

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A RESPOSTA
DA PROLACTINA AO ESTRESSE EM RATAS

Aluna: Gabriela Sentena Severino

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, outubro de 2001.

"Quem nada conhece, nada ama. Quem nada pode fazer, nada compreende. Mas quem compreende também ama, observa, vê... Quanto mais conhecimento houver inerente numa coisa, tanto maior o amor... Aquele que imagina que todos os frutos amadurecem ao mesmo tempo, como as cerejas, nada sabe a respeito das uvas".

Paracelso

"Não aceitarei nenhuma dessas...afirmações até que as tenha verificado por mim mesmo, na medida em que me for possível submetê-las à prova. E se alguém, depois de mim, se tornar, como eu, amante do trabalho e zeloso da verdade, não conclua apressadamente a partir de dois ou três casos. Pois muitas vezes ele será esclarecido, como eu, pela prolongada experiência."

Galeno

"A glória de uma boa obra reside em abrir caminho a coisas melhores e assim rapidamente levar a seu próprio eclipse. O objetivo da pesquisa é o progresso... do conhecimento."

Alexander Fleming

*Ao meu querido filho Felipe por me ensinar o verdadeiro significado do amor
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion pela oportunidade da orientação desde a Iniciação Científica, pelo incentivo e pelo exemplo de professor e pesquisador que és. Obrigada!

À Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci e ao Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto pela participação nas idéias deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, a Sônia Zanon Baptista e a Ana Lúcia Ceconello pelo radioimunoensaio.

Aos colegas e amigos de laboratório: Cármen M. Gomes, Erica Hermel, Francine M. Pereira, Anelise S. Todeschini, Isabel A.M. Fossati, Charlis Raineiki, Sara C. Sagae, Ana Lúcia Ceconello, Profa. Dra. Márcia Giovenardi, Profa. Dra. Maristela J. Padoin, Márcia K. Bregeiron, Luciano Trevizan, Elisa Winkelmann, Márcio Donadio, Luciene P. Rodrigues, Gabriela Pereira e Fabrício Macagnan pelo coleguismo e amizade.

Aos técnicos de laboratório Wanderlon, Diego e Anderson pela manutenção dos animais.

Às secretárias do curso de Pós-graduação em Fisiologia, Míriam e Uiraçara pela disponibilidade e gentileza.

Aos meus queridos pais pela vida, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Ao André por tudo, mas principalmente pelo amor e companheirismo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRAT	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Estresse.....	2
1.2. Manipulação neonatal.....	3
1.3. Período hiporresponsivo ao estresse.....	6
1.4. Prolactina.....	7
1.4.1. Ações fisiológicas.....	7
1.4.2. Regulação da secreção.....	9
1.4.3. Prolactina e estresse.....	10
1.5. Ciclo estral.....	13
1.6. Perfil hormonal da secreção de prolactina e esteróides gonadais no ciclo estral.....	13
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Manipulação neonatal.....	19
3.3. Grupos.....	20
3.4. Esfregaço vaginal.....	20
3.5. Canulação da veia jugular.....	20
3.6. Coletas de sangue.....	20

3.7. Estresse.....	21
3.8. Radioimunoensaio.....	21
3.9. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1

Perfil hormonal nas fases do ciclo estral.....14

RESULTADOS

Figura 3

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratas de 11 dias de idade submetidas a estresse por vapores de éter durante 1 minuto.....26

Figura 4

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratas de 28 dias de idade submetidas a estresse por vapores de éter durante 1 minuto.....27

Figuras 5 e 6

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratas em diestro II e estro de 75 dias submetidas a estresse por vapores de éter durante 1 minuto.....28

Figura 7

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) em ratas de 75 dias de idade na manhã do diestro II e do estro.....29

Figura 8

Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas basais de prolactina (ng/mL) em ratas de 11, 28 e 75 dias de idade na manhã do diestro II e do estro.....30

Figura 9

Ontogênese da resposta da prolactina (ng/mL) ao estresse de 1 minuto por vapores de éter em ratas não-manipuladas de 11, 28 e 75 dias na manhã do diestro II e do estro.....31

Figura 10

Ontogênese da resposta da prolactina (ng/mL) ao estresse de 1 minuto com vapores de éter em ratas manipuladas de 11, 28 e 75 dias na manhã do diestro II e do estro.....32

Tabela 1

Concentrações médias \pm erro padrão da média de prolactina (ng/mL).de todos os grupos estudados.....33

Tabela 2

Concentrações médias \pm erro padrão da média de estradiol (pg/mL).de todos os grupos estudados.....33

ABREVIATURAS

- ACTH**- corticotrofina
ADH- hormônio antidiurético
ANG II- angiotensina II
ANP- peptídeo natriurético atrial
ARC- núcleo arqueado
CRH- hormônio liberador de corticotrofina
DA- dopamina
E₂- estradiol
FSH- hormônio folículo-estimulante
GABA- ácido gama-aminobutírico
GH- hormônio do crescimento
HPA- hipotálamo-hipófise-adrenal
HPG- hipotálamo-hipófise-gonadal
LC- *Locus coeruleus*
LH- hormônio luteinizante
LHRH- hormônio liberador do hormônio luteinizante
MPH- hipotálamo médio basal
NE- noradrenalina
NTS- núcleo do trato solitário
OVX- ovariectomizadas
OVXE₂- ovariectomizadas tratadas com estradiol
OVXE₂+P- ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona
P- progesterona
POA- área pré-óptica medial
PRF- fator de liberação de prolactina
PRL- prolactina
PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA_m- ácido ribonucléico mensageiro
SNC- sistema nervoso central
TRH- hormônio liberador de tireotrofina
VIP- peptídeo intestinal vasoativo

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da prolactina (PRL) ao estresse por vapores de éter em ratas de 11, 28 e 75 dias de idade. A manipulação neonatal consistia em manipular gentilmente os filhotes durante 1 minuto do 1º ao 10º dia de vida. Os animais foram divididos em dois grupos: não-manipuladas e manipuladas e em três idades: 11, 28, e 75 dias. O último grupo foi estudado nas fases do diestro II e estro. Aos 11 e 28 dias de idade as coletas de sangue foram realizadas através de decapitação antes e aos 2, 5 e 10 minutos após o estresse de 1 minuto por vapores de éter. Nos animais adultos, a veia jugular externa direita foi canulada na tarde do proestro e diestro I e o experimento realizado as 9:00 horas da manhã do estro e do diestro II, respectivamente. Amostras de 600 µL de sangue foram coletadas antes e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse de 1 minuto por vapores de éter. As concentrações plasmáticas de PRL (antes, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse) e as de estradiol (antes do estresse) foram determinadas por radioimunoensaio. Os resultados mostram que as concentrações plasmáticas basais de PRL aumentaram em ambos os grupos (não-manipuladas e manipuladas) dos 11 aos 28 dias e dos 28 aos 75 dias de idade nas fêmeas em estro e diestro II, com exceção das não-manipuladas em estro, nas quais não foi observado um aumento significativo da concentração plasmática de PRL dos 28 aos 75 dias de idade. O grupo das ratas manipuladas de 28 dias de idade apresentou uma menor concentração plasmática basal de PRL e aos 5 e 10 minutos após o estresse quando comparadas ao grupo das não-manipuladas da mesma idade (28 dias). Não foi observada a resposta da PRL ao estresse em ratas de 11 e 28 dias de idade. Na manhã do estro a resposta da prolactina ao estresse não foi diferente entres os grupos (não-manipuladas e manipuladas), contudo na manhã do diestro II, o grupo das manipuladas apresentou uma resposta de menor magnitude quando comparada ao grupo das não-manipuladas. A concentração plasmática de estradiol não foi diferente entre o estro e o diestro II e nem entre as não-manipuladas e manipuladas. Em conjunto estes resultados indicam que: as concentrações plasmáticas de PRL aumentaram no decorrer das três idades (exceto no grupo das não-manipuladas dos 28 aos 75 dias de idade na manhã do estro); a menor concentração plasmática basal de PRL observada nas ratas manipuladas aos 28 dias de idade pode ser resultado do retardo da instalação da puberdade observado em ratas manipuladas no período neonatal; o período hiporresponsivo da PRL ao estresse se estende até a idade pré-puberal; a concentração plasmática de estradiol no dia do experimento parece não ser responsável pelo efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao éter que somente foi observado nas fêmeas na manhã do diestro II.

ABSTRACT

The goal of this research is to investigate the neonatal handling effect on prolactin (PRL) stress response induced through ether vapors in female rats aging 11, 28 and 75 days old. Neonatal handling consisted in to handle gently the pups during one minute from the age of the first to the tenth day old. Animals were separated in two groups: non-handled and handled; the last separated again in three ages: 11 days old, 28 days old and adults. The last group was studied in the estrus and diestrus mornings. On the 11 and 28 days old blood samples were conducted before (through beheading with part of the group) and at 2, 5 and 10 minutes after one minute stress induced with ether vapors. In adult animals, the extern right jugular vein was canulated at proestrus and diestrus I afternoon and the experiment conducted on the estrus and diestrus II morning, respectively. Blood sample of 600 μ L were collected before and 2, 5, 10, 15 and 30 minutes after one minute ether vapors stress. Plasma PRL levels (before and 2, 5, 10, 15 and 30 minutes after stress) and estradiol levels (before stress) were determined through radioimmunoassay. The results obtained show that plasma PRL levels rised in both groups (non-handled and handled) with the age (lower in 11 days old, rising in 28 days old and highest in 75 days old). An exception is made in the diestrus II non-handled group: this group did not show a significative rise in plasma PRL levels from the 28 to the 75 days old. The 28 days old handled group showed a lower plasma PRL basal level and 5 and 10 minutes after stress than the non-handled group of the same age (28 days old). PRL stress responses were not observed in 11 and 28 days old female rats. In the estrus morning the PRL stress response did not differ neither between both groups (non-handled and handled); however, at diestrus II morning, handled female PRL stress response was lower than non-handled group. Plasma estradiol levels did not differ neither between estrus and diestrus II nor between non-handled and handled groups. Together these results point to: plasma PRL levels rised with age (except in the non-handled group from the 28 to the 75 days old at estrus morning); the lower observed plasma PRL basal levels, observed at 28 days old handled rats may be due to a retard in puberty appearing on handled rats at neonatal period; the PRL stress hyporesponsive period extends until prepubertal age; the plasma estradiol levels on the days which experiment was conducted does not seem to be responsible for the neonatal handling effect over the PRL response to ether that was observed only in females at diestrus II morning.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRESSE

A homeostase é definida como um estado de equilíbrio dinâmico e complexo necessário para a manutenção da vida. Este equilíbrio é constantemente ameaçado por fatores intrínsecos e extrínsecos, como os estressores. Assim, estresse pode ser definido como um estado de desarmonia da homeostase (CHROUSOS & GOLD, 1992).

Quando organismos encontram-se em situações de perigo ou ameaça, ocorre uma série de respostas adaptativas fisiológicas e psicológicas que têm como objetivo o restabelecimento da homeostase. Entre as adaptações fisiológicas estão o redirecionamento da utilização de substratos energéticos, aumento da pressão arterial sangüínea e da frequência cardíaca, aumento da frequência respiratória, prevalência dos processos catabólicos em relação aos anabólicos (gliconeogênese e lipólise), inibição do crescimento e das funções reprodutivas, depressão da resposta imunológica/antiflamatória e da própria resposta ao estresse. Entre as adaptações psicológicas estão o aumento do estado de alerta, de vigília, da cognição, a perda da fome e a diminuição do comportamento reprodutivo (CHROUSOS & GOLD, 1992).

Em resposta a estressores físicos e psicológicos, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é ativado. Ocorre a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) no sistema porta-hipofisário promovendo por sua vez, a liberação de corticotrofina (ACTH) pelos corticotrofos da adenohipófise na circulação sistêmica. Este hormônio interage com receptores localizados no córtex da supra-renal resultando em aumentos de glicocorticóides (corticosterona nos ratos) no plasma. O sistema neurovegetativo simpático também é ativado estimulando a liberação de adrenalina e noradrenalina (NE) nos terminais simpáticos e na medula da supra-

renal na circulação. No estresse, também, ocorre uma descarga central de NE por todo o Sistema Nervoso Central (SNC), em sua maior parte pelo *Locus coeruleus* (LC) que é muito sensível a maioria dos estressores. Assim, a ativação do eixo HPA e do sistema neurovegetativo simpático são as principais respostas adaptativas em situações estressantes sendo o CRH e a NE respectivamente, os principais componentes das respostas aos estímulos estressantes (CHROUSOS & GOLD, 1992).

1.2. MANIPULAÇÃO NEONATAL

A manipulação neonatal é um modelo experimental que tem por objetivo avaliar como uma interferência ambiental nos primeiros dias de vida pode alterar os mecanismos neurais que controlam os comportamentos e as respostas neuroendócrinas ao estresse. Este procedimento consiste em manipular os filhotes durante as duas semanas de vida geralmente por alguns minutos. O tempo de separação dos filhotes da mãe não ultrapassa 15 minutos. A manipulação neonatal que é aparentemente inofensiva altera a diferenciação do eixo HPA promovendo mudanças nos padrões comportamentais e de resposta ao estresse em animais adultos (LEVINE *et al.*, 1967; HESS *et al.*, 1968; LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993; NÚNEZ *et al.*, 1996; MEANEY *et al.*, 1996; MEERLO *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000; LEVINE, 2001).

A manipulação durante as duas primeiras semanas de vida de roedores diminui a responsividade do eixo HPA ao estresse em animais adultos (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2000). Estes efeitos são mediados pelas alterações da expressão de glicocorticóides em regiões do SNC envolvidas na regulação do feedback negativo. Este procedimento durante o período neonatal aumenta a expressão dos receptores para glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal (PLOTSKY & MEANEY, 1993; MEANEY *et al.*, 1993; SAPOLSKY, 1994; MEANEY *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2000) Estas diferenças com relação aos

receptores para glicocorticóides modificam a sensibilidade do feedback negativo, tornando-o mais sensível nos animais manipulados (MEANEY *et al.*, 1996).

Animais manipulados no período neonatal, apresentam também uma redução nas concentrações de RNAm para o CRH na amígdala central e um menor conteúdo de CRH no LC (FRANCIS, *et al.*, 1999). Além disso, existe uma atenuação da ativação do LC induzida pelo CRH, resultando em pequenos aumentos de NE no PVN após estresse por contenção (LIU *et al.*, 2000). Estes animais apresentam também um aumento de receptores GABAérgicos nas células noradrenérgicas do LC e do núcleo do trato solitário (NTS), bem como aumento de receptores benzodiazepínicos na amígdala central, LC e NTS (FRANCIS *et al.*, 1999).

Além das respostas neuroendócrinas ao estresse, sabe-se que a manipulação neonatal altera padrões comportamentais em ratos adultos. Resultados do nosso laboratório demonstraram que a manipulação neonatal provoca aumento do comportamento agressivo materno, diminuição do comportamento sexual de machos (PADOIN *et al.*, 1995) e de fêmeas (FRANTZ *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1999), diminuição da inibição comportamental no campo-aberto na presença de um gato (CHARCHAT *et al.*, 1995).

Recentemente, uma série de trabalhos tem sugerido que fatores externos, como a presença da mãe, podem interferir sobre processos fisiológicos. A separação da mãe resulta numa diminuição da frequência cardíaca e nas concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento (GH) em ratos neonatos (SUCHECKI *et al.*, 1993). A atividade do eixo HPA em ratos neonatos também parece depender da presença da mãe, uma vez que, a resposta ao estresse é maior em animais que foram separados da mãe do que aqueles em que a relação mãe-filhote não sofreu interferência (SUCHECKI *et al.*, 1993). Além disso, ratos separados da mãe demonstram um aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona sendo este aumento dependente do tempo da separação (KUHN *et al.*, 1990; LEVINE *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem que o eixo HPA parece estar quiescente nos ratos neonatos devido a presença da

mãe. Esta inibição pode ocorrer no hipotálamo, visto que a indução do RNAm para proteína fos no PVN pelo estresse é maior nos animais separados da mãe por 24 horas, sendo portanto suficiente para liberar CRH e conseqüentemente ACTH e corticosterona em animais neonatos (SMITH *et al.*, 1997).

Assim, essas alterações fisiológicas e neuroendócrinas observadas em animais neonatos e adultos podem ser devidas à interferência na relação mãe-filhote num período crítico para o desenvolvimento do SNC de roedores. De fato, mães que foram privadas, durante algum período, de suas ninhadas lambem, cuidam e ao amamentar adquirem uma postura de proteção se mantendo em cima dos filhotes com maior freqüência do que aquelas cuja relação mãe-filhote não sofreu interferência (LIU *et al.*, 1997; TODESCHINI & LUCION, 2001). Estas evidências reforçam a teoria de que o comportamento da mãe pode ser responsável pelas alterações comportamentais e neuroendócrinas que ratos adultos manipulados no período neonatal apresentam.

Além das alterações observadas no eixo HPA, GOMES *et al.* (1999) demonstraram que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) também pode sofrer alterações em animais que foram manipulados no período neonatal. Fêmeas manipuladas durante este período, além de apresentarem uma diminuição do comportamento sexual, têm ciclos estrais anovulatórios demonstrando uma capacidade reprodutiva reduzida.

FOSSATI (2000) observou uma interação entre o efeito da manipulação neonatal e esteróides gonadais sobre comportamento de ratas adultas, uma vez que ratas manipuladas em estro não apresentaram inibição comportamental no labirinto em cruz elevado. Em diestro, as ratas manipuladas apresentaram diminuição comportamental, um efeito esperado da manipulação neonatal.

Alterações morfológicas no SNC devido à manipulação neonatal têm sido estudadas em nosso laboratório. PEREIRA *et al.* (2001) observaram um menor número de neurônios em ratos machos e fêmeas no LC em animais manipulados no período neonatal aos 11, 26, 35 e 90 dias de idade.

1.3. PERÍODO HIPORRESPONSIVO AO ESTRESSE

Num animal adulto exposto a estímulos estressores observa-se um aumento de glicocorticóides na circulação sistêmica devido à ativação do eixo HPA. Por outro lado, durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando um estímulo estressante é aplicado, observa-se um pequeno aumento ou mesmo nenhum aumento da secreção de corticosterona. Por esta razão este período é denominado de Período Hiporresponsivo ao Estresse (GUILLET *et al.*, 1980; SAPOLSKY & MEANEY, 1986; SUCHECKI *et al.*, 1993; LEVINE, 1994), época da vida do animal que o eixo HPA está hiporresponsivo. Este período também é caracterizado por concentrações plasmáticas basais de corticosterona e ACTH muito baixas (WALKER *et al.*, 1986; GRINO *et al.*, 1989; LEVINE, 1994).

A causa desta hiporresponsividade vem sendo estudada. GUILLET e colaboradores (1980) sugeriram que a imaturidade do eixo HPA é responsável pela ausência da resposta ao estresse. Assim, somente quando o hipotálamo, a hipófise e o córtex da supra-renal estiverem maduros e funcionalmente conectados, uma resposta ao estresse é observada. Esta imaturidade tem como consequência uma regulação deficiente da síntese e liberação de ACTH e corticosterona e na inabilidade do estresse em promover uma alça de feedback eficiente (GRINO *et al.*, 1989; SAKLY & KOCH, 1983). Uma outra provável causa desta hiporresponsividade é o fato da supra-renal estar relativamente insensível ao ACTH, provavelmente, devido as suas baixas concentrações durante este período da vida do animal (SUCHECKI *et al.*, 1993). Estudos mais recentes indicam no entanto que o RNAm para o CRF no PVN bem como o ACTH e a corticosterona aumentam após injeção de solução salina isotônica aos 6, 12 e 18 dias de vida (DENT *et al.*, 2000).

Durante as duas primeiras semanas de vida, o SNC dos roedores está num período crítico de seu desenvolvimento pois a migração, a diferenciação, o crescimento e a apoptose neurais são máximos (MISTRETTA & BRADLEY, 1978). Portanto, a manipulação realizada durante este período crítico de desenvolvimento

do SNC altera mecanismos neurais que controlam os comportamentos e as respostas neuroendócrinas ao estresse.

1.4. PROLACTINA (PRL)

1.4.1. Ações fisiológicas

A PRL é um hormônio protéico adenohipofisário produzido por células especializadas da adenohipófise, os lactotrofos, que correspondem a 20-35% da população de células hipofisárias. Além dos lactotrofos, existem outros sítios de síntese de PRL, o SNC, a glândula mamária, a placenta, o âmnio, o útero e algumas células do sistema imunológico (para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Em ratos, a concentração plasmática basal de PRL é baixa durante os primeiros 20 dias de vida pós-natal e aumenta notavelmente até a idade adulta (para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1992; CHEN, 1987). Do mesmo modo, a percentagem de lactotrofos é muito pequena antes da puberdade (para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS, *et al.*, 1992; CHEN, 1987). Na hipófise de ratos neonatos, existe a predominância de mamossomatrofos, células bifuncionais que secretam PRL e GH (HOEFFLER *et al.*, 1985). Os mamossomatrofos se diferenciam em lactotrofos na presença de estrógenos (BOOCKFOR *et al.*, 1986). Esta diferenciação também parece depender de um sinal materno no início e no decorrer da lactação (PORTER *et al.*, 1991a; PORTER *et al.*, 1991b).

Em mamíferos, a PRL é responsável pelo desenvolvimento da glândula mamária e pela produção de leite sendo que suas concentrações plasmáticas aumentam durante a gravidez e lactação (para revisão ver BEN-JONATHAN, 1985; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

A hiperprolactinemia é responsável por uma das maiores causas de infertilidade em mulheres e de impotência no homem (para revisão ver BEN-JONATHAN, 1985). Em ratas, concentrações plasmáticas elevadas de PRL, por um longo período, resultam em alterações da regularidade do ciclo estral, da

esteroidogênese, da espermatogênese e da função gonadal, enquanto que curtos períodos de PRL plasmática elevada como durante o estresse e a lactação resultam em infertilidade (BARTKE *et al.*, 1977; SHARPE & MCNEILLY, 1979; VASQUEZ *et al.*, 1980). Além disso, a indução de hiperprolactinemia promove uma supressão do comportamento sexual tanto em ratos machos como em fêmeas (SVARE *et al.*, 1979; DUDLEY *et al.*, 1982).

Em ratos a PRL parece ter uma ação luteotrófica ou luteolítica caso não ocorra concepção. Existem evidências de que a PRL sozinha ou na presença de estradiol aumenta o número de receptores de LH nas células luteais e a produção de progesterona (LEE & RYAN, 1974; HOLT *et al.*, 1976; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). Em roedores, a PRL também está relacionada com o comportamento maternal em ratas lactantes (DUDLEY *et al.*, 1982; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Além do seu papel nos processos reprodutivos, a PRL também participa da regulação das respostas imunológicas, da osmorregulação e da angiogênese (para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

A instalação da puberdade é um mecanismo neuroendócrino complexo (REITER, 1982) e a PRL parece estar envolvida neste processo em roedores. No período pré-puberal (RAMALEY, 1981) e próximo do dia da abertura vaginal (DÖHLER & WUTTKE, 1975; WUTTKE *et al.*, 1976) a PRL apresenta um pico nas suas concentrações plasmáticas. Existem evidências que demonstram que a implantação de PRL na eminência mediana de ratas imaturas precipita o desencadeamento da puberdade (CLEMENS *et al.*, 1969, ADVIS *et al.*, 1982). Este efeito da PRL sobre a instalação da puberdade é, pelo menos em parte, exercido pelo aumento da responsividade do ovário pré-puberal ao efeito estimulatório das gonadotrofinas (ADVIS & OJEDA, 1978; ADVIS *et al.*, 1981a). Em ratos machos, o aumento das concentrações basais de PRL a partir do 25º dia de vida pós-natal é correlacionado com o crescimento dos testículos, das vesículas seminais e da próstata (NEGRO-VILLAR *et al.*, 1973).

1.4.2. Regulação da secreção de prolactina

De todos os hormônios adenohipofisários, a regulação da secreção da PRL é única, pois o hipotálamo exerce uma ação inibitória tônica sobre a secreção deste hormônio pela adenohipófise, através da liberação de dopamina (DA), o mais potente inibidor fisiológico de PRL tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A DA é liberada por neurônios tuberoinfundibulares hipotalâmicos nos vasos portais hipofisários e age de forma direta sobre os lactotrofos da adenohipófise inibindo a síntese e a secreção de PRL (SHAAR & CLEMENS, 1974; MACLEOD & LEHMEYER, 1974; GIBBS & NEILL, 1978, para revisão ver BEN-JONATHAN, 1985; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Embora a DA hipotalâmica seja responsável pela inibição tônica da PRL em condições basais, no estresse a liberação de PRL parece depender também de um ou mais fatores de liberação de prolactina (PRF) (GALA, 1990). Alguns autores sugerem, que na resposta da PRL ao estresse, a liberação de um PRF hipotalâmico seria responsável em sua maior parte pela secreção de PRL do que a própria diminuição da inibição da DA hipotalâmica (SHIN, 1979; SHIN, 1980; JAHN & DEIS, 1986; GALA, 1990).

Receptores dopaminérgicos estão presentes na hipófise sendo os da subclasse D₂ encontrados no lactotrofo (MEADOR-WOODRUFF *et al.*, 1989). O tratamento com antagonistas dos receptores D₂, como o haloperidol e pimozida, bloqueiam a atividade dos neurônios tuberohipofisais dopaminérgicos (TIDA) com conseqüente aumento na síntese e liberação de PRL (OLIVEIRA *et al.*, 1996; MOHANKUMAR *et al.*, 1997; MOHANKUMAR *et al.*, 1998; HENTSCHEL *et al.*, 2000).

A atividade basal dos neurônios TIDA e a responsividade da PRL são maiores em fêmeas do que em machos e diminuem após ovariectomia (DEMAREST & MORRE, 1981; GUNNET *et al.*, 1986a). Este efeito é revertido após tratamento com esteróides gonadais (GUNNET *et al.*, 1986b). A liberação de PRL em resposta ao estresse está relacionada com uma diminuição da atividade de

neurônios TIDA em fêmeas mas não em machos (DEMAREST *et al.*, 1985). Estas evidências sugerem um dimorfismo sexual nas propriedades regulatórias dos neurônios TIDA sobre a secreção e a liberação de PRL.

Além da DA, outras substâncias também são capazes de inibir a secreção de PRL como o GABA (MOGUILEVSKY *et al.* 1992), a Ang II (FRANCI *et al.*, 1997) e o ANP (FRANCI *et al.*, 1992).

Existem inúmeras substâncias que estimulam a liberação de PRL como o TRH (DeGREEF & VISSER, 1981), VIP (KAJI *et al.*, 1985), ocitocina (RICHARD *et al.*, 1991), serotonina (JORGENSEN *et al.*, 1992), substância P, neurotensina, opióides (RIVIER *et al.*, 1977a), melatonina (KAMBERI *et al.*, 1971), β -endorfina (RIVIER *et al.*, 1977b), histamina (ALVAREZ, 1982; KNIGGE *et al.*, 1988) entre outras.

1.4.3. Prolactina e estresse

A resposta da corticosterona aos diversos tipos de estressores é muito bem estudada (SEGGIE & BROWN, 1975; LENOX *et al.*, 1980; DOBRAKOVOVÁ & JURCOVICOVÁ, 1984). A PRL, assim como a corticosterona, também responde aos estímulos estressantes, entre eles ao éter (NEILL, 1970; WAKABAYASHI *et al.*, 1971, TERKEL *et al.*, 1972; BÁNKY *et al.*, 1994; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

Após a exposição ao éter, geralmente de 1 minuto, o pico da concentração plasmática de PRL ocorre entre 2 e 5 minutos após o estresse e o retorno às concentrações basais se dá aproximadamente após 15 minutos (WAKABAYASHI *et al.*, 1971). Esta resposta pode ser considerada de baixa magnitude e de curta duração (GALA, 1990), diferentemente da resposta da corticosterona que é bem mais tardia e longa, o pico da concentração ocorre aproximadamente 15 minutos após o estresse e mantém-se por aproximadamente 1 hora (TURPEN *et al.*, 1976).

Em humanos também observa-se um aumento da secreção de PRL em situações estressantes como anestesia, cirurgia, exercício e hipoglicemia induzida por insulina. Em todas essas situações a resposta da PRL ao estresse foi maior nas mulheres do que nos homens (NOEL *et al.*, 1972; PONTIROLI *et al.*, 1982), sugerindo que a resposta deste hormônio está relacionada com as condições hormonais. Assim como em humanos, o estado hormonal da rata também influencia a resposta da PRL ao estresse. De fato, sabe-se já há algum tempo que os estrógenos estimulam a secreção de PRL (CHEN & MEITES, 1970; AJIKA *et al.*, 1972; CALIGARIS *et al.*, 1974; GUDELSKY *et al.*, 1981; CALIGARIS & TALESNIK, 1983).

Além da participação de um PRF hipotalâmico, o sistema noradrenérgico do LC também parece participar da liberação de PRL induzida por estresse. O bloqueio do pico pré-ovulatório da PRL na tarde do proestro foi observado após lesão eletrolítica do LC na manhã desta fase juntamente com a diminuição do conteúdo de NE no hipotálamo médio basal (MBH) e na área pré-óptica medial (POA) (ANSELMO-FRANCI *et al.*, 1997). Os neurônios do LC são ativados no estresse liberando NE (VALENTINO & FOOTE., 1991; ENNIS *et al.*, 1992; CONTI *et al.*, 1997). A lesão eletrolítica do LC realizada quando as concentrações plasmáticas de PRL são altas (tarde do proestro, tarde do estro, OVXE₂, OVXE₂+P) diminui as concentrações plasmáticas basais de PRL e também a magnitude da resposta deste hormônio ao estresse por éter (POLETINI, 1998). Este resultado sugere que o sistema noradrenérgico do LC tem uma ação estimulatória sobre a liberação de PRL induzida por estresse e que esta estimulação depende do estado hormonal. Em animais cujos os estrógenos estavam baixos (machos, fêmeas em diestro) a lesão do LC não alterou a magnitude da resposta da PRL ao estresse. Embora a secreção de PRL induzida por éter tenha tido sua magnitude reduzida em ratas expostas à altas concentrações de estradiol e progesterona, a lesão eletrolítica do LC não aboliu completamente a resposta, reforçando a hipótese de que a secreção de PRL durante o estresse provavelmente deve-se também a um PRF hipotalâmico (POLETINI, 1998).

A concentração plasmática pré-estresse de PRL, que é fortemente correlacionada com as concentrações plasmáticas de esteróides gonadais, (CALIGARIS & TALESNIK, 1983; POLETINI, 1998) é quem determina a magnitude e o tipo de resposta ao estresse (aumento ou diminuição). Assim, quando as concentrações plasmáticas pré-estresse de PRL são baixas como nos machos e nas fêmeas em estro e em diestro, um estressor provoca um aumento da secreção de PRL (NEILL, 1970; WAKABAYASHI *et al.*, 1971, TERKEL *et al.*, 1972; POLETINI, 1998). Por outro lado, quando a concentração plasmática pré-estresse de PRL é alta, como nas ratas lactantes (BÁNKY *et al.*, 1994), nas ratas OVX_{E2}, OVX_{E2}+P e nas fêmeas na tarde do proestro, a PRL responde ao estresse com uma diminuição da sua secreção (TURPEN *et al.*, 1976; GALA & HAISENLEDER, 1982; KRIEG *et al.*, 1984; GALA & HAISENLEDER, 1986; POLETINI, 1998). Os mecanismos responsáveis por esta resposta antagônica da PRL ao estresse ainda não estão esclarecidos, mas resultados recentes de nosso laboratório sugerem a participação do sistema angiotensinérgico. Em ratas lactantes e OVX_{E2}+P a microinjeção de losartan (antagonista dos receptores AT1 da ANG II) no núcleo arqueado (ARC) impede a diminuição da PRL após estresse de 1 minuto por éter (SAGAE *et al.*, 2001; DONADIO *et al.*, 2001), sugerindo o papel da Ang II central nesta resposta.

O significado fisiológico do aumento da secreção de PRL que ocorre no estresse ainda não está bem esclarecido. Existem evidências de a PRL parece estar envolvida com a ativação do sistema imunológico (GALA, 1990). Além disso, foram encontrados receptores para PRL em tecidos não envolvidos diretamente com a resposta imunológica, sugerindo outros papéis fisiológicos para o aumento deste hormônio que ocorre no estresse que ainda não estão esclarecidos (GALA, 1990).

1.5. CICLO ESTRAL

O ciclo estral de ratas dura em torno de 4-5 dias. É dividido em quatro estágios: proestro, estro, diestro I (metaestro) e diestro II (diestro). Estas fases são identificadas pela análise a fresco no microscópio dos tipos celulares típicos de cada fase. A fase do proestro dura em torno de 12 a 14 horas e antecede a fase do estro, período de receptividade sexual, que dura em média 25 a 27 horas. Senão ocorrer concepção, a próxima fase é o diestro I que dura aproximadamente 6 a 8 horas. Na próxima fase, diestro II, que tem duração aproximada de 55 a 57 horas, é quando inicia-se novamente a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo, seguido do proestro novamente (FREEMAN, 1994).

1.6. PERFIL DA SECREÇÃO DE PRL E ESTERÓIDES GONADAIS NO CICLO ESTRAL

A PRL apresenta um pico durante a tarde do proestro que coincide com o pico pré-ovulatório das gonadotrofinas (Figura 1). Alguns autores identificam esse pico como único durante o ciclo estral (NEILL, 1970; SMITH *et al.*, 1975), outros observaram um segundo pico durante a tarde do estro (BUTCHER *et al.*, 1974; HAISENLEDER *et al.*, 1989; POLETINI, 1998; SZAWKA *et al.*, 2000) ou concentrações de PRL elevadas durante o proestro, estro e diestro I (AMENOMORI *et al.*, 1970).

A concentração plasmática de estradiol é baixa no estro e começa a aumentar na tarde do diestro I, até atingir concentrações mais altas no meio dia do proestro, que desencadeiam o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, caindo até o final da tarde e atingindo valores basais no início da madrugada do estro (Figura 1).

A concentração plasmática de progesterona começa a aumentar juntamente com o pico de LH na tarde do proestro, retornando às concentrações basais na manhã do estro. Além do pico que ocorre na tarde do proestro, as concentrações plasmáticas de progesterona aumentam na manhã do diestro I retornando às concentrações basais na manhã da próxima fase, o diestro II (Figura 1).

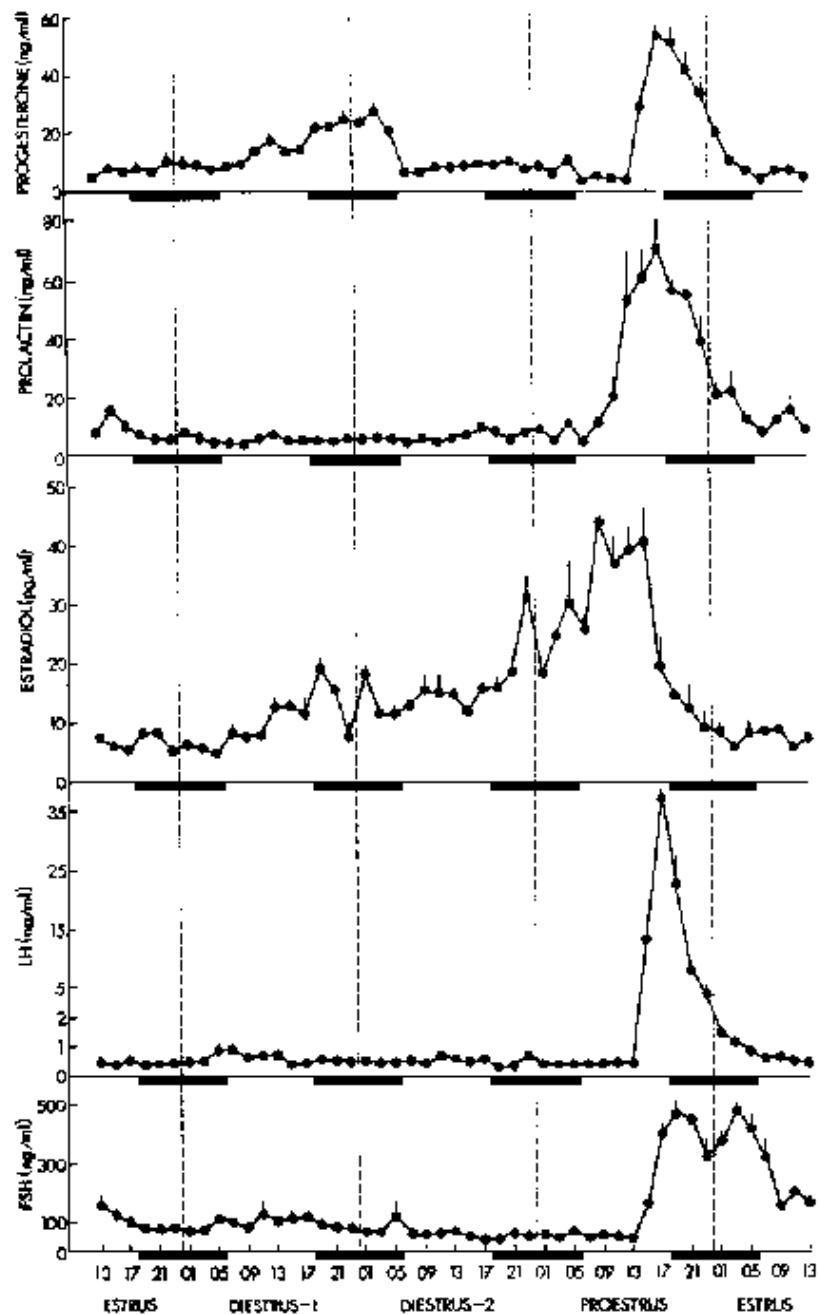


Figura 1. Concentrações plasmáticas médias \pm erro padrão de prolactina, estradiol, progesterona, LH e FSH obtidas em intervalos de 2 horas durante as quatro fases do ciclo estral de ratas (SMITH *et al.*, 1975).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de que a manipulação realizada do 1º ao 10º dia de vida pós-natal, num período crítico do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, promove alterações nos mecanismos neurais reguladores da liberação de prolactina em resposta ao estresse.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas basais de prolactina em ratas neonatas (11 dias), pré-púberes (28 dias) e adultas na manhã do estro e do diestro II (75 dias);
- ◆ Avaliar o efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da prolactina ao estresse por éter em ratas neonatas (11 dias), pré-púberes (28 dias) e adultas na manhã do estro e do diestro II (75 dias);
- ◆ Na manhã do estro e do diestro II, avaliar a interação entre o efeito da manipulação e a concentração plasmática de estradiol sobre a resposta da prolactina ao estresse por éter em ratas adultas (75 dias).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratas fêmeas Wistar. Os animais foram mantidos sob temperatura ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e fotoperíodo (12 horas de claro e 12 horas de escuro, com as luzes acessas às 6:00 horas) controlados e com água e comida ad libitum. Ratas prenhas foram fornecidas pelo Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS. Após o nascimento os filhotes foram divididos em dois grupos: não-manipuladas e manipuladas. As ratas pré-púberes e adultas foram desmamadas aos 21 dias de idade. Até o dia do experimento as ratas eram mantidas em grupos de 4-5 ratas por caixa.

MANIPULAÇÃO NEONATAL

Conforme modelo utilizado em nosso laboratório (Figura 2), a manipulação neonatal consistia em manusear gentilmente os filhotes do 1° ao 10° dia de vida pós-natal. Este procedimento era realizado com as mãos do experimentador revestidas com luvas de látex por um período de 1 minuto em horários aleatórios. Após o 1° dia de vida foi padronizado o número de oito filhotes por mãe. A manipulação era realizada numa sala ao lado do biotério e a mãe permanecia na caixa enquanto os filhotes eram manipulados. O tempo total de separação dos filhotes da mãe foi de aproximadamente 3 minutos.

GRUPOS

As ratas foram divididas em dois grupos: não-manipuladas e manipuladas e cada grupo era composto de três faixas etárias: 11 dias (neonatas), 28 dias (pré-púberes) e 75 dias (adultas). As fêmeas adultas foram estudadas nas manhã do diestro II e estro.

ESFREGAÇO VAGINAL

Nas fêmeas adultas, o esfregaço vaginal foi realizado diariamente ao redor das 9:00 horas da manhã. O epitélio vaginal foi analisado a fresco no microscópio segundo técnica de LONG & EVANS (1922). As ratas utilizadas no experimento tiveram no mínimo 3 ciclos estrais regulares.

CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol (Aldrich Chem. Comp. Inc.) 2,5 % em solução salina. A dose utilizada foi de 1mL por 100g de peso corporal. Uma cânula de silicone (0,59 x 0,99 mm) foi introduzida no átrio direito através da veia jugular externa direita segundo técnica descrita por HARMS & OJEDA (1974). As cirurgias foram realizadas às 16:00 horas na tarde do proestro e do diestro I e as coletas às 9:00 horas da manhã do dia seguinte com as ratas já nas fases do estro e do diestro II. Até o momento da coleta as cânulas ficavam preenchidas com solução fisiológica estéril.

COLETAS DE SANGUE

Todas as coletas de sangue foram realizadas em uma sala silenciosa. Nas ratas de 11 e 28 dias a coleta de sangue foi realizada às 9:00h da manhã através

de decapitação. Realizou-se uma coleta basal e aos 2, 5 e 10 minutos o estresse. As ratas adultas, após a introdução do cateter, foram mantidas em caixas individuais e cerca de 30 minutos antes da primeira coleta uma extensão de 20 cm de polietileno (PE50), previamente lavada com soro heparinizado, foi conectada à cânula de silicone e preenchida com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%), com o objetivo de realizar as coletas de sangue seriadas sem ser necessária a manipulação do animal. Amostras de 600 μ L de sangue foram coletadas em seringas plásticas heparinizadas aos 2 minutos antes do estresse e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse. Após cada coleta um volume igual de solução fisiológica estéril foi repostado.

Em todos os grupos, as amostras de sangue foram colocadas em tubos plásticos, centrifugadas a 3000 rpm a 4 °C durante 15 minutos sendo o plasma separado e armazenado em um freezer à -70 °C.

ESTRESSE

O estresse foi aplicado em um local separado da sala de coletas de sangue. O animal foi colocado em uma cuba saturada de vapores de éter durante 1 minuto.

RADIOIMUNOENSAIO

As concentrações plasmáticas de PRL foram determinadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo usando kits específicos da National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore-USA). Os anticorpos específicos para PRL foram anti-rat PRL-S9 e a preparação padrão foi a PRL-RP3. O 2º anticorpo foi produzido pelo laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci (Faculdade de Medicina - Depto. de Fisiologia da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto / SP). As amostras dos animais de 11 e de 28 dias foram dosadas em um único ensaio. As amostras dos animais adultos foram

dosadas em dois ensaios. O erro inter-ensaio foi de 7%. O limite mínimo para detecção de PRL foi de 0,09 ng/mL.

As concentrações plasmáticas de estradiol foram determinadas por radioimunoensaio usando o kit da DPC Coat-a-Count fase sólida. O limite mínimo para detecção do estradiol foi de 0,5 pg/mL.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias (\pm EPM) das concentrações plasmáticas de PRL e de estradiol foram comparadas através da ANOVA de duas vias seguida de Newman-Keulls com nível crítico fixado em 5% ($p < 0,05$) para se considerar diferenças estatisticamente significativas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A figura 3 apresenta as concentrações plasmáticas basais de PRL e aos 2, 5 e 10 minutos após o estresse por éter em ratas não-manipuladas e manipuladas de 11 dias de idade (neonatas). Não foi observada diferença significativa nas concentrações plasmáticas basais de PRL e após estresse nos dois grupos estudados. Somente aos 2 minutos após o estresse as manipuladas apresentaram uma concentração plasmática de PRL estatisticamente maior do que as não-manipuladas.

A figura 4 apresenta as concentrações plasmáticas basais de PRL e aos 2, 5 e 10 minutos após o estresse por éter em ratas não-manipuladas e manipuladas de 28 dias de idade (pré-púberes). Não foi observada diferença significativa na liberação de PRL em resposta ao estresse por éter nos dois grupos estudados. A concentração plasmática basal de PRL e aos 5 e 10 minutos após o estresse foi estatisticamente menor nas ratas manipuladas quando comparadas às não-manipuladas.

A figura 5 apresenta as concentrações plasmáticas de PRL antes e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse por éter em ratas não-manipuladas e manipuladas na manhã do diestro II. Não foi observada diferença significativa na concentração plasmática basal de PRL entre os dois grupos. Aos 2 e 5 minutos após o estresse por éter, o grupo das ratas manipuladas apresentou uma redução significativa da liberação de PRL quando comparado ao grupo das não-manipuladas.

A figura 6 apresenta as concentrações plasmáticas de PRL antes e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse por éter em ratas não-manipuladas e manipuladas na manhã do estro. Não foi observada diferença significativa na concentração plasmática basal de PRL entre os dois grupos. As concentrações plasmáticas de PRL tanto nas ratas não-manipuladas quanto nas manipuladas aumentaram após o estresse e não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados.

A figura 7 apresenta as concentrações plasmáticas de estradiol em ratas não-manipuladas e manipuladas em diestro II e estro respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto as concentrações plasmáticas de estradiol entre os grupos e entre o diestro II e o estro.

A figura 8 apresenta as concentrações plasmáticas basais de PRL em ratas não-manipuladas e manipuladas de 11, 28 e 75 dias na manhã do diestro II e do estro. Em ambos os grupos ocorreu um aumento significativo da concentração plasmática de PRL dos 11 aos 28 dias de idade. O mesmo ocorreu dos 28 aos 75 dias de idade (estro e diestro II), com exceção das não-manipuladas dos 28 aos 75 dias do estro. Somente aos 28 dias de idade foi observada uma diferença significativa quanto às concentrações plasmáticas basais de PRL entre os grupos, com o grupo das manipuladas apresentando uma redução significativa da concentração plasmática basal de PRL.

As figuras 9 e 10 apresentam a ontogênese da liberação da PRL em resposta ao estresse por éter em ratas não-manipuladas e manipuladas de 11, 28 e 75 dias de idade na manhã do diestro II e do estro, respectivamente. Somente aos 75 dias de idade foi observado um aumento significativo de PRL após estresse em ambos os grupos. Aos 2, 5 e 10 minutos após o estresse, o grupos das ratas manipuladas em diestro II apresentaram uma liberação de PRL após estresse significativamente menor quando comparadas ao grupos das ratas manipuladas em estro.

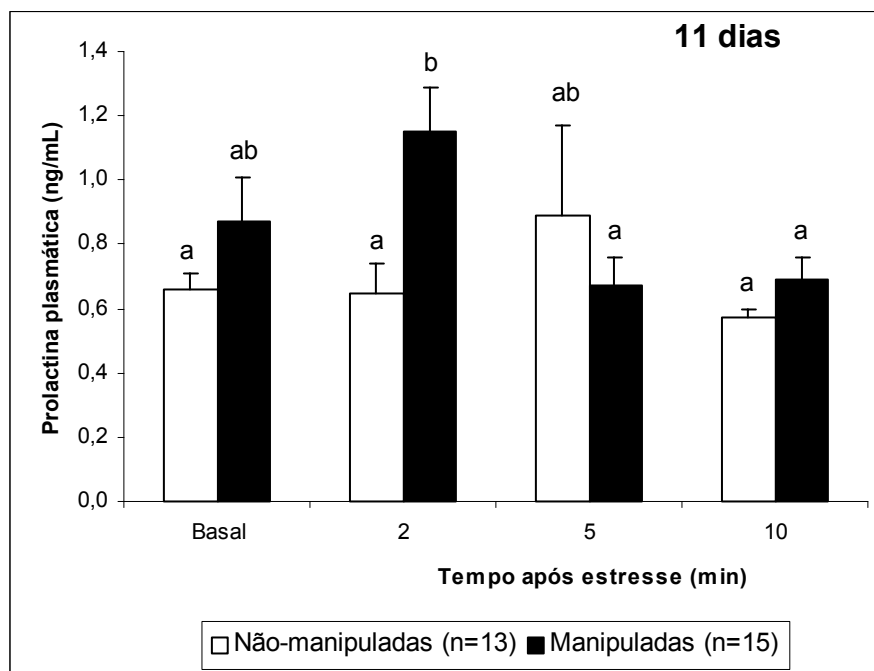


Figura 3- Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratas de 11 dias de idade submetidas a estresse por vapores de éter durante 1 minuto. Os animais foram decapitados às 9:00 horas da manhã e o sangue coletado antes e aos 2, 5 e 10 minutos após o estresse. As mesmas letras sobre as barras representam que as médias não são estatisticamente diferentes, enquanto que as letras desiguais indicam que as médias diferem estatisticamente. ANOVA de duas vias (entre os grupos e dentro do mesmo grupo), seguida de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

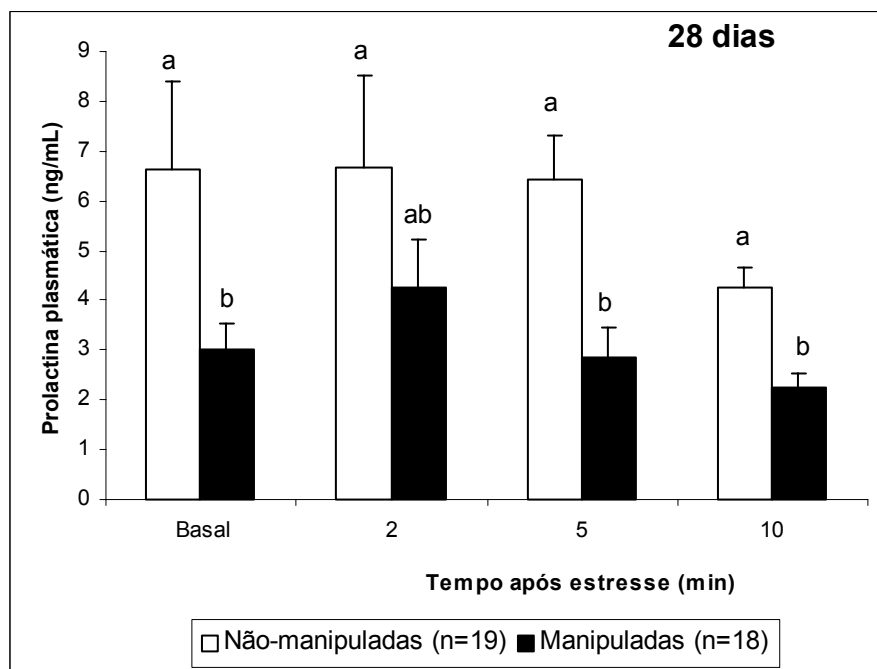
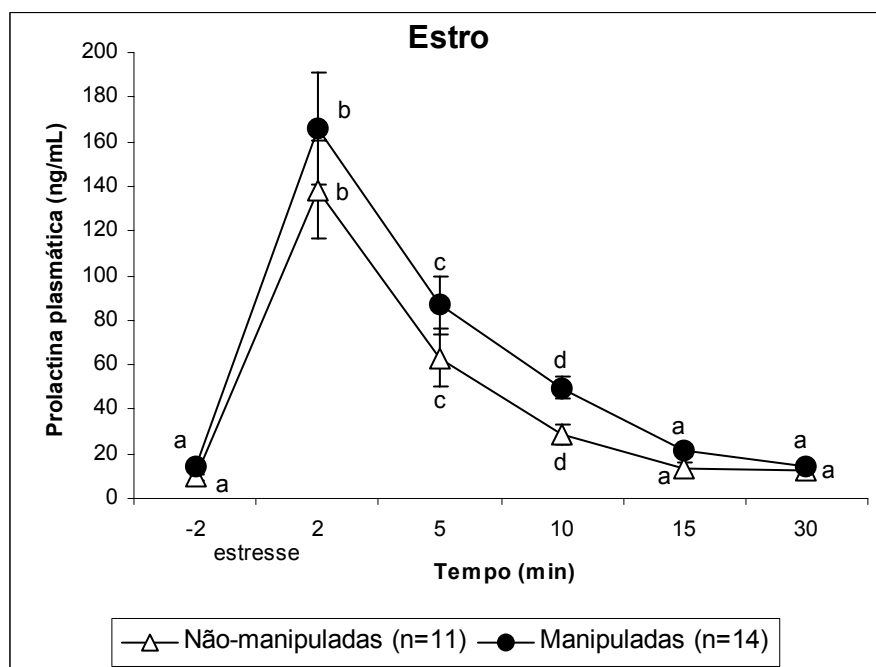
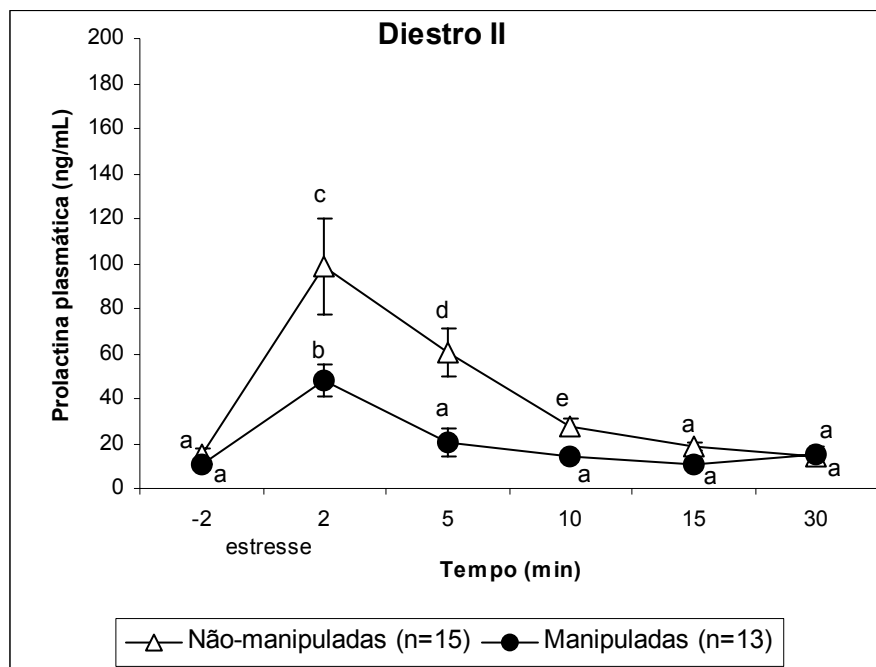


Figura 4- Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratas de 28 dias de idade submetidas a estresse por vapores de éter durante 1 minuto. Os animais foram decapitados às 9:00 horas da manhã e o sangue coletado antes e aos 2, 5 e 10 minutos após o estresse. Comparação entre as médias conforme fig. 3.



Figuras 5 e 6 - Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratas em diestro II e em estro de 75 dias de idade submetidas a estresse por vapores de éter durante 1 minuto. A veia jugular foi canulada na tarde anterior ao experimento. Às 9:00 horas da manhã o sangue foi coletado 2 minutos antes e 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após o estresse. Comparação entre as médias conforme fig. 3.

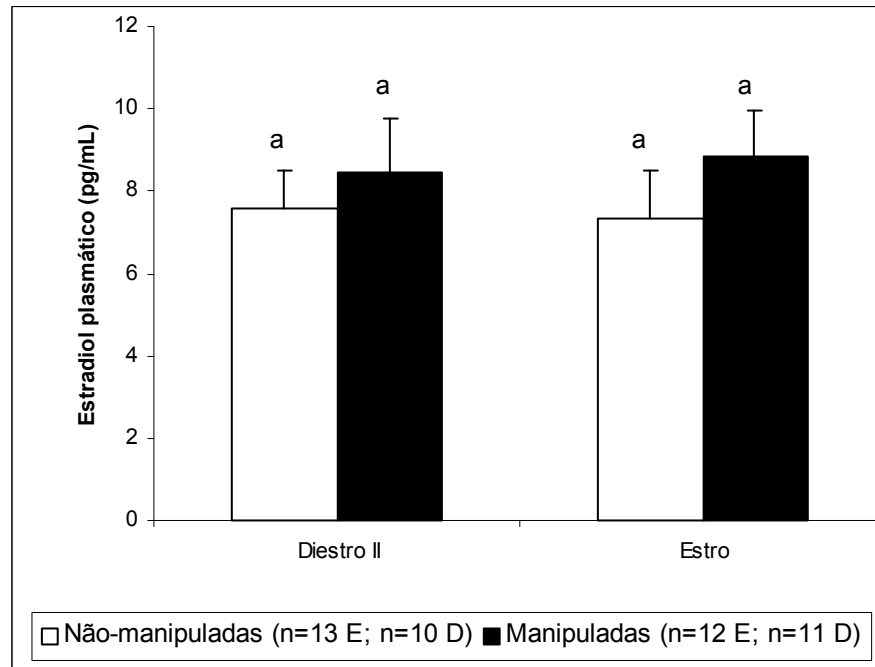


Figura 7- Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) em ratas de 75 dias de idade na manhã do diestro II (D) e do estro (E). Comparação entre as médias conforme fig. 3.

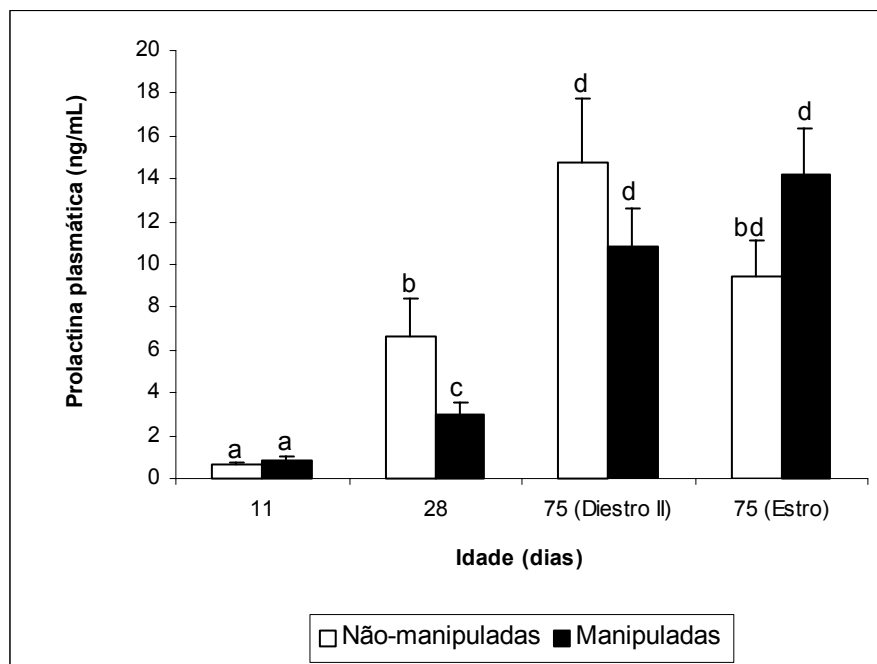


Figura 8- Efeito da manipulação neonatal sobre as concentrações basais de prolactina (ng/mL) às 9:00 horas da manhã em ratas de 11 (não-manipuladas, n=13; manipuladas, n=15), 28 (não-manipuladas, n= 19; manipuladas, n=18) e 75 dias de idade na manhã do diestro II (não-manipuladas, n=15 ; manipuladas, n=13) e do estro (não-manipuladas, n=11 ; manipuladas, n=14). Comparação entre as médias conforme fig. 3.

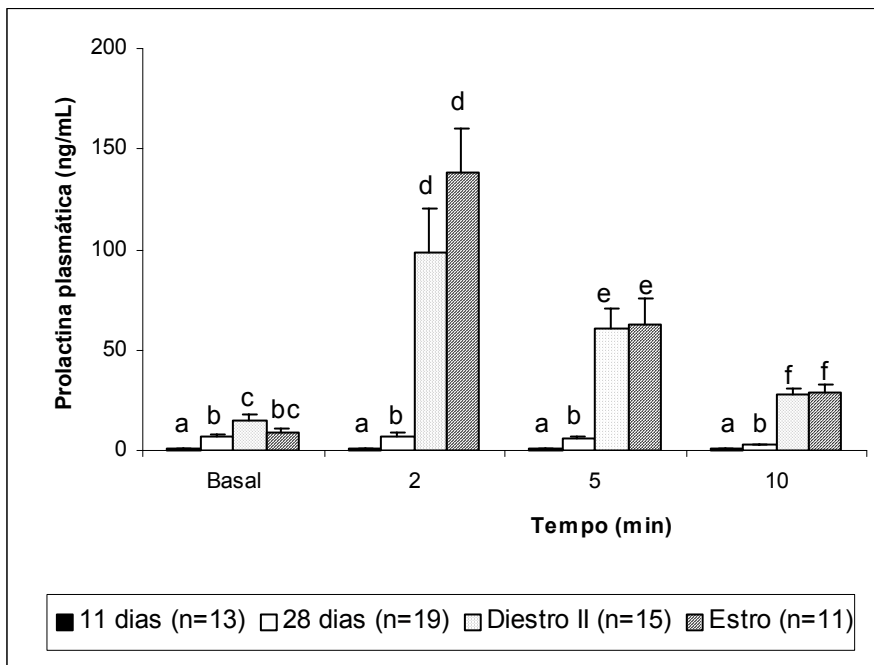


Figura 9- Ontogênese da resposta da prolactina (ng/mL) ao estresse de 1 minuto por vapores de éter às 9:00 horas da manhã em ratas não-manipuladas de 11, 28 e 75 dias na manhã do diestro II e do estro. Comparação entre as médias conforme fig. 3.

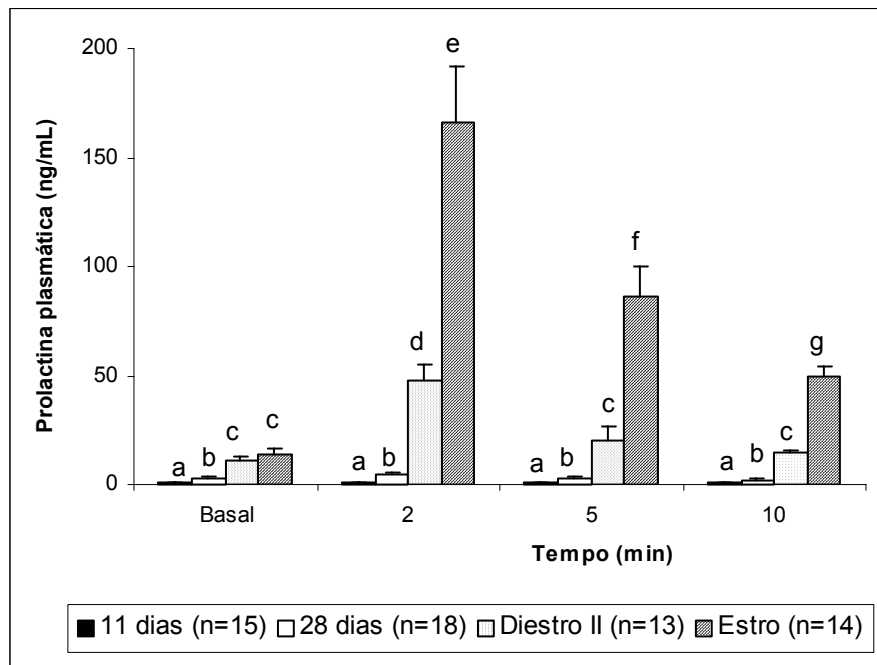


Figura 10- Ontogênese da resposta da prolactina (ng/mL) ao estresse de 1 minuto por vapores de éter às 9:00 horas da manhã em ratas manipuladas de 11, 28 e 75 dias na manhã do diestro II e do estro. Comparação entre as médias conforme fig. 3.

Tabela 1- Concentrações médias \pm erro padrão da média de PRL (ng/mL) de todos os grupos estudados:

GRUPOS	TEMPO (MIN)					
	Basal	2	5	10	15	30
11 dias não-manipuladas	0,66 \pm 0,05	0,65 \pm 0,09	0,89 \pm 0,28	0,57 \pm 0,03	-	-
11 dias manipuladas	0,87 \pm 0,14	1,15 \pm 0,14	0,67 \pm 0,09	0,69 \pm 0,07	-	-
28 dias não-manipuladas	6,62 \pm 1,76	6,65 \pm 1,85	6,42 \pm 0,91	2,77 \pm 0,40	-	-
28 dias manipuladas	3,02 \pm 0,52	4,25 \pm 0,99	2,86 \pm 0,59	2,26 \pm 0,29	-	-
Diestro II não-manipuladas	14,76 \pm 2,96	98,58 \pm 21,46	60,33 \pm 10,36	27,39 \pm 3,29	18,51 \pm 1,73	14,76 \pm 2,96
Diestro II manipuladas	10,8 \pm 1,79	48 \pm 7,04	20,62 \pm 6,35	14,58 \pm 1,69	10,54 \pm 1,7	15,15 \pm 2,05
Estro não-manipuladas	9,45 \pm 1,7	138,22 \pm 21,9	63,02 \pm 13	28,68 \pm 4,43	13,48 \pm 2,75	12,15 \pm 1,65
Estro manipuladas	14,16 \pm 2,15	166,15 \pm 25,15	86,61 \pm 13,05	49,44 \pm 4,84	21,52 \pm 3,03	14,16 \pm 2,15

Tabela 2- Concentrações médias \pm erro padrão da média de estradiol (pg/mL) de todos os grupos estudados:

GRUPOS	Basal
Diestro II não-manipulada	7,6 \pm 0,92
Diestro II manipulada	8,45 \pm 1,31
Estro não-manipulada	7,35 \pm 1,15
Estro manipulada	8,83 \pm 1,13

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

1. Concentração plasmática basal de prolactina

11 dias de idade (neonatas)

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura mostrando que as concentrações plasmáticas de PRL são muito baixas em ratos aos 11 dias de idade (FENSKE & WUTTKE, 1977; JIMENEZ *et al.*, 1984; para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1991; MOGUILEVSKY *et al.*, 1992). A estocagem, a síntese e a secreção de PRL aumentam no decorrer do desenvolvimento ontogenético (para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1991). Após a terceira semana de vida, o aumento das concentrações plasmáticas de PRL não está relacionado com uma diminuição da inibição da DA hipotalâmica, mas sim com um aumento dos estrógenos, serotonina, opióides e extratos da neurohipófise que estimulariam a síntese de PRL pela hipófise (para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1991).

28 dias de idade (pré-púberes)

As fêmeas aos 28 dias de idade de ambos os grupos (não-manipuladas e manipuladas), antes da abertura vaginal, apresentaram concentração plasmática basal de PRL significativamente maior do que as ratas aos 11 dias de idade. Este resultado está de acordo com os de autores que mostraram o mesmo em machos e fêmeas não submetidos a procedimentos de manipulação no período neonatal (DOHLER & WUTTKE, 1974; BECÚ & LIBERTUN, 1982). Por outro lado, aos 28 dias de idade as ratas manipuladas apresentaram uma concentração plasmática basal de PRL estatisticamente maior quando comparadas às não-manipuladas.

A instalação da puberdade envolve mecanismos neuroendócrinos complexos. A capacidade do hipotálamo em liberar o hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) e a liberação de estradiol (E₂) e progesterona (P) pelos ovários aumentam durante este processo. Antes do início da puberdade, a responsividade do ovário às gonadotrofinas resulta em elevadas concentrações de E₂ e P que engatilham o primeiro pico pré-ovulatório em fêmeas, que uma vez iniciado, faz com que a responsividade da hipófise ao LHRH aumente, tendo como consequência a primeira ovulação (OJEDA *et al.*, 1980).

Existem evidências mostrando que a PRL é pelo menos em parte, responsável pelo desencadeamento da puberdade. A concentração plasmática de PRL começa a aumentar após a terceira semana de vida (DÖLHER & WUTTKE, 1974, 1975) com picos ao redor dos 28 dias de idade (RAMALEY & CAMPBELL, 1977; RAMALEY, 1981) e próximo ao dia da abertura vaginal (DÖLHER & WUTTKE, 1975; JIMENEZ *et al.*, 1984), indicativo da instalação da puberdade. Além disso, a indução de hiperprolactinemia em ratas pré-púberes, através do implante de PRL na eminência mediana, precipita a instalação da puberdade (CLEMENS *et al.*, 1969; ADVIS *et al.*, 1982). ADVIS e colaboradores (1981b) sugerem uma ação periférica da PRL, aumentando ou mantendo os receptores de LH no ovário. A PRL também parece sensibilizar os ovários aos efeitos estimulatórios das gonadotrofinas durante o período pré-puberal (OJEDA *et al.*, 1980).

JIMENEZ *et al.* (1984) observaram uma relação inversa do LH e PRL no dia 30 de vida do rato, sugerindo um efeito anti-gonadotrofínico transitório das concentrações plasmáticas elevadas de PRL sobre as de LH. Entre os dias 25-30, a atividade da tirosina hidroxilase na amígdala e as concentrações plasmáticas de PRL estão fortemente correlacionadas com a idade, sugerindo que o sistema dopaminérgico também pode estar envolvido na instalação da puberdade.

Considerando as evidências expostas acima a respeito da participação da PRL na instalação da puberdade e os resultados obtidos de SIECK & RAMALEY (1975) e GOMES (2001) que observaram um retardo da abertura vaginal em ratas manipuladas no período neonatal, um indicativo da instalação da puberdade, a

menor concentração plasmática basal de PRL nas ratas manipuladas pode ser decorrente do atraso da instalação da puberdade observado nestes animais. Essa menor concentração plasmática basal de PRL poderia ser devida a um retardo no desenvolvimento de regiões do SNC envolvidas nos processos neuroendócrinos responsáveis pela instalação da puberdade.

75 dias de idade (adultas)

As fêmeas com 75 dias de idade de todos os grupos experimentais apresentaram uma concentração plasmática basal de PRL significativamente maior daquelas com 28 dias, entretanto, as ratas não-manipuladas em estro apresentaram uma concentração intermediária entre os valores obtidos com 28 dias e aqueles das ratas adultas em diestro II. Os resultados mostram que as concentrações plasmáticas basais de PRL nas ratas não-manipuladas e manipuladas tanto em estro quanto em diestro II não são estatisticamente diferentes. Este mesmo resultado foi observado com machos por GONZÁLEZ *et al.* (1990), NÚNEZ *et al.* (1996) e MEERLO *et al.* (1999). Assim como as fêmeas estudadas neste trabalho, ratos machos adultos manipulados no período neonatal não apresentam diferenças na concentração plasmática basal de PRL, em relação aos não-manipulados. Contudo, quando estressados, a magnitude da resposta foi menor nos animais manipulados, fenômeno semelhante ocorre com o ACTH e a corticosterona (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2000).

2. Resposta ao estresse

11 dias de idade (neonatas)

Aos 11 dias de idade, tanto as ratas não-manipuladas como as manipuladas não apresentaram alterações significativas das concentrações

plasmáticas de PRL após o estresse por éter. Este resultado indica que a manipulação neonatal não foi capaz de alterar o padrão hiporresponsivo da PRL durante esta fase do desenvolvimento. No entanto, aos 2 minutos após o estresse, as ratas manipuladas apresentaram uma concentração plasmática de PRL estatisticamente maior quando comparadas as não-manipuladas.

O fato de ratos, neste período da vida, normalmente não responderem a estímulos estressantes está de acordo com a literatura. A resposta da PRL ao estresse não ocorre em ratos neonatos, sendo que esta só começa a manifestar-se durante a idade pré-puberal (OJEDA *et al.*, 1976; FENSKE & WUTTKE, 1977). OJEDA *et al.* (1976) observaram uma liberação de PRL em resposta ao éter somente após o 30º dia de idade, sendo que a magnitude desta resposta aumenta gradativamente com a idade do animal. FENSKE & WUTTKE (1977) mostraram alteração da concentração plasmática de PRL ao éter e à novidade a partir do 20º dia de idade, com um aumento significativo a partir do 31º dia de idade, sugerindo que a liberação de PRL em resposta ao estresse requer uma maturação neuroendócrina que só ocorre pelo 30º dia de vida.

Embora o éter não tenha sido um estressor capaz de induzir um aumento da liberação de PRL nas ratas de 11 dias de idade, WALKER *et al.* (1986) mostraram que este estímulo se mostrou o mais potente estressor para induzir aumentos das concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona antes do 14º dia de vida. Sugere-se que durante esta época da vida os animais não respondem a todos estímulos uniformemente, visto que os ratos podem ser insensíveis a outros tipos de estressores como o eletrochoque e a hipóxia. ECK & KUNH (1992) também observaram resposta do ACTH e da corticosterona ao estresse por éter em ratos de 10 dias de idade, indicando que o éter é capaz de ativar o eixo HPA durante o período neonatal. Nesta idade precoce (Período Hiporresponsivo ao Estresse), o sistema de ativação da resposta da PRL ao estresse parece ser mais insensível do que o do ACTH e da corticosterona.

Por outro lado, utilizando o modelo de separação materna, a resposta do ACTH e da corticosterona ao estresse em animais separados da mãe por longo período de tempo é maior, provavelmente devido a ausência da mãe que parece

ser responsável pela manutenção da quiescência do eixo HPA durante o período neonatal (KHUN *et al.*, 1990; LEVINE *et al.*, 1991; SUCKECKI *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 1997). Assim, a maior concentração plasmática de PRL observada nas ratas manipuladas pode ser conseqüência de uma diminuição desta quiescência durante este período da vida do animal, visto que a manipulação dos filhotes induz a um aumento do comportamento maternal.

De qualquer forma, de maneira diferente do que ocorre na vida adulta, a manipulação neonatal não foi capaz de alterar a responsividade dos filhotes a estímulos estressantes quanto a alteração das concentrações plasmáticas de PRL após estresse nesse período da vida.

28 dias de idade (pré-púberes)

Nossos resultados com relação ao efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao éter em fêmeas pré-púberes (28 dias de idade) mostram que tanto as ratas não-manipuladas quanto as manipuladas ainda não apresentam alterações da concentração plasmática de PRL após o estresse. Estes resultados indicam que a não-responsividade da PRL ao estresse por éter estende-se até a idade pré-puberal e estão de acordo com trabalhos prévios (OJEDA *et al.*, 1976; RAMALEY & CAMPBELL, 1977; para revisão ver BECCÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1991). A manipulação neonatal não foi capaz de modificar o padrão da resposta da PRL ao estresse por éter em ratas pré-púberes. Assim, uma resposta da PRL ao estresse parece depender do completo desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise que ocorre aproximadamente no final da terceira semana de vida (OJEDA *et al.*, 1976; para revisão ver BECÚ-VILLALOBOS *et al.*, 1991).

Além disso, o aparecimento da resposta da PRL ao estresse durante a puberdade provavelmente está relacionado com a secreção ovariana de estradiol que possui um efeito estimulatório sobre a secreção de PRL (CALIGARIS *et al.*, 1974; para revisão ver BEN-JONATHAN, 1985; para revisão ver BECCÚ-

VILLALOBOS *et al.*, 1991; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). RAMALEY & CAMPBELL (1977) mostraram que o estresse durante 2 minutos por vapores de éter aplicado em ratas pré-púberes de 22 dias de idade e de 34 dias de idade não induziu o aumento na concentração plasmática de PRL. No entanto, em ratas de 34 dias de idade que já apresentavam abertura vaginal, portanto pós-púberes, ocorreu uma diminuição da concentração plasmática de PRL às 8:00 horas da manhã mas não às 16:00 horas.

NEGRO-VILAR (1983) demonstrou que as concentrações plasmáticas basais e a resposta da PRL ao estresse em ratos machos de 35 dias são menores quando comparados aos adultos. Já ARMARIO *et al.* (1987) observaram que ratos machos entre o 22-24 dias de vida já apresentam uma liberação de PRL em resposta ao estresse embora muito menor do que a observada em animais adultos. Contudo, as concentrações plasmáticas basais de PRL não são diferentes entre machos pré-púberes e adultos, sugerindo que existem mecanismos neurais distintos que controlam a secreção basal e a liberação de PRL em resposta ao estresse (ARMARIO *et al.*, 1987).

75 dias de idade (adultas)

A concentração plasmática de PRL, assim como a de corticosterona, pode ser uma boa medida dos efeitos do estresse. O éter é um poderoso estressor que induz a liberação de PRL em ratos adultos (NEILL, 1970; WAKABAYASHI *et al.*, 1971, TERKEL *et al.*, 1972; BÁNKY *et al.*, 1994; para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000). Não encontramos nenhum trabalho que tivesse por objetivo avaliar os efeitos da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse especificamente por éter. MEERLO *et al.* (1999) observou uma menor magnitude de resposta da PRL à novidade e ao medo em ratos machos manipulados no período neonatal, correlacionando estes resultados com medidas comportamentais que demonstram que estes animais são menos ansiosos.

NÚNEZ *et al.* (1996) observaram uma menor liberação de PRL após 15 minutos de exposição a um ambiente novo em ratos machos separados durante 15 minutos da mãe do 1° ao 22° dia de vida e mantidos individualmente em caixas plásticas. Este trabalho sugere que a manipulação neonatal alterou as atividades dopaminérgicas e gabaérgicas hipotalâmicas, ambas com efeito inibitório sobre a liberação de PRL, resultando em alterações na liberação de PRL induzida pelo estresse. Além disso, NUNEZ *et al.*, (1996) relacionam a resposta reduzida da PRL em ratos manipulados no período neonatal com a diminuição da liberação de CRF durante o estresse, visto que o CRF é um estimulador da liberação de PRL induzida por estresse (AKEMA *et al.*, 1995). Ratos machos adultos manipulados e estressados cronicamente do 2° ao 15° dia de idade demonstraram uma menor liberação de PRL após nado forçado, contudo as concentrações plasmáticas basais do hormônio não foram diferentes (GONZÁLEZ *et al.*, 1990). Nossos resultados com fêmeas também demonstram que as concentrações plasmáticas basais de PRL não são diferentes entre as não-manipuladas e manipuladas tanto na manhã do estro quanto na manhã do diestro II.

Assim como a manipulação neonatal, o estresse pré-natal também altera o padrão de resposta da PRL ao estresse em ratos adultos. POLITCH & HERRENKOHL (1978) demonstraram que o estresse pré-natal, promove uma menor resposta da PRL ao éter em ratos machos durante a vida adulta. A resposta da PRL ao estresse por contenção em ratos adultos machos e fêmeas em diestro, que foram estressados no período pré-natal, também é menor quando comparado aos animais do grupo controle (KINSLEY *et al.*, 1989). Sugere-se que o estresse pré-natal promove alterações na regulação hipotalâmica da secreção de PRL. O estresse pré-natal altera a DA e NE do hipotálamo de fêmeas prenhas e de machos e fêmeas (MOYER *et al.*, 1977), sendo que ambos os neurotransmissores estão envolvidas na secreção de PRL induzida por estresse (GOODMAN *et al.*, 1976; MARCHLEWSKA-KOJ & KRULICH, 1975). O estresse pré-natal também reduz a liberação de PRL induzida pelo estradiol em ratos machos e fêmeas gonadectomizados (KINSLEY & BRIDGES, 1987).

Conforme os resultados deste trabalho, o efeito da manipulação neonatal (atenuação da resposta da PRL ao estresse), foi observado somente nas fêmeas em diestro II. Este resultado pode ser explicado pelo sistema noradrenérgico. Em animais manipulados no período neonatal, foi observado uma menor ativação do LC induzida pelo CRH. As concentrações de NE no PVN são mais baixas nos animais do grupo manipulado após estresse por contenção do que nos animais do grupo controle (LIU *et al.*, 2000).

Diferentemente do que ocorreu na fase do diestro II, durante o estro, não existiram diferenças na resposta da PRL ao estresse entre as não-manipuladas e manipuladas. O mesmo ocorreu com relação a inibição comportamental no labirinto em cruz elevado (FOSSATI, 2000). Ratas manipuladas em diestro II apresentaram um aumento da atividade exploratória, um efeito esperado da manipulação neonatal, contudo no estro, a atividade exploratória não foi diferente entre as não-manipuladas e manipuladas. Estes resultados sugerem que os esteróides gonadais podem estar modulando os efeitos da manipulação neonatal. Conforme dados de nosso laboratório, os efeitos da manipulação neonatal não são observáveis antes da puberdade ou após gonadectomia (LUCION *et al.*, 1999). Assim, a modulação dos efeitos da manipulação neonatal pelos esteróides gonadais, possivelmente envolve mecanismos neurais relacionados não somente com a liberação de PRL em resposta ao estresse, mas também relacionados com os comportamentos, visto que ambos são afetados e relacionados com a manipulação neonatal e a fase do ciclo estral.

Embora, a resposta ao estresse por éter ter sido maior durante a fase do estro, a concentração plasmática de estradiol não foi diferente entre os grupos (não-manipuladas e manipuladas) e nem entre o diestro II e o estro. De acordo com a literatura, a concentração plasmática de estradiol começa a aumentar ao redor do meio dia do proestro atingindo suas concentrações máximas na tarde desta fase (SMITH *et al.*, 1975). Assim, não parece errado supor que a não ocorrência do efeito da manipulação no estro, possa ser devido a efeitos tardios do estradiol sobre a regulação da secreção de PRL durante o estresse, visto que o

estradiol estimula a síntese e a liberação de PRL (para revisão ver FREEMAN *et al.*, 2000).

De fato, efeitos tardios do estradiol têm sido observados na síntese e liberação de PRL. No lactotrofo, a estimulação da transcrição gênica da PRL é observada 24 horas após a administração de estradiol (SHULL & GORSKI, 1989). O estradiol também pode diminuir a sensibilidade do lactotrofo à DA através da redução do número de receptores dopaminérgicos (RAYMOUND *et al.*, 1978). Além disso, a proliferação dos lactotrofos no estro pode ser devida à ação das altas concentrações de estradiol durante a tarde do proestro sobre os mecanismos neurais que engatilham a proliferação dos lactotrofos (HASHI *et al.*, 1995). Esta ação do estradiol não ocorre diretamente no lactotrofo, mas em mecanismos neurais que estimulam a produção destas células na adenohipófise na fase do estro (HASHI *et al.*, 1995).

Assim, alterações no pico pré-ovulatório de estradiol na tarde do proestro em ratas manipuladas poderiam influenciar a liberação de PRL em resposta ao estresse no estro. Resultados de nosso laboratório demonstraram que na tarde do proestro as ratas manipuladas apresentam uma menor concentração plasmática de estradiol quando comparadas às não-manipuladas (dados não publicados). Como dito anteriormente, de acordo com resultados prévios, os efeitos da manipulação neonatal não aparecem após gonadectomia ou durante a idade pré-puberal, situações onde os esteróides gonadais estão baixos (LUCION *et al.*, 1999). Assim, a menor concentração plasmática de estradiol, durante a tarde do proestro em ratas manipuladas, poderia contribuir para o não aparecimento do efeito da manipulação neonatal sobre a resposta da PRL ao estresse durante o estro.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As concentrações plasmáticas basais de PRL em ambos os grupos (não-manipuladas e manipuladas) aumentaram no decorrer da ontogenia, exceto em ratas não-manipuladas em estro, onde não ocorreu um aumento significativo da concentração plasmática de PRL dos 28 aos 75 dias de idade;

As concentrações plasmáticas basais de PRL nas ratas manipuladas não foram estatisticamente diferentes das não-manipuladas em todas as idades, com exceção das fêmeas pré-púberes, em que as manipuladas, apresentaram uma redução significativa da concentração plasmática de PRL em relação às não-manipuladas. Esta menor concentração de PRL em ratas manipuladas com 28 dias pode ser decorrente do retardo na instalação da puberdade, como previamente demonstrado (GOMES, 2001);

Nas fêmeas com 11 e 28 dias de ambos os grupos o estresse por éter não promoveu alterações nas concentrações plasmáticas de PRL. Este resultado sugere que a não-responsividade da PRL ao estresse se estende até a idade pré-puberal (28 dias);

A manipulação neonatal afeta a resposta da PRL ao estresse por éter apenas em fêmeas em diestro II. Este resultado sugere uma interação entre os efeitos da manipulação neonatal e esteróides gonadais na resposta da PRL ao estresse por éter.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVIS, J.P. & OJEDA, S.R. Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: ovarian site of action. **Endocrinology**, v. 103, p. 924-935, 1978.

ADVIS, J.P.; RICHARDS, J.S. & OJEDA, S.R. Hyperprolactinemia-induced precocious puberty: studies in the mechanisms by which prolactin enhances ovarian progesterone responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats. **Endocrinology**, v. 108, p. 1333-1342, 1981a.

ADVIS, J.P.; WHITE, S.S. & OJEDA, S.R. Delayed puberty induced by chronic suppression of prolactin release in the female rat. **Endocrinology**, v. 109, p. 1321-1330, 1981b.

ADVIS, J.P.; ANDREWS, S.R. & OJEDA, S.R. Studies on the central effect of prolactin in inducing precocious puberty in the female rat. **Brain Research Bulletin**, v. 8, p. 449-458, 1982.

AJIKI, K.; KRULICH, L.; FAWCETT, C.P. & McCANN, S.M. Effects of estrogen on plasma and pituitary gonadotropins and prolactin, and hypothalamic releasing and inhibiting factors. **Neuroendocrinology**, v. 9, p. 304-315, 1972.

AKEMA, T.; CHIBA, A.; OSHIDA, M.; KIMURA, F. & TOYODA, J. Permissive role of corticotropin-releasing factor in the acute stress-induced prolactin in the female rats. **Neuroscience Letters**, v. 198, p. 146-148, 1995.

ALVAREZ, E. O. Role of histamine in the increased secretion of prolactin induced by ether in adult male rats. **Journal of Endocrinology**, v. 95, p. 409-415, 1982.

- AMENOMORI, Y.; CHEN C.L. & MEITES, J. Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. **Endocrinology**, v. 86, p. 506-510, 1970.
- ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & McCANN, S.S. Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial pre-optic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. **Brain Research**, v. 767, p. 289-296, 1997.
- ARMARIO, A.; RESTREPO, C.; HIDALGO, J. & LOPEZ-CALDERÓN, A. Differences in prolactin and LH responses to acute stress between peribuberal and adult male rats. **Journal of Endocrinology**, v. 112, p. 9-13, 1987.
- BÁNKY, Z.; NAGY, G.M. & HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. **Neuroendocrinology**, v. 59, p. 63-71, 1994.
- BARKTE, A.; SMITH, M.S.; MICHAEL, S.D.; PERON, F.G. & DALTERIO, S. Effects of experimentally-induced chronic hyperprolactinemia on testosterone and gonadotropin levels in male rats and mice. **Endocrinology**, v. 100, p. 182, 1977.
- BECÚ, D. & LIBERTUN, C. Comparative maturation of the regulation of prolactin and thyrotropin by serotonin and thyrotropin-releasing hormone in male and female rats. **Endocrinology**, v. 110, p. 1879-1884, 1982.
- BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.M.; DÍAZ-TORGA, G.S. & LIBERTUN, C. Ontogenic studies of the neural control of adenohipophyseal hormones in the rat. II. Prolactin. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 12(1), p. 1-19, 1992.

- BEN-JONATHAN, N. Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. **Endocrine Review**, v. 6, p. 564-589, 1985.
- BOOCKFOR, F.R.; HOEFFLER, J.P. & FRAWLEY, L.S. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 250, p. 100-103, 1986.
- BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E. & FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, p. 1704-1708, 1974.
- CALIGARIS, L.; ASTRADA, J.J. & TALESNIK, S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. **Journal of Endocrinology**, v. 60, p. 205-215, 1974.
- CALIGARIS, L. & TALESNIK, S. Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, Sex and daily rhythm. **Acta Endocrinologica**, v. 102, p. 505-510, 1983.
- CHARCHAT, H., PADOIN, M.J. & LUCION, A. B. Efeito do estresse crônico neonatal sobre comportamentos de ratos adultos no campo aberto com o gato. **X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 46, 1995.
- CHEN, C.L. & MEITES, J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 86, p. 503-505, 1970.
- CHEN, H. T. Postnatal development of pituitary lactotropes in the rat measured by reverse hemolytic plaque assay. **Endocrinology**, v. 120, p. 247-253, 1987.

CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 267, p. 1244-12152, 1992.

CLEMENS, J.A.; MINAGUCHI, H.; STOREY, R.; VOOGT, J.L. & MEITES, J. Induction of precocious puberty in female rats by prolactin. **Neuroendocrinology**, v. 4, p. 150-156, 1969.

CONTI, L.H.; YOUNBLOOD, K.L.; PRINTZ, M.P. & FOOTE, S.L. Locus coeruleus electrophysiological activity and responsivity to corticotropin-releasing factor in inbred hypertensive and normotensive rats. **Brain Research**, v. 774, p. 27-34, 1997.

DeGREEF, 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**, v. 91, p. 213, 1981.

DEMAREST, K.T. & MOORE, K.E. Sexual differences in the sensitivity of tuberoinfundibular dopamine neurons to the actions of prolactin. **Neuroendocrinology**, v. 33, p. 230-234, 1981.

DEMAREST, K.Y.; MOORE, K.E. & RIEGLE, G.D. Acute restraint stress decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity: evidence for a differential response in male versus female rats. **Neuroendocrinology**, v. 41, p. 504-511, 1985.

DENT, G.W.; SMITH, M.A. & LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology**, v. 141, p. 1593-1598, 2000.

DOBRAKOVÁ, M. & JURCOVICOVÁ. Corticosterone and prolactin responses to repeated handling and transfer of male rats. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 83, p. 21-27, 1984.

DÖHLER, K. & WUTTKE, W. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. **Endocrinology**, v. 94, p. 1003-1008, 1974.

DÖHLER, K. & WUTTKE, W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. **Endocrinology**, v. 97, p. 898-907, 1975.

DONADIO, M.V.F.; SAGAE, S.C.; TEVIZAN, L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & SANVITTO, G.L. Microinjeção de losartan no núcleo arqueado (ARC) impede a resposta da prolactina (PRL) provocada pelo estresse em ratas adultas. **XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 262, 2001.

DUDLEY, C.A.; JAMISON, T.S. & MOSS, R.L. Inhibition of lordosis behaviour in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. **Endocrinology**, v. 110, p. 677-679, 1982.

ECK, J.B. & KUHN, C.M. Effect of ether stress on growth hormone during development in the neonatal rat. **Neuroendocrinology**, v. 56, p. 605-610, 1992.

ENNIS, M.; ASTON-JONES, G. & SHIEKHATTAR, R. Activation of *Locus coeruleus* neurons by nucleus paragigantocellular or noxious sensory stimulation is mediated by intracoerulear excitatory amino acid neurotransmission. **Brain Research**, v. 598, p. 185-195, 1992.

FENSKE, M. & WUTTKE, W. Development of stress-induced pituitary prolactin and TSH release in male rats. **Acta Endocrinologica**, v. 85, p. 729-735, 1977.

FOSSATI, I.A.M.; TREVIZAN, L. & LUCION, A.L. Interação entre esteróides gonadais e manipulação neonatal sobre comportamento de ratas adultas no labirinto em cruz elevado. **XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 210, 2000.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & McCANN, S.M. The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone and thyreoid-stimulation hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, p. 11391-11395, 1992.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & McCANN, S.M. The hypothalamic angiotensinergic neurons play a physiologically significant inhibitory role to suppress plasma prolactin, growth hormone and TSH but not ACTH by central action in ovariectomized rats. **Peptides**, v. 18, p. 971-976, 1997.

FRANCIS, D.D; DIORIO, J.; LIU, D. & MEANEY, M.J. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1153-1166, 1999.

FRANTZ, P.J., GOMES, C.M. & LUCION, A.B. Efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento sexual de ratas. **X Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Resumos... p. 225, 1998.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: **The Physiology of Reproduction**. Ed. E. Knobil and J. Neil et al. Raven Press, NY, cap. 45, p. 613-657, 1994.

FREEMAN, M.E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A. & NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1523-1631, 2000.

GALA, R.L. & HAISENLEDER, D.J. Stress-induces decrease of the afternoon prolactin surge. The influence of adrenal gland. **Life Sciences**, v. 31, p. 875-879, 1982.

GALA, R.L. & HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats. Influence of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterone. **Neuroendocrinology**, v. 43, p. 115-123, 1986.

GALA, R.L. The physiology and mechanisms of stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. **Life Sciences**, v. 46, p. 1407-1420, 1990.

GIBBS, D.M. & NEILL, J.D. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion In Vivo. **Endocrinology**, v. 102, p. 1895- 1900, 1978.

GOMES, C.M., FRANTZ, P.J., SANVITTO, G.L., ANSELMO-FRANCI, J.A. & LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1239-1242, 1999.

GOMES, C.M. Efeito da manipulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. Dissertação de Mestrado (Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

GONZÁLEZ, A.S.; ECHANDÍA, E.L.R.; CABRERA, R.; FÓSCOLO, M.R. & FRACCHIA, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. **Physiology and Behavior**, v. 47, p. 735-741, 1990.

GOODMAN, G.; LAWSON, M. & GALA, R.R. The effects of neurotransmitter receptor antagonists on ether induced prolactin release in ovariectomized, estrogen-treated rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 153, p. 225-239, 1976.

GRINO, M.; YOUNG, W.S. & BURGUNDER, J.M. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and the propiomelacortin gene in the rat pituitary. **Endocrinology**, v. 124, p. 60-68, 1989.

GUDELSKY, G.A.; NANSEL, D.D. & PORTER, J.C. Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. **Endocrinology**, v. 108(2), p. 440-444, 1981.

GUILLET, R.; SAFFRAN, M. & MICHAELSON. Pituitary-adrenal response in neonatal rats. **Endocrinology**, v. 106, p. 991-994, 1980.

GUNNET, J.W.; LOOKINGLAND, K.J. & MOORE, K.E. Comparison of the effects castration and steroid replacement on incertohypothalamic dopaminergic neurons on male and female rats. **Neuroendocrinology**, v. 44, p. 269,275, 1986a.

GUNNET, J.W.; LOOKINGLAND, K.J. & MOORE, K.E. Effects of gonadal steroids on tuberoinfundibular and tuberohypophysial dopaminergic neuronal activity in male and female rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 183, p. 49-98, 1986b.

HAISENLEDER, D.J.; ORTOLANO, G.A.; LANDEFELD, TD.; ZMELI, S.N. & MARSHALL, J.C. Prolactin messenger ribonucleic acid concentration in the 4-days cycling rats and during the prolactin surge. **Endocrinology**, v. 124, p. 2023-2028, 1989.

HARMS, P.G. & OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology**, v. 36, p. 391-392, 1974.

HASHI, A.; MAZAWA, S.; KATO, J. & ARITA, J. Pentobarbital anesthesia during the proestrous afternoon blocks lactotroph proliferation occurring on the estrus in female rats. **Endocrinology**, v. 136, p. 4665-4671, 1995.

HENTSCHEL, K.; FLECKENSTEIN, A.; TONEY, T.W.; LAWSON, D.M.; MOORE, K.E. & LOOKINGLAND, K.J. Prolactin regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons; immunoneutralization studies. **Brain Research**, v. 852, p. 28-36, 2000.

HESS, J., DENENBERG, V.H., ZARROW, M.X. & PFEIFER, W.D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. **Physiology and Behavior**, v. 4, p. 109-111, 1968.

HOEFFLER, J.P.; BOOCKFOR, F.R. & FRAWLEY, L.S. Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. **Endocrinology**, v. 117, p. 187-195, 1985.

HOLT, J.A.; RICHERDS, J.S.; MIDGLEY, R.A. & REICHERT, L.E. Effect of prolactin on LH receptor in rat luteal cells. **Endocrinology**, v. 98, p. 1005-1013, 1976.

JAHN, G.A. & DEIS, R.P. Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. **Journal of Endocrinology**, v. 110, p. 423-428, 1986.

JIMENEZ, A.E.; MEYER, D.C. & MURPHY, P.J. Developmental patterns of tyrosine hydroxylase activity in discrete central system regions and serum LH and prolactin in the prepubertal rat. **Neuroendocrinology**, v. 38, p. 134-138, 1984.

JORGENSEN, H.; KNIGGE, U. & WARBERG, J. Effect of serotonin 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃ receptor antagonists on the prolactin response to restraint and ether stress. **Neuroendocrinology**, v. 56, p. 371-377, 1992.

KAMBERI, I.A.; MICAL, R.S. & PORTER, J.C. Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. **Endocrinology**, v. 88, p. 1288-1293, 1971.

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**, v. 41, p. 529-531, 1985.

KNIGGE, U.; MATZEN, S. & WARBERG, J. Histaminergic mediation of stress-induced release of prolactin in male rats. **Neuroendocrinology**, v. 47, p. 68-74, 1988.

- KINSLEY, C.H. & BRIDGES, R.S. Prenatal stress reduces estradiol-induced prolactin release in male and female rats. **Physiology and Behavior**, v. 40, p. 647-653, 1987.
- KINSLEY, C.H.; MANN, P.E. & BRIDGES, R.S. Alterations in stress-induced prolactin release in adult female and male rats exposed to stress, in utero. **Physiology and Behavior**, v. 45, p. 1073-1076, 1989.
- KRIEG, R. J. JR.; LAMBERTS, S.W.J. & MACLEOD, R.M. Paradoxical suppression of prolactin secretion: involvement of catecholaminergic mechanisms and the adrenal gland. **Acta Endocrinologica**, v. 105, p. 463-467, 1984.
- KUHN, C.M., PAUK, J. & SCHANBERG, S. M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. **Developmental Pshychobiology**, v. 23, p. 395-410, 1990.
- LEE, C.Y. & RYAN, A.R. Estrogen stimulation of human chorionic gonadotropin binding by luteinized rat ovarian slices. **Endocrinology**, v. 95, p. 1691-1693, 1974.
- LENOX, R.H.; KANT, G.J.; SESSIONS, G.R.; PENNINGTON, L.L.; MOUGEY, E.H. & MEYERHOFF. Specific hormonal and neurochemical responses to different stressors. **Neuroendocrinology**, v. 30, p. 300-308, 1980.
- LEVINE, R.S., HALTMEYER, G.C. KARAS, G.G. & DENENBERG, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior**, v. 2, p. 55-59, 1967.

LEVINE, S., HUCTION, D.M., WIENER, S.G. & ROSENFELD, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant. **Developmental Psychobiology**, v. 24, p. 547-558, 1991.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 61-69, 1993.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 275-293, 1994.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 73, p. 255-260, 2001.

LIU, D.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S. *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, p. 1659-1662, 1997.

LIU, D.; CALDJI, C.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, p. 5-12, 2000.

LONG, J.A. & EVANS, H.M. The oestrus cycle in the rat and its related-phenomena. **Mem. Univer. Calif.**, v. 6, p. 1-148, 1992.

LUCION, A.B.; MACHADO, F.; TREVIZAN, L. & FOSSATI, I.A.M. Gonadectomy before puberty annuls the effects of neonatal handling on behavior of adult

males. **International Society for Developmental Psychobiology Annual**, 1999.

MACLEOD, R.M. & LEHMEYER. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. **Endocrinology**, v. 94, p. 1077-1085, 1974.

MARCHLEWSKA-KOJ, A. & KRULICH, L. The role of central monoamines in the stress-induced release of prolactin. **Federation Proceedings**, v. 34, p. 252, 1975.

MEADOR-WOODRUFF, J.H.; MANSOUR, A.; BUNZOW, J.R.; VAN TOL, H.H.M.; WATSON, S.J.J.R. & CIVELLI, O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 86, p. 7625-7628, 1989.

MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V. & PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 70-85, 1993.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; WIDDOWSON, J.; LaPLANTE, P.; CALDJI, C.; EEKL, J.R. & PLOTSKY, P.M. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 49-72, 1996.

MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B. & KOOLHAAS, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, p. 925-933, 1999.

MISTRETTA, Ch.M.; BRADLEY, R.M. Effects of early sensory experience on brain

and Behavioral development. In: Studies on the development of behavior and nervous System. **New York: Academic Press**, p. 215-246, 1978.

MOGUILEVSKY, J.A.; CARBONE, S. & SZWARCFARB, B. Changes in the effect of γ -aminobutyric acid on prolactin secretion during sexual maturation in female rats. **Endocrinology**, v. 131, p. 458-462, 1992.

MOHANKUMAR, P.S; MOHANKUMAR, S.M.; L.; QUADRI, S.K. & VOOGT, J.L. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopaminergic neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 42, p. 435-441, 1997.

MOHANKUMAR, P.S; MOHANKUMAR, S.M.; ARBOGAST, L.; QUADRI, S.K. & VOOGT, J.L. Effects of chronic hyperprolactinemia on tuberoinfundibular dopaminergic neurons. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p. 461-465, 1998.

MOYER, J.A. HERRENKOHL, L.R. & JACOBOWITZ, D.M. Effects of stress during pregnancy on catecholamines in discrete brain regions. **Brain Research**, v. 121, p. 385-393, 1977.

NEGRO-VILLAR, A.; KRULICH, L. & McCANN, M. Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. **Endocrinology**, v. 93, p. 660-664, 1973.

NEGRO-VILLAR, A. Maturation of stress-induced prolactin release in male rats: involvement of tuberohypophysial dopaminergic system. **Neuroendocrinology Letters**, v. 8, p. 79-85, 1983.

NEILL, J.D. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, v. 87, p. 1192-1197, 1970.

- NOEL, G.L.; SUH, H.K.; STONE, J.G. & FRANTZ, A. G. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other condition of stress. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 35, p. 840-851, 1972.
- NÚÑEZ, J.F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, M.; TOBEÑA, A. & FÉRNANDEZ-TERUEL, A. Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reativity to novelty and conflict. **Physiology and Behavior**, v. 60(5), p. 1355-1359, 1996.
- OJEDA, S.R.; JAMESON, H.E. & McCANN, S.M. Plasma prolactin levels in maturing intact and cryptorchid male rats: development of stress response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 151, p. 310-315, 1976.
- OJEDA, S.R.; ADVIS, J.P. & ANDREWS, W.W. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. **Federation Proceedings**, v. 39, p. 2365-2371, 1980.
- OLIVEIRA, M.C.; MORAES, J.T; BARROS, H.M.T. & BARBOSA-COUTINHO, L.M. Effect of estrogen and neuroleptics on prolactina secretion and immunoreactive prolactin cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 521-525, 1996.
- PADOIN, M.J., CADORE, L.P. & LUCION, A.B. Efeito do estresse crônico neonatal sobre comportamento sexual de machos e agressivo maternal de ratos. **X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 36, 1995.

PEREIRA, F.M.; WINKELMANN, E.C.; PEREIRA, G.A.M.; SANVITTO, G.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & LUCION, A.B. Efeito da manipulação neonatal sobre o número de neurônios do *Locus coeruleus* em ratas em várias idades. **XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 269, 2001.

POLETINI, M.O. Participação do *Locus coeruleus* na secreção de prolactina induzida por estresse em ratos machos e em fêmeas em diferentes condições hormonais. Dissertação de Mestrado em Fisiologia - Universidade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1998.

POLITCH, J.A. & HIERRENKOHL, L.R. Effects of ether stress on prolactin and corticosterone levels in prenatally-stressed male rats as adults. **Physiology and Behavior**, v. 20, p. 91-93, 1978.

PONTIROLI, A.E.; BAILO, G.; STELLA, L.; ET ALL. Effects of naloxene on prolactin, luteinizing hormone, and cortisol responses to surgical stress in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 55, p. 378-380, 1982.

PORTER, T.E. & FRAWLEY, L.S. Stimulation of prolactin differentiation in vitro by a milk-borne peptide. **Endocrinology**, v. 129, p. 2707-2713, 1991a.

PORTER, T.E.; CHAPMAN, L.E.; VAN DOLAH, F.M. & FRAWLEY, L.S. Normal differentiation of prolactin cells in neonatal rats requires a maternal signal specific to early lactation. **Endocrinology**, v. 128, p. 792-796, 1991b.

PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 18, p. 195-200, 1993.

- RAMALEY, J.A. & CAMPBELL, G.T. Serum prolactin concentrations in the adrenalectomized rat: relationships to puberty onset. **Endocrinology**, v. 101, p. 890-897, 1977.
- RAMALEY, J.A. Serum prolactin levels in the prepuberal period in the male and female rats. Control by photoperiod and gonadal status and relationship to puberty onset. **Internacional Journal of Andrology**, v. 4, p. 91-104, 1981.
- RAYMOND, V.; BEAULIEU, M.; LABRIE, F. & BOISSIER, J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. **Science**, v. 200, p. 1173, 1175, 1978.
- REITER, E. O. Neuroendocrine control mechanisms and the onset of puberty. **Annual Review of Physiology**, v. 44, p. 595-613, 1982.
- RICHARD, P.; MOOS, F. & FREUND-MERCIER, M.J. Central effects of oxytocin. **Physiology Reviews**, v. 71, p. 331-370, 1991.
- RIVIER, C.; BROWN, M. & VALE, W. Effect of neurotensin, substance P and morphine sulfate on the secretion of prolactin and growth hormone in the rat. **Endocrinology**, v. 100, p. 751-754, 1977a.
- RIVIER, C.; VALE, W.; LING, N.; BROWN, M. & GUILLEMIN, R. Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by β -endorphin. **Endocrinology**, v. 100, p. 238-241, 1977b.
- SAGAE, S.C.; DONADIO, M.V.F.; RAINEKI, C.; TREVIZAN, L.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & SANVITTO, G. Efeito da microinjeção de losartan no núcleo arqueado sobre a concentração de prolactina em resposta ao estresse em

ratas lactantes. **XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 161, 2001.

SAKLY, M. & KOCH, B. Ontogenetical variations of transcortin modulate glucocorticoid receptor function and corticotropic activity in the pituitary gland. **Hormone and Metabolic Research**, v. 15, p. 92-96, 1983.

SAPOLSKY, R.M. & MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanism and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews**, v. 11, p. 64-76, 1986.

SAPOLSKY, R.M. The physiological relevance or glucocorticoid endangerment of hippocampus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 294-307, 1994.

SEGGIE, J.A. & BROWN, G.M. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, p. 629-637, 1975.

SHAAR, C.J. & CLEMENS, J.A. The role of catecholamines in the release of anterior pituitary *In Vitro*. **Endocrinology**, v. 95, p. 1202-1212, 1974.

SHARPE, R.M. & MCNEILLY, A.S. The effect of induced hyperprolactinemia on Leydig cell function and LH-induced loss of LH-receptors in the rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 16, p. 19, 1979.

SHIN, S.H. Prolactin secretion in acute stress is controlled by prolactin releasing factor. **Life Sciences**, v. 25, p. 1829-1836, 1979.

- SHIN, S.H. Physiological Evidence for the existence of prolactin releasing factor: stress-induced prolactin secretion is not linked to dopaminergic receptors. **Neuroendocrinology**, v. 31, p. 375-379, 1980.
- SHULL, J.D. & GORSKI, J. Estrogen regulation of prolactin gene transcription in vivo: paradoxical effects of 17 β -estradiol dose. **Endocrinology**, v. 124, p. 279-285, 1989.
- SIECK, G. & RAMALEY, J.A. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. **Physiology and Behavior**, v. 15, p. 487-489, 1975.
- SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E. & NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, p. 219-226, 1975.
- SMITH, M.A.; KIM, S-Y.; VAN OERS, H.J..J. & LEVINE, S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. **Endocrinology**, v. 138, p. 4622-4628, 1997.
- SUCHECKI, D.; MOZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P. & LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the rat infant. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 204-212, 1993.
- SVARE, B.; BARTKE, A.; MASON, I.; MICHAEL, S.D. & SMITH, M.S. Hyperprolactinemia suppresses copulatory behavior in male rats and mice. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 529, 1979.
- SZAWKA, R.E.; POLETINI, M. de O.; FRANCI, C.R. & ANSELMO-FRANCI, J.A. Estudo do pico secundário de prolactina na tarde de estro: participação do

estradiol e do Locus coeruleus. **XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 204, 2000.

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

TODESCHINI, A. S. & LUCION, A. B. Efeito da manipulação neonatal e separação dos filhotes sobre o comportamento maternal de ratas. **XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos...p. 262, 2001.

TURPEN, C.; JOHNSON, D.C. & DUNN, J.D. Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. **Neuroendocrinology**, v. 20, p. 339-351, 1976.

VALENTINO, R.J. & FOOTE, S.L. Activation of noradrenergic Locus coeruleus by hemodynamic stress in due to local release of corticotropin-releasing factor. **Brain Research**, v. 555, p. 25-34, 1991.

VASQUEZ, J.M.; NAZIAN, S.J. & MAHESH, V.B. Pituitary sensitivity to LHRH in hyperprolactinemia induced by perphenazine and renal pituitary transplants in female rats. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 486-492, 1980.

WALKER C-L.; PERRIN, M.; VALE, W. & RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 118, p. 1445-1451, 1986.

WAKABAYASHI, I; ARIMURA, A. & SCHALLY, A .V. Effect of pentobarbital and ether stress on serum prolactin levels in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 137, p. 1193-1198, 1971.

WUTTKE, W.; DÖHER, K. & GELATO, M. Oestrogens and prolactin as possible regulators of puberty. **Journal of Endocrinology**, v. 68, p. 391-396, 1976.