteinizing Hormone Secretion. **Neuroendocrinology**, **56**: 687-693, 1992.
- LUX-SANTOS, V., SOMOZA, G., REY, E., LIBERTUN, C. β -(4-Chlorophenyl) GABA (Baclofen) Inhibits Prolactin and Thyrotropin Release by Acting on the Rat Brain (42431). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **183**: 358-362, 1986.
- LUX-SANTOS, V., SOMOZA, G., REY, E., LIBERTUN, C. Further Evidence for the Inhibition Action of Baclofen on a Prolactin-Releasing Factor. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **197**: 337-341, 1991.
- LYLE, S.F., WRIGHT, K., COLLINS, D.C. Comparative Effects of Tamoxifen and Bromocriptine on Prolactin and Pituitary Weight in Estradiol-Treated Male Rats. **Cancer**, **53**: 1473-1477, 1984.
- MacLUSKY, N.J. & McEWEN, B.S. Progesterin Receptors in Rat Brain: Distribution and Properties of Cytoplasmic Progesterin-Binding Sites. **Endocrinology**, **106**: 192-202, 1980.
- MAI, L.M., SHIEH, K.R., PAN, J.T. Circadian changes of serum Prolactin levels and tuberoinfundibular dopaminergic neuron activities in Ovariectomized rats with or without estrogen: the role of the suprachiasmatic nuclei. **Neuroendocrinology**, **60**: 520-526, 1994.
- MALLMANN, E.S. & SPRITZER, P.M. Progesterin Effect On Prolactin Secretion in Hyperprolactinaemic Women. **Medical Science Research**, **24**: 417-420, 1996.
- MANZANARES, J., WAGNER, E.J., MOORE, K.E., LOOKINGLAND, K.J. Kappa Opioid Receptor-mediated Regulation of Prolactin and α -Melanocyte-Stimulating Hormone Secretion in Male and Female Rats. **Life Sciences**, **53**: 795-801, 1993.
- MARTIN, M.C., WEINER, R.I., MONROE, S.E., ROBERTS, J.M., LICKO, V., JAFFE, R.B. Prolactin-Secreting Adenomas in Women. VII. Dopamine Regulation of Prolactin Secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **59**: 485-490, 1984.
- MARTINEZ-CAMPOS, A., AMARA, J.F., DANNIES, P.S. Antiestrogens are Partial Estrogen Agonists for Prolactin Production in Primary Pituitary Cultures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **48**: 127-133, 1986.

- MATSUSHITA, N., KATO, Y., SHIMATSU, A., KATAMI, H., YANAIHARA, N., IMURA, H. Effects of VIP, TRH, GABA and Dopamine on Prolactin Release from Superfused Rat Anterior Pituitary Cells. **Life Sciences**, **32**: 1263-1269, 1983.
- MAURER, R.A. & GORSKI, J. Effects of Estradiol-17 β and Pimozide on Prolactin Synthesis in Male and Female Rats. **Endocrinology**, **101**: 76-84, 1977.
- MAURER, R.A. Dopaminergic Inhibition of Prolactin Synthesis and Prolactin Messenger RNA Accumulation in Cultured Pituitary Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, **255**: 8092-8097, 1980.
- MAURER, R.A. Relationship between Estradiol, Ergocryptine, and Thyroid Hormone: Effects on Prolactin Synthesis and Prolactin Messenger Ribonucleic Acid Levels. **Endocrinology**, **110**: 1515-1519, 1982.
- MAURER, R.A. Estradiol Regulates the Transcription of the Prolactin Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, **257**: 2133-2136, 1982a.
- MAURER, R.A., KIM, K.E., DAY, R.N., NOTIDES, A.C. Regulation of Prolactin Gene Expression by Estradiol. **Molecular Endocrinology and Steroid Hormone Action**, **322**: 159-169, 1990.
- McCOMB, D.J., THORNER, M.O., EVANS, W.S., KOVACS, K. Morphologic Effects of Bromocriptine on Spontaneously Occurring Pituitary Prolactin-Cell Hyperplasia in Old Long-Evans Rats. **American Journal of Pathology**, **122**: 7-16, 1986
- MENA, F., CLAPP, C., AGUAYO, D., MORALES, M.T., GROSVENOR, C.E., ESCALERA, G.M. Regulation of Prolactin Secretion by Dopamine and Thyrotropin-Release Hormone in Lactating Rat Adenohypophyses: Influence of Intracellular Age of the Hormone. **Endocrinology**, **125**: 1814-1820, 1989.
- MENA, F., ENJALBERT, A., CARBONELL, L., PRIAM, M., KORDAN, C. Effect of Suckling on Plasma Prolactin and hypothalamic Monoamine Levels in the Rat. **Endocrinology**, **99**: 445-451, 1976.
- MERCHENTHALER, I., LENNARD, D.E., CIANCHETTA, P., MERCHENTHALER, A., BRONSTEIN, D. Induction of Proenkephalin in Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons by Hyperprolactinemia: The Role of Sex Steroids. **Endocrinology**, **136**: 2442-2450, 1995.
- MEZEY, E., PALKOVITS, M., de KLOET, E.R. Evidence for Pituitary-Brain Transport of a Behaviorally Potent ACTH Analog. **Life Sciences**, **22**: 831-838, 1978.
- MICHELS, K.M., LEE, W., SELTZER, A., SAAVEDRA, J.M., BONDY, C.A. Up-Regulation of Pituitary [¹²⁵I]Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) Binding and IGF

- Binding Protein-2 and IGF-I Gene Expression by Estrogen. **Endocrinology**, **132**: 23-29, 1993.
- MILENKOVIC, L., BOGIC, L., MARTINOVIC, J.V. Effects of oestradiol and progesterone on stress-induced secretion of prolactin in ovariectomized and/or adrenalectomized female rats. **Acta Endocrinologica**, **112**: 79-82, 1986.
- MINAMITANI, N., MINAMITANI, T., LECHAN, R.M., BOLLINGER-GRUBER, J., REICHLIN, S. Paraventricular Nucleus Mediates Prolactin Secretory Responses to Restraint Stress, Ether Stress, and 5-Hydroxy-L- Tryptophan Injection in the Rat. **Endocrinology**, **120**: 860-867, 1987.
- MIODUSZEWSKI, R., GRANDISON, L., MEITES, J. Stimulation of Prolactin Release in Rats by GABA. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **151**: 44-46, 1976.
- MISSALE, C., BORONI, F., LOSA, M., GIOVANELLI, M., ZANELLATO, A., TOSO, R.D., BALSARI, A., SPANO, P. Nerve growth factor suppresses the transforming phenotype of human prolactinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **90**: 7961-7965, 1993.
- MOREL, G., OUHTIT, A., KELLY, P.A. Prolactin Receptor Immunoreactivity in Rat Anterior Pituitary. **Neuroendocrinology**, **59**: 78-84, 1994.
- MORGAN, W.W., STEGER, R.W., SMITH, M.S., BARTKE, A., SWEENEY, C.A. Time Course of Induction of Prolactin-Secreting Pituitary Tumors with Diethylstilbestrol in Male Rats: Response of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons. **Endocrinology**, **116**: 17-24, 1985.
- MORI, M., VIGH, S., MIYATA, A., YOSHIHARA, T., OKA, S., ARIMURA, A. Oxytocin Is the Major Prolactin Releasing Factor in the Posterior Pituitary. **Endocrinology**, **126**: 1009-1013, 1990.
- MOUIHATE, A. & LESTAGE, J. Estrogen increase the release of epidermal growth factor from individual pituitary cells in female rats. **Journal of Endocrinology**, **146**: 495-500, 1995.
- MOY, J. & LAWSON, D. Temporal Effects of Estradiol and Diethylstilbestrol on Pituitary and Plasma Prolactin Levels in Ovariectomized Fischer 344 and Holtzman rats: A comparison of Radioimmunoassay and Nb₂ Lymphoma Cell Bioassay. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **200**: 507-513, 1992.

- MUCCIOLI, G. & DI CARLO, R. Modulation of prolactin receptors in the rat hypothalamus in response to changes in serum concentration of endogenous prolactin or to ovine prolactin administration. **Brain Research**, **663**: 244-250, 1994.
- MURAI, I. & BEN-JONATHAN, N. Posterior Pituitary Lobectomy Abolishes the Suckling-Induced Rise Prolactin (PRL): Evidence for a PRL-Releasing Factor in the Posterior Pituitary. **Endocrinology**, **121**: 205-211, 1987.
- MURAI, I. & BEN-JONATHAN, N. Prolactin Secretion in Posterior Pituitary Lobectomized Rats: Differential Effects of 5-Hydroxytryptophan and ether. **Brain Research**, **420**: 227-232, 1987a.
- MURAI, I. & BEN-JONATHAN, N. Acute Stimulation of Prolactin Release by Estradiol: Mediation by Posterior Pituitary. **Endocrinology**, **126**: 3179-3184, 1990.
- NAGY, G.M. & FRAWLEY, L.S. Suckling Increases the Proportions of Mammatropes Responsive to Various Prolactin-Releasing Stimuli. **Endocrinology**, **127**: 2079-2084, 1990.
- NAGY, G.M., BOOCKFOR, F.R., FRAWLEY, L.S. The Suckling Stimulus Increase the Responsiveness of Mammatropes Located Exclusively within the Central Region of the Adenohypophysis. **Endocrinology**, **128**: 761-764, 1991.
- NAGY, G.M., MULCHAHEY, J.J., NEILL, J.D. Autocrine Control of Prolactin Secretion by Vasoactive Intestinal Peptide. **Endocrinology**, **122**: 364-366, 1988.
- NAGY, I., VALDENEGRO, A., MAC LEOD, R.M. Effect of Antiestrogens on Pituitary Prolactin Production in Normal and Pituitary Tumor-Bearing Rats. **Neuroendocrinology**, **30**: 389-395, 1980.
- NAVARRO, C.E., OTOYA, R., DONOSO, A.O. Stimulation of H₃-Histamine Receptors Increase the Release of Prolactin in Male Rats. **Neuroendocrinology**, **57**: 654-657, 1993.
- 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.
- NOGAMI, H., YOSHIMURA, F., CARRILLO, A.J., SHARP, Z.D., SHERIDAN, P.J. Estrogen Induced Prolactin mRNA Accumulation in Adult Male Rat Pituitary as Revealed by *in situ* Hybridization. **Endocrinologia Japonica**, **32**: 625-634, 1985.
- NOHTOMI, A., ITOH, M., YUFU, N. Effects of sulpiride treatment on the level of Immunoreactive β -endorphin in rat hypothalamic nuclei. **Brain Research**, **300**: 152-156, 1984.

- OHTA, Y., SATO, T., IGUCHI, T. Immunocytochemical Localization of Progesterone Receptor in the Reproductive Tract of Adult Female Rats. **Biology of Reproduction**, **48**: 205-213, 1993.
- OLIVEIRA, M.C. Ações do Tamoxifen, Acetato de Noretisterona e Bromocriptina sobre a Morfologia e Função Lactotrófica de Hipófises de Ratas com Hiperprolactinemia Induzida pelo Estradiol. Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina da UFRGS, 1993a.
- OLIVEIRA, M.C., SPRITZER, P.M., CORONEL, A.X., DAHLEM, N., MORAES, J.T., BARBOSA-COUTINHO, L.M. Progestin Effects on Prolactin Secretion and on Immunoreactive Prolactin Cells in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats. **Hormone and Metabolic Research**, **25**: 600-602, 1993.
- OLIVER, C., MICAL, R.S., PORTER, J.C. Hypothalamic-Pituitary Vasculature: Evidence for Retrograde Blood Flow in the Pituitary Stalk. **Endocrinology**, **101**: 598-604, 1977.
- OSAMURA, R.Y., KOMATSU, N., IZUMI, S., YOSHIMURA, S., WATANABE, K. Ultrastructural Localization of Prolactin in the Rat Anterior Pituitary Glands by Preembedding Peroxidase-labeled Antibody Method: Observations in Normal, Castrated, or Estrogen-stimulated Specimen. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **30**: 919-925, 1982.
- OSAWA, H. & KUROSUMI, K. Morphofunctional study on prolactin-producing cells of the anterior pituitaries in adult male rats following thyroidectomy, thyroxine treatment and/or thyrotropin-releasing hormone treatment. **Cell & Tissue Research**, **272**: 41-47, 1993.
- PAPKA, R.E., YU, S.M., NIKITOVITEH-WINER. Use of Immunoperoxidase and immunogold labelling for Pituitary Hormone and Neuropeptides. **American Journal of Anatomy**, **175**: 289-306, 1986.
- PARKER, P. & LAWSON, D. Does Dopamine Inhibit or Stimulate Prolactin Release *In Vitro*? The Effects of Dopamine Concentration and Duration of *In Vivo* Estradiol Treatment. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **202**: 451-456, 1993.
- PARROTT, R.F., GOODE, J.A. Central effects of Naloxone and selected opioid agonists on cortisol and prolactin secretion in non-stressed sheep. **General Pharmacology**, **24**: 101-103, 1993.
- PASQUALINI, C., GUIBERT, B., LEVIEL, V. Short-Term Inhibitory Effect of Estradiol on Tyrosine Hydroxylase Activity in Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons *In Vitro*. **Journal of Neurochemistry**, **60**: 1707-1713, 1993.

- PAWLIKOWSKI, M., KUNERT-RADEK, J., STEPIEN, H. Direct Antiproliferative Effect of Dopamine Agonists on the Anterior Pituitary Gland in Organ Culture. **Journal of Endocrinology**, **79**: 245-246, 1978.
- PELLEGRINI, I., RASOLONJANAHARY, R., GUNZ, G., BERTRAND, P., DELIVET, S., JEDYNAK, C.P., KORDON, C., PEILLON, F., JAQUET, P., ENJALBERT, A. Resistance to Bromocriptine in Prolactinomas. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **69**: 500-509, 1989.
- PELLETIER, G., LECLERC, R., PUVIANI, R., POLAK, J.M. Electron Immunocytochemistry in Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) in the rat Brain. **Brain Research**, **210** 356-360, 1981.
- PÉREZ, R.L., MACHIAVELLI, G.A., ROMANO, M.I., BURDMAN, J.A. Prolactin Release, Oestrogens and proliferation of Prolactin-Secreting Cells in the Anterior Pituitary Gland of Adult Male Rats. **Journal of Endocrinology**, **108**: 399-403, 1986.
- PHELPS, C.J. & HYMER, W.C. Effects of bromocriptine on prolactin cellular hypertrophy, proliferation and secretory activity in diethylstilbestrol-induced pituitary tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **58**: 137-148, 1988.
- PHELPS, S.J., MOY, J.A., LAWSON, D.M. Temporal Dynamics of Pituitary Prolactin Depletion and Release in Three Strains of Rats. **Life Sciences**, **49**: 1965-1972, 1991.
- PILOTTE, N.S. & PORTER, J.C. Dopamine in Hypophysial Portal Plasma and Prolactin in Systemic of Rats Treated with 5-Hydroxytryptamine. **Endocrinology**, **108**: 2137-2141, 1981.
- PILOTTE, N.S., BURT, D.R., BARRACLOUGH, C.A. Ovarian Steroids Modulate the Release of Dopamine into Hypophysial Portal Blood and the Density of Anterior Pituitary [³H]Spiperone-Binding Sites in Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, **114**: 2306, 1984.
- PLOSKER, S.M., MARSHALL, L.A., MARTIN, M.C., JAFFE, R.B. Opioid, Catecholamine, and Steroid Interaction in Prolactin and Gonadotropin Regulation. **Obstetrical and Gynecological Survey**, **45**: 441-452, 1990.
- PLOTSKY, P.M. & NEILL, J.D. The Decrease in Hypothalamic Dopamine Secretion Induced by Suckling: Comparison of Voltammetric and Radioisotopic Methods of Measurement. **Endocrinology**, **110**: 691-696, 1982.
- POWERS, C.A., HATALA, M.A., PAGANO, P.J. Differential responses of pituitary kallikrein and prolactin to tamoxifen and chlorotrianisene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **66**: 93-100, 1989.

- PRYSOR-JONES, R.A. & JENKINS, J.S. Effect of Bromocriptine on DNA Synthesis, Growth and Hormone Secretion of Spontaneous Pituitary Tumours in the Rat. **Journal of Endocrinology**, **88**: 463-469, 1981.
- PRYSOR-JONES, R.A., SILVERLIGHT, J.J., JENKINS, J.S. Effect of Tamoxifen on Growth and Prolactin Secretion of Rat Pituitary Tumours. **Journal of Endocrinology**, **97**: 261-266, 1983.
- PRYSOR-JONES, R.A., SILVERLIGHT, J.J., KENNEDY, S.J., JENKINS, J.S. Vasoactive intestinal peptide and the stimulation of lactotroph growth by oestradiol in rats. **Journal of Endocrinology**, **116**: 259-265, 1988.
- RAKOFF, J.S. & YEN, S.S.C. Progesterone Induced Acute Release of Prolactin in Estrogen Primed Ovariectomized Women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **47**: 918-921, 1978.
- RAYMOND, V., BEAULIEU, M. LABRIE, F., BOISSIER, J. Potent Antidopaminergic Activity of Estradiol at the Pituitary Level on Prolactin Release. **Science**, **200**: 1173-1175, 1978.
- REIER, P.J., MORISHIGE, W.K., ROTHCHILD, I. The Effect of Ether and Laparotomy on Serum Prolactin Levels in Progesterone-Treated Intact and Ovariectomized Rats. **Neuroendocrinology**, **16**: 43-51, 1974.
- REIS, F.M., RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, A., GUERRA JR., R.M., REIS, A.M., COIMBRA, C.C. Blood Glucose and Prolactin in Hyperprolactinemic Rats Exposed to Restraint and Surgical Stress. **Life Sciences**, **58**: 155-161, 1996.
- REZNIKOV, A.G., McCANN, S.M. Effects of Neuropeptide Y on Gonadotropin and Prolactin Release in Normal, Castrated or Flutamide-Treated Male Rats. **Neuroendocrinology**, **57**: 1148-1154, 1993.
- RIBEIRO, M.F., SPRITZER, P.M., BARBOSA-COUTINHO, L.M., OLIVEIRA, M.C., PAVANATO, M.A., SILVA, I.S.B., REIS, F.M. Effects of Bromocriptine on Serum Prolactin levels, Pituitary Weight and Immunoreactive Prolactin Cells in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats: An Experimental Model of Estrogen-Dependent Hyperprolactinemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, *in press*, 1996.
- RIBEIRO, M.F., SPRITZER, P.M., OLIVEIRA, M.C., BARBOSA-COUTINHO, L.M., PAVANATO, M.A., SILVA, I.S.B. Effects of Bromocriptine on Serum Prolactin levels and Pituitary Immunoreactive Prolactin Cells in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats: A Fruitfull Experimental Model of Estrogen-Dependent Hyperprolactinemia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, **39**: 63, 1995.

- RICHARD, P., MOOS, F., FREUND-MERCIER, M-J. Central Effects of Oxytocin. **Physiological Reviews**, **71**: 331-370, 1991.
- RIEGLE, G.D. & MEITES, J. The Effect of Stress on Serum Prolactin in the Female Rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **152**: 441-448, 1976.
- RITTENHOUSE, P.A., LEVY, A.D., LI, Q., BETHEA, C.L., VAN de KAR, L.D. Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Mediate the Serotonergic Stimulation of Prolactin Secretion via 5-HT_{1c} /2 Receptors. **Endocrinology**, **133**: 661-667, 1993.
- RIVIER, C. & VALE, W. In Vivo Stimulation of Prolactin Secretion in the Rat by Thyrotropin Releasing Factor, Related Peptides and Hypothalamic Extracts. **Endocrinology**, **95**: 978-983, 1974.
- SAKUMA, S., SHIRASAWA, N., YOSHIMURA, F. A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophysial cells in immature and mature castrated rats. **Journal of Endocrinology**, **100**: 323-328, 1984.
- SAMSON, W.K., LUMPKIN, M.D., McCANN, S.M. Evidence for a Physiological Role for Oxytocin in the Control of Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **119**: 554-560, 1986.
- SAMSON, W.K., BIANCHI, R., MOGG, R.J., RIVIER, J., VALE, W., MELIN, P. Oxytocin Mediates the Hypothalamic Action of Vasoactive Intestinal Peptide to Stimulate Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **124**: 812-819, 1989.
- SAR, M. Estradiol Is Concentrated In Tyrosine Hydroxylase-Containing Neurons of the Hypothalamus. **Science**, **223**: 938-940, 1984.
- SARKAR, D.K. Evidence for Prolactin Feedback Actions on Hypothalamic Oxytocin, Vasoactive Intestinal Peptide and Dopamine Secretion. **Neuroendocrinology**, **49**: 520-524, 1989.
- SARKAR, D.K., GOTTSCHALL, P.E., MEITES, J. Damage to Hypothalamic Dopaminergic Neurons Is Associated with Development of Prolactin-Secreting Pituitary Tumors. **Science**, **218**: 684-686, 1982.
- SARKAR, D.K., GOTTSCHALL, P.E., MEITES, J. Decline of Tuberoinfundibular Dopaminergic Function Resulting from Chronic Hyperprolactinemia in Rats. **Endocrinology**, **115**: 1269-1274, 1984.
- SASSIN, J.F., FRANTZ, A.G., WEITZMAN, E.D., KAPEN, S. Human Prolactin: 24-Hour Pattern with Increased Release during Sleep. **Science**, **177**: 1205-1207, 1972.

- SCHECHTER, J.E., PATTISON, A., PATTISON, T. Developmental of the Vasculature of the Anterior Pituitary: Ontogeny of Basic Fibroblast Growth Factor. **Devolpmental Dynamics**, **197**: 81-93, 1993.
- SCHREIBER, V., DUSKOVÁ, J., PRIBYL, T., SVOBODOVÁ, V., JAHODOVÁ, J. Metoclopramide Potentiates the Hypophyseal Reactions to Oestradiol. **Physiologia Bohemoslovaca**, **33**: 385-389, 1984.
- SCHREIBER, V., PRIBYL, T., JAHODOVÁ, J. Dopaminergic Antagonists Potentiate the Adenohypophyseal Growth Reaction to Oestrogen: Thioridazine is less efective than Perphenazine. **Physiologia Bohemoslovaca**, **36**: 9-13, 1987.
- SCHULING, G.A., VALKHOF, N., MOES, H., KOITER, T.R. Effect of the TRH Analogue, CG 3703, on Prolactin Secretion in the Pseudopregnant Rat. **Physiology & Behavior**, **53**: 11-15, 1993.
- SCHULL, J.D. & GORSKI, J. Estrogen Regulates the Transcription of the Rat Prolactin Gene in Vivo through at Least Two Independent Mechanisms. **Endocrinology**, **116**: 2456-2462, 1985.
- SEKI, K., MITSUI, C., NAGATA, I. Effects of a Dopamine Antagonist (Metoclopramide) on the Release of Beta-Endorphin, ACTH and Cortisol in Hyperprolactinemic-Amenorrhic Women. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, **40**: 42-45, 1995.
- SELMANOFF, M. Rapid Effect of Hyperprolactinemia on Basal Prolactin Secretion and Dopamine Turnover in the Medial and Lateral Median Eminence. **Endocrinology**, **116**: 1943-1952, 1985.
- 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.
- SELTZER, A.M. & DONOSO, A.O. Participation of Brain Histamine in the Prolactin Response to Stress. In MacLEOD, R.M., THORNER, M.O., SCAPAGNINI, U. (eds.) **Prolactin, Basic and Clinical Correlates**. Padova, Liviana Press, pp. 137-142, 1985.
- SHAAR, C.J., CLEMENS, J.A., DININGER, N.B. Effect of Vasoactive Intestinal Polypeptide on Prolactin Release *in vitro*. **Life Sciences**, **25**: 2071-2074, 1979.
- SHAH, G.V., DEFTOS, L.J., CROWLEY, W.R. Synthesis and Release of Calcitonin-Like Immunoreactivity by Anterior Pituitary Cells: Evidence for a Role in Paracrine Regulation of Prolactin Secretion. **Endocrinology**, **132**: 1367-1372, 1993.

- SHIEH, K., PAN, J. An Endogenous Cholinergic Rhythm May Be Involved in the Circadian Changes of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neuron Activity in Ovariectomized Rats Treated with or without Estrogen. **Endocrinology**, **136**: 2383-2388, 1995.
- SHIMATSU, A., KATO, Y., MATSUSHITA, N., KATAMI, H., YANAIHARA, N., IMURA, H. Stimulation by Serotonin of Vasoactive Intestinal Polypeptide Release into Rat Hypophysial Portal Blood. **Endocrinology**, **111**: 338-340, 1982.
- SHIMIZU, H. & BRAY, G.A. Effects of Castration, Estrogen Replacement and Estrus Cycle on Monoamine Metabolism in the Nucleus Accumbens, Measured by Microdialysis. **Brain Research**, **621**: 200-206, 1993.
- SHIMOKAWA, N., KATO, Y., HATTORI, M., WAKABAYASHI, K. Indirect Effects of Progesterone on the Synthesis and Secretion of Prolactin in Mammoth-Enriched Cells. **Experimental Clinical and Endocrinology**, **99**: 3-7, 1992.
- SHIN, S.H. Physiological Evidence for the Existence of Prolactin Releasing Factor: Stress-Induced Prolactin Secretion Is not Linked to Dopaminergic Receptors. **Neuroendocrinology**, **31**: 375-379, 1980.
- SHIN, S.H., BARTON, R.E. Activation of the Adrenergic β -Receptor Stimulates Prolactin Release from Primary Cultured Pituitary Cells. **Neuroendocrinology**, **57**: 670-677, 1993.
- SHOUBE, D., MONTZ, F.J., LOBO, R.A. The Effects of Estrogen and Progestin on Endogenous Opioid Activity in Oophorectomized Women. **Endocrinology**, **60**: 178-183, 1985.
- SIGNS, S.A., LIU, B., WOLFORD, J., CARRILLO, A.J. Serotonergic involvement in the regulation of prolactin and vasoactive intestinal peptide mRNA expression in the rat anterior pituitary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **105**: 183-191, 1994.
- SINGH, M., MILLARD, W.J., LAYDEN, M.P., ROMANO, T.M., SIMPKINS, J.W. Opiate Stimulation of Prolactin Secretion Is Reversed by Ovarian Hormone Treatment. **Neuroendocrinology**, **56**: 195-203, 1992.
- SINHA, Y.N. Structural Variants of Prolactin: Occurrence and Physiological Significance. **Endocrine Reviews**, **16**: 354-369, 1995.
- SITRUK-WARE, R., VARIN, C., CLAIR, F., MAUGIS, E-L., FERMANIAN, J., MAUVAIS-JARVIS, P. *In Vivo* Effects of Progestins on Prolactin Secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **60**: 575-578, 1985.

- SMANIK, E.J., YOUNG, H.K., MULDOON, T.G., MAHESH, V.B. Analysis of the Effect of Progesterone in Vivo on Estrogen Receptor Distribution in the Receptor in the Rat Anterior Pituitary and Hypothalamus. **Endocrinology**, **113**: 15-22, 1983.
- SMITH, S.W. & GALA, R.R. Influence of Restraint on Plasma Prolactin and Corticosterone in Female Rats. **Journal of Endocrinology**, **74**: 303-314, 1977.
- SNYDER, P.J., JACOBS, L.S., UTIGER, R.D., DAUGHDAY, W.H. Thyroid Hormone Inhibition of the Prolactin Response to Thyrotropin-Releasing Hormone. **The Journal of Clinical Investigation**, **52**: 2324-2329, 1973.
- SPAMPINATO, S., LOCATELLI, V., COCCHI, D., VICENTINI, L., BAJUSZ, S., FERRI, S., MÜLLER, E.E. Involvement of Brain Serotonin in the Prolactin-Releasing Effect of Opioid Peptides. **Endocrinology**, **105**: 163-170, 1979.
- SPRITZER, P.M., BARBOSA-COUTINHO, L.M., POY, M., ORSI, V., DAHLEM, N., SILVA, I.S.B. Effects of Norethisterone Acetate and Tamoxifen on Serum Prolactin Levels, Uterine Growth and on the presence of Uterine Immunoreactive Prolactin in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **28**: 125-130, 1995.
- SPRITZER, P.M., RIBEIRO, M.F.M., OLIVEIRA, M.C., BARBOSA-COUTINHO, L.M., SILVA, I.S.B., DAHLEM, N., CERICATTO, R., PAVANATO, M.A. Effects of Tamoxifen on Serum Prolactin Levels, Pituitary Immunoreactive Prolactin Cells and Uterine Growth in Estradiol-Treated Ovariectomized Rats. **Hormone and Metabolic Research**, **28**: 171-176, 1996.
- STEELE, M.K. Additive effects of Atrial Natriuretic Peptide and Angiotensin II on Luteinizing Hormone and Prolactin Release in Female Rats. **Neuroendocrinology**, **51**: 345-350, 1990.
- STEELE, M.K. The Role of Brain Angiotensin II in the Regulation of Luteinizing Hormone and Prolactin Secretion. **Trends of Endocrinology and Metabolism**, **3**: 295-301, 1992.
- STEFANEANU, L., KOVACS, K., HORVATH, E., LLOYD, R.V., BUCHFELDER, M., FAHLBUSCH, R., SMYTH, H. *In Situ* Hybridization Study of Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Human Adenohypophysial Cells and Pituitary Adenomas. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **78**: 83-88, 1994.
- TAKAHASHI, S. & KAWASHIMA, S. Age-Related Changes in Prolactin Cell Percentage and Serum Prolactin Levels in Intact and Neonatally Gonadectomized Male and Female Rats. **Acta Anatomica**, **113**: 211-217, 1982.

- TAKAHASHI, S., OKAZAKI, K., KAWASHIMA, S. Mitotic activity of Prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. **Cell and Tissue Research**, **235**: 497-502, 1984.
- TATÁR, P., KNOPP, J., JURCOVICOVÁ. Qualitative Changes of Total Cytoplasmic RNA Size Patterns in Estrogen-Induced Adenoma in Female Rats. **Experimental and Clinical Endocrinology**, **97**: 29-33, 1991.
- TINDALL, G.T., KOVACS, K., HORVATH, E., THORNER, M.O. Human Prolactin-Producing Adenomas and Bromocriptine: A Histological, Immunocytochemical, Ultrastructural, and Morphometric Study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **55**: 1178-1183, 1982.
- TONEY, T.W., PAWSAT, D.E., FLECKENSTEIN, A.E., LOOKINGLAND, K.J., MOORE, K.E. Evidence That Prolactin Mediates the Stimulatory Effects of Estrogen on Tuberoinfundibular Dopamine Neurons in Female Rats. **Neuroendocrinology**, **55**: 282-289, 1992.
- TONG, Y., PELLETIER, G. Prolactin Regulation of Pro-Opiomelanocortin Gene Expression in the Arcuate Nucleus of the Rat Hypothalamus. **Neuroendocrinology**, **56**: 561-565, 1992.
- TONG, Y., SIMARD, J., LABRIE, C., ZHAO, H.F., LABRIE, F., PELLETIER, G. Inhibitory Effect of Androgen on Estrogen-Induced Prolactin Messenger Ribonucleic Acid Accumulation in the Male Rat Anterior Pituitary Gland. **Endocrinology**, **125**: 1821-1828, 1989.
- TORNER, L., MEJÍA, S., LÓPEZ-GÓMES, F.J., QUINTANAR, A., ESCALERA, G.M., CLAPP, C. A 14-Kilodalton Prolactin-Like Fragment Is Secreted by the Hypothalamo-Neurohypophyseal System of the Rat. **Endocrinology**, **136**: 5454-5460, 1995.
- TSUKAHARA, S-I., KAMBE, F., SUGANUMA, N., TOMODA, Y., SEO, H. Increase in Pit-1 mRNA Is Not Required for the Estrogen-Induced Expression of Prolactin Gene and Lactotroph Proliferation. **Endocrine Journal**, **41**: 579-584, 1994.
- van der SCHOOT, P., UILENBROEK, J.TH.J., SLAPPENDEL, E.J. Effect of the Progesterone antagonist mifepristone on the hypothalamo-hypophysial-ovarian axis in rats. **Journal of Endocrinology**, **124**: 425-432, 1990.
- van HAASTEREN, G.A.C., van TOOR, H., KLOOTWIJK, W., HANDLER, B., LINKELS, E., van der SCHOOT, P., van OPHEMERT, J., JONG, F.H., VISSER, T.J., de GREEF, W.J. Studies on the role of TRH and cortisone in the regulation of Prolactin and thyrotrophin Secretion during lactation. **Journal of Endocrinology**, **148**: 325-336, 1996.

- van NESSELROOIJ, J.H.J., BRUIJNTJES, J.P., van GARDEREN-HOETMER, A., TILLAPPAUGH-FAY, G.M., FERON, V.J. Magnetic resonance imaging compared with hormonal effects and histopathology of estrogen-induced pituitary lesions in the rat. **Carcinogenesis**, **12**: 289-297, 1991.
- VICIAN, L., SHUPNIK, M.A., GORSKI, J. Effects of Estrogen on Primary Ovine Pituitary Cell Cultures: Stimulation of Prolactin Secretion, Synthesis, and Prolactin Messenger Ribonucleic Acid Activity. **Endocrinology**, **104**: 736-743, 1979.
- VIJAYAN, E. & McCANN, S.M. The Effects of Intraventricular Injection of γ -Aminobutyric Acid (GABA) on Prolactin and Gonadotropin Release in Conscious Female Rats. **Brain Research**, **155**: 35-43, 1978.
- VIJAYAN, E., CARRAWAY, R., LEEMAN, S.E., McCANN, S.M. Use of Antiserum to Neurotensin Reveals a Physiological Role for the Peptide in rat Prolactin Release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **85**: 9866-9869, 1988.
- VIJAYAN, E., SAMSON, W.K., SAID, S.I., McCANN, S.M. Vasoactive Intestinal Peptide: Evidence for a Hypothalamic Site of Action to Release Growth Hormone, Luteinizing Hormone, and Prolactin in Conscious Ovariectomized Rats. **Endocrinology**, **104**: 53-57, 1979.
- VÖLKER, W., GEHRING, W.G., BERNING, R., SCHMIDT, R.C., SCHNEIDER, J., MÜHLEN, A. Impaired pituitary response to bromocriptine suppression: reversal after bromocriptine plus tamoxifen. **Acta Endocrinologica**, **101**: 491-500, 1982.
- WALDMEIER, P.C. & MAITRE, L. Effects of Baclofen on Dopamine Metabolism and Interaction with Neuroleptic Effects. **European Journal of Pharmacology**, **47**: 191-200, 1978.
- WANG, H., HOFFMAN, G.E., SMITH, M.S. Suppressed Tyrosine Hydroxylase Gene Expression in the Tuberoinfundibular Dopaminergic System during Lactation. **Endocrinology**, **133**: 1657-1663, 1993.
- WATANOBE, H., TAKEBE, K. In vivo Release of Neurotensin from the Median Eminence of Ovariectomized Estrogen-Primed Rats as Estimated by Push-Pull Perfusion: Correlation with Luteinizing Hormone and Prolactin Surges. **Neuroendocrinology**, **57**: 760-764, 1993.
- WEILAND, N.G., WISE, P.M. Estrogen and Progesterone Regulate Opiate Receptor Densities in Multiple Brain Regions. **Endocrinology**, **126**: 804-808, 1990.

- WELSCH, C.W., JENKINS, T., AMENOMORI, Y., MEITES, J. Tumorous Development of in situ and Grafted Anterior Pituitaries in Female Rats Treated with Diethylstilbestrol. **Experientia**, **27**: 1350-1352, 1971.
- WEST, B. & DANNIES, P.S. Effects of estradiol on Prolactin Production and Dihydroergocryptine-Induced Inhibition of Prolactin Production in Primary Cultures of Rat Pituitary Cells. **Endocrinology**, **106**:1108-1113, 1980.
- WILKLUND, J., WERTZ, N., GORSKI, J. A Comparison of Estrogen Effects on Uterine and Pituitary Growth and Prolactin Synthesis in F344 and Holtzman Rats. **Endocrinology**, **109**: 1700-1707, 1981.
- WILKLUND, J.A. & GORSKI, J. Genetic Differences in Estrogen-Induced Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Rat Pituitary: Correlations with Pituitary Tumor Suscetibility. **Endocrinology**, **111**: 1140-1149, 1982.
- WILLOUGHBY, J.O., PEDERICK, H., JERVOIS, P., MENADUE, M., JUDD, S.J. Responses to prolactin secretagogues in oestrogen-treated rats suggest that the defect in prolactin regulation produced by oestrogen is at the level of the pituitary gland. **Journal of Endocrinology**, **104**: 447-452, 1985.
- WYNICK, D., HAMMOND, P.J., AKINSANYA, K.O., BLOOM, S.R. Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function. **Nature**, **364**: 529-532, 1993.
- YAMAMOTO, N., SEO, H., SUGANUMA, N., MATSUI, N., NAKANE, T., KUWAYAMA, A., KAGEYAMA, N. Effect of Estrogen on Prolactin mRNA in the Rat Pituitary. **Neuroendocrinology**, **42**: 494-497, 1986.