

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 11 (4)

August 2018

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=415&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Efeito do estresse sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas no estro

Effect of stress on the secretion of prolactin in nulliparous and primiparous rats in estrus

C. Z. Carlos¹, T. V. Souza², R. C. A. Berber², E. E. T. S. Hucke¹

¹UNIFEOB - Centro Universitário Octávio Bastos

²Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

Author for correspondence: thiagov_souza@hotmail.com

Resumo. A experiência reprodutiva (conjunto de gestação, parto e lactação), está associada a alterações na secreção de hormônios, reduzindo hormônios como os esteroides e a prolactina. A prolactina possui importante papel no processo reprodutivo, principalmente na lactação, controlando a produção e a composição do leite. Este hormônio responde aos estímulos estressores, sendo a intensidade da resposta dependente das concentrações sanguíneas de prolactina antes do estresse. O estresse é um mecanismo fisiológico adaptativo, porém, quando se perde o controle sobre ele, podem ocorrer diversas alterações prejudiciais à saúde do indivíduo. Relacionando esses fatos, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do estresse na secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas durante o estro, dando continuidade a estudos anteriores.

Palavras chaves: Estresse. Experiência reprodutiva. Prolactina.

Abstract. The reproductive experience (pregnancy, childbirth and lactation), is associated with changes in hormone secretion, reducing hormones like prolactin and steroids. Prolactin has an important role in the reproductive process, especially during lactation, controlling production and milk composition. This hormone responds to stressors stimulus, being dependent on the intensity of the response of blood concentrations of prolactin before stress. Stress is a physiological adaptive mechanism, however, when you lose control of it, there may be several harmful changes the individual's health. Relating these facts, the aim of this study is to evaluate the influence of stress on the secretion of prolactin in nulliparous and primiparous rats during estrus, continuing previous studies.

Keywords: Stress. Prolactin. Reproductive experience.

Introdução

O estresse foi descrito como uma tentativa de adaptação de um sistema biológico, podendo ser definido como uma “resposta não específica do organismo a qualquer demanda” (SELYE, 1973). O estímulo estressor induz alterações de sensibilidade às catecolaminas, que mobilizam energia para os músculos, coração e cérebro, pois estes são órgãos importantes para responder a tal estímulo. Também podem ocorrer variações na intensidade da resposta estressora, isto devido à qualidade e intensidade do

agente indutor do estresse, sexo e fase do ciclo reprodutivo (BIANCHI et al., 2001). Recentemente, tem sido revelado que a experiência reprodutiva em fêmeas, ou seja, a soma dos períodos de gestação, parto e lactação, podem modificar a sensibilidade ao estresse (WARTELLA et al., 2003; BYRNES e BRIDGES, 2006; LEITE, 2007; ALVISI et al., 2010).

A adenohipófise produz diversos hormônios, entre eles a prolactina, que desempenha importante função na manutenção da lactação, regulando a produção e a composição do leite (CUNNINGHAM,

1999). Estudos demonstram que o estresse pode aumentar os níveis de prolactina plasmáticos em humanos e animais, incluindo os ratos (NOEL et al., 1972). O estresse por contenção é um dos estímulos estressores mais utilizados para estudos, pois leva a uma alta liberação de prolactina (NONAKA, 1999). Sabe-se que as alterações da concentração de prolactina circulante em fêmeas com experiência reprodutiva (primíparas) são menores (MUSEY et al., 1987 a e b), além de apresentarem uma resposta neuroendócrina de secreção de prolactina com menor intensidade quando comparadas às nulíparas (BRIDGES et al., 1993).

Considerando, então, que a experiência reprodutiva pode modificar a secreção de prolactina em resposta ao estresse agudo por contenção como demonstrado em nossos estudos anteriores (BOCHINI, 2004; ALVISI et al., 2010), o presente projeto pretende dar continuidade a esses estudos de forma a avaliar a influência do ciclo estral sobre a secreção de prolactina induzida pelo estresse em função da experiência reprodutiva, uma vez que essa hipótese foi testada apenas no proestro até o presente momento.

Este trabalho objetivou estudar as concentrações de prolactina durante a primeira hora após o início de uma sessão de estresse agudo, comparando ratas primíparas e nulíparas no estro.

Métodos

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar obtidas no biotério do Curso de Medicina Veterinária da UNIFEOP. Tais animais foram alojados em biotério de temperatura controlada (20 a 23°C) por meio de aparelhos foram de ar condicionado, com ciclos de luz de 12 horas de claro/escuro, com luz ligada às 6:00 h. Água e comida ad libitum.

No experimento foram utilizadas ratas nulíparas e primíparas da mesma idade, obtidas a partir de um grupo inicial de animais, que foi dividido em dois, sendo um deles acasalado, passando por uma experiência reprodutiva (gestação, parto, lactação, desmame) e finalmente um período de descanso de 15 dias antes do início do procedimento experimental. O outro grupo (nulíparas) permaneceu aguardando todo este período de preparação das primíparas.

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

Indução do estresse

As fêmeas nulíparas e primíparas foram submetidas a 2 tipos de estresse de acordo com o delineamento experimental. O primeiro tipo de estresse foi realizado por meio de uma injeção

subcutânea de formalina diluída a 4% (0,2 ml formalina 4%/100 g peso, s.c.).

No segundo tipo de estresse, o animal foi contido colocando-o dentro de um tubo de PVC de 6,5 cm de diâmetro e 13 cm de comprimento de maneira que o animal fique imóvel, sendo suas extremidades fechadas e com orifícios para permitir a respiração dos animais.

Amostras de sangue foram colhidas durante o período de 1 hora após o início da sessão de estresse.

Técnica cirúrgica para canulação da jugular

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

Quantificação das concentrações séricas de prolactina

O sangue da jugular foi colhido após a cirurgia de canulação, sendo centrifugado (CIENTEC CT- 5000R) sob refrigeração (3 a 4°C, 914 a 1112 g/min) para obtenção do soro, o qual foi armazenado em tubos eppendorf (duas alíquotas de 1,5 ml) a (-20°C) até as dosagens hormonais. Todas as colheitas de sangue foram realizadas entre 9:00 e 12:00 horas.

O padrão, hormônio para iodação e o anti-soro que foram utilizados no radioimunoensaio da prolactina foram fornecidos pelo National Institute of Arthritis, Diabets and Digestive Diseases & Kidney (NIADDK) através da National Pituitary Agency (Baltimore, Maryland, USA). A preparação da prolactina de referência foi a NIADDK-r-PROLACTINA-RP-3 (5µg/ml). Os ensaios de todas as amostras, em duplicata, foram A B realizados no Laboratório de Dosagens do Departamento de Fisiologia de Medicina da USP, campus de Ribeirão Preto, ao final dos procedimentos experimentais. O ensaio para a quantificação das concentrações séricas de prolactina por radioimunoensaio foi realizado somente quando todas as amostras já

estiverem coletadas, evitando-se assim a variação interensaios, além de uma significativa economia de material.

Citologia vaginal

A determinação do ciclo estral foi realizada com o objetivo de padronizar a fase do ciclo estral durante os procedimentos experimentais. O diagnóstico da fase do ciclo estral foi realizado por observações microscópicas diárias do lavado vaginal. Este foi realizado sempre no mesmo horário, pois o ciclo estral sofre influência de picos hormonais e dos ritmos circadianos, responsáveis pelas diferenças histológicas entre as fases e que ocorrem em intervalos regulares de tempo.

Foi utilizado 20µl de solução salina (NaCl 0,9%), aplicada com auxílio de pipeta na vulva das fêmeas previamente contidas. O líquido aplicado e aspirado logo em seguida foi colocado sobre uma lâmina para ser avaliado sob microscópio óptico. Foram identificadas as células típicas de cada fase do ciclo estral: no proestro, observando-se uma grande quantidade de células epiteliais nucleadas globosas, leucócitos e células queratinizadas; no estro, grande quantidade de células de descamação queratinizadas anucleadas; no metaestro, uma grande quantidade de leucócitos.

Delineamento experimental

EXPERIMENTO 1: influência da experiência reprodutiva sobre a secreção de prolactina induzida pela injeção aguda de formalina no estro.

Após a obtenção de fêmeas nulíparas (n= 10) e primíparas (n= 10), estes 2 grupos experimentais foram submetidos à cirurgia para implantação das cânulas jugulares como descrito anteriormente. Após um período de recuperação pós-cirúrgica de 2 dias foi realizado o acompanhamento do ciclo estral diariamente até que seja observado a fase do estro. Nesse dia, foram colhidas amostras de sangue (400 µl) 10 min antes da aplicação do estresse e aos 1, 2, 5, 10, 15, 30 e 60 min após a injeção única de solução de formalina (0,2 ml formalina 4%/100 g peso, s.c.) entre 09:00 e 12:00 h da manhã. As amostras assim colhidas foram centrifugadas e congeladas para posterior quantificação da prolactina sérica.

EXPERIMENTO 2: influência da experiência reprodutiva sobre a secreção de prolactina durante a aplicação do estresse por contenção no estro.

Após o período de recuperação pós-cirúrgica (2 dias), as fêmeas nulíparas (n= 10) e primíparas (n= 10), foram submetidas ao estresse por contenção durante 1 hora, entre 09:00 e 12:00 h da manhã (Figura 9), após a avaliação da fase do ciclo estral, como descrito anteriormente. No dia do estro foram colhidas 8 amostras de sangue da jugular (400 µl)

como descrito no experimento 1. Foi colhida também uma amostra basal 10 min antes do início da aplicação do estresse. As amostras também foram centrifugadas e congeladas para posterior quantificação da prolactina sérica.

Análise estatística

As médias da concentração sérica de prolactina das amostras seriadas dos grupos de nulíparas e primíparas, obtidas nos experimentos 1 e 2 foram comparados utilizando-se uma ANOVA de Medidas Repetidas (SAS Statistical Analysis System) para observar-se possíveis modificações da resposta da prolactina induzida pelo estresse em função da experiência reprodutiva.

Resultados e discussão

As quantificações de prolactina sérica não revelaram diferenças significantes entre os grupos estudados para ambos os tipos de estresse induzido durante o estro, o que pode ser observado na Figura 1.

Não encontramos diferenças significantes entre os grupos de fêmeas primíparas em relação às nulíparas no estro, diferentemente do que foi observado anteriormente durante a fase de proestro quando então encontramos diferenças significantes em função da experiência reprodutiva, bem como em relação ao tipo de estresse empregado (ALVISI et al., 2010).

O estresse provocado pela injeção de formalina no proestro não teve efeito sobre a secreção de prolactina no período de uma hora após sua aplicação, tanto em nulíparas quanto em primíparas (ALVISI et al., 2010). No entanto, o estresse por contenção provoca um pico que se inicia aos dez minutos após o início da sessão de estresse. Esse pico é mais intenso no grupo das primíparas, estando de acordo com observações anteriores (WARTELLA et al., 2003; BYRNES e BRIDGES, 2006; BOCHINI, 2004) que mostram que fêmeas experientes ou primíparas são menos sensíveis ao estresse (BRIDGES et al., 1993; LEITE, 2007, BRIDGES 1993; MANN, 1992; MUSEY, 1987 a,b).

A prolactina por sua vez tem efeito ansiolítico conhecido, especialmente durante a lactação (DONADIO et al., 2005). Em fêmeas não lactantes, esse efeito também já foi observado (BRIDGES et al., 1993). O estresse provoca a liberação de aminas, como a noradrenalina e histamina, que atuam sobre as células dos lactotrofos nos receptores α_2 e H2, respectivamente, de forma a aumentarem a secreção de prolactina. Esse mecanismo pode estar envolvido com a elevação dos níveis circulantes de prolactina com maior intensidade em primíparas durante o estresse por contenção, e maior efeito ansiolítico nesse grupo e, conseqüentemente, maior tolerância ao estresse em primíparas.

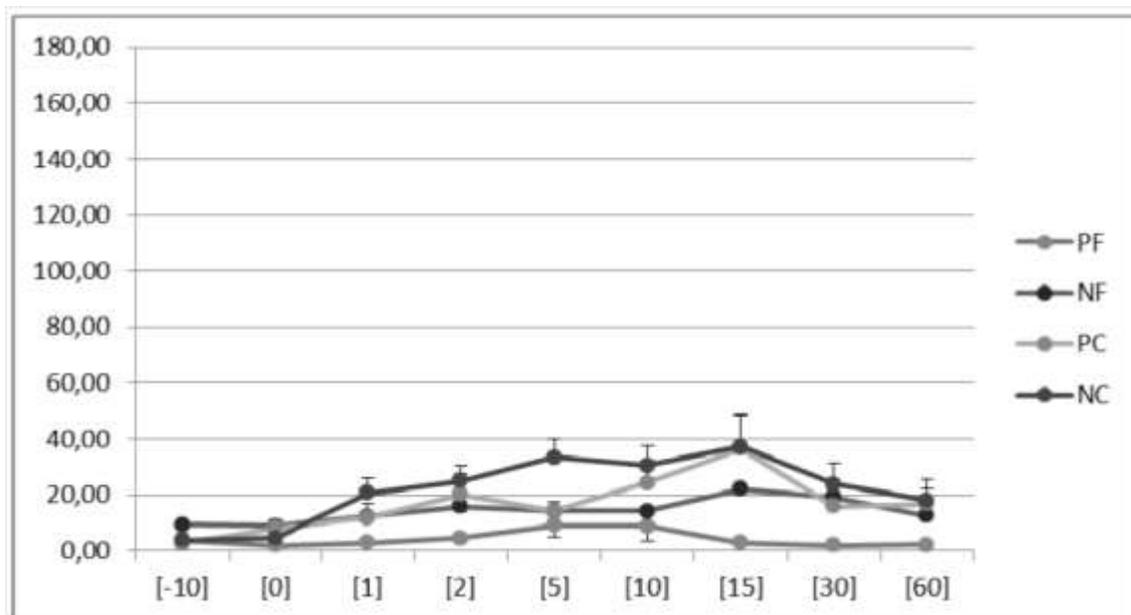


Figura 1.

Concentração (ng/ml) de prolactina sérica obtidas em fêmeas nulíparas ou primíparas no estro durante a sessão de estresse após a injeção de formalina (NF e PF) ou por contação (NC e PC). Médias \pm SEM.

Assim também, o aumento da prolactina plasmática induz a um aumento na atividade dos neurônios do sistema tuberoinfundibular (TIDA), resultando em inibição da liberação de dopamina controlando assim a secreção da mesma durante o estresse. Em primíparas, níveis basais diminuídos de prolactina sérica (MUSEY, 1987 a, b) seriam decorrentes de um aumento do tônus dopaminérgico dos neurônios TIDA consequente a experiência reprodutiva (BRIDGES et al., 1997), e assim seria possível sugerir não ocorreria inibição da síntese de prolactina nos lactotrofos, mas talvez apenas sua liberação, sendo o estímulo do estresse capaz de promover a liberação de uma quantidade maior quando comparada a fêmeas nulíparas. Além disso, os lactotrofos são células sofrem influências de vários outros hormônios ou interagir com outras células adenohiposárias incluindo a ocitocina, que teria efeito estimulatório sobre a secreção de prolactina pelos lactotrofos no proestro.

Os esteróides ovarianos por sua vez modulam a liberação da prolactina induzida pelo estresse, de forma que durante o estro os picos de liberação de prolactina pós-stress são menos intensos (POLETINI et al., 2006), assim como a regulação da secreção de prolactina em função da fase do ciclo estral é bem conhecida (NEIL et al., 1971; CALIGARIS et al., 1974). Esse mesmo efeito foi observado em nosso experimento, ou seja, a redução da resposta neuroendócrina de secreção de prolactina no estro em comparação ao proestro. No entanto, não se encontrou o possível efeito da experiência reprodutiva nesse cenário com mais um

fator que modularia a secreção de prolactina provocada pelo estresse induzido no estro, como observado anteriormente em nosso laboratório durante o proestro, o que poderia ter ocorrido em consequência da fase do ciclo estral.

Conclusões

Conclui-se que a experiência reprodutiva pode modular a secreção de prolactina após o estresse induzido, mas esse efeito é dependente da fase do ciclo estral.

Referências

ALVISI, R.D.; HUCKE, E.E.T.S.; FELÍCIO, L.F.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Efeito do Estresse Agudo e Prolongado Sobre a Secreção de Prolactina em Ratas Nulíparas e Primíparas. *Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli*. Anais. v.4, p.77-78, 2010.

BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à norepinefrina em ratas no proestro. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.37, n.3, p.391-398, 2001.

BOCHINI, J. C.; Efeito da adrenalectomia sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas. Monografia de Conclusão de Curso. Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina Veterinária, UNIFEOB, SP. Fapesp Proc. 03/01887-7, 2004.

- BRIDGES, R. S.; BYRNES, E. M. Reproductive experience reduces circulating 17β - estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology*, v. 147, n. 5, p. 2575-2582, 2006.
- BRIDGES, R. S.; FELICIO, L. F.; PELLERIN, L. J.; STUER, A. M.; MANN, P. E. Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. *Life Science*, n. 53, p. 439-445, 1993.
- BYRNES, E.M.; BRIDGES, R.S. Reproductive experience alters anxiety-like behavior in the female rat. *Hormones and Behavior*, n. 50, p. 70-76, 2006.
- CALIGARIS, L.; ASTRADA, J.J.; TALEISNIK, S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J. Endocrinol.*, 60: 205-215, 1974.
- CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.
- DONADIO, M.V.F.; SANVITTO, G.L.; LUCION, A.B. Efeito do Estresse Agudo e a Participação do Sistema Angiotensinogenio Sobre a Função Reprodutivas em Ratas: Comportamento Sexual, Ovulação e Lactação. *Dissertação*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.
- LEITE, C. B. Efeito do estresse agudo e prolongado sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas. *Monografia de Conclusão de Curso*. Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina Veterinária, UNIFEOP, SP. Fapesp: Proc. 04/15197-5R, 2007.
- MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Neural and endocrine sensitivities to opioids decline as a function of multiparity in the rat. *Brain Research*, n. 580. p. 241-248. 1992.
- MUSEY, V. C.; COLLINS, D. C.; BROGAN, D. R.; SANTOS, V. R.; MUSEY, P. I., MARTINO-SALTZMAN, D.; PREEDY, J. R. K. Long term effects of the first pregnancy on the hormonal environment: estrogens and androgens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 64, p. 111-118, 1987a.
- MUSEY, V. C., COLLINS, D. C.; MUSEY, P. I.; MARTINO-SALTZMAN, D.; PREEDY, J. R. K. Long-term effect of a first pregnancy on the secretion of prolactin. *New England Journal of Medicine*, v. 316, p. 229-234, 1987b.
- NEIL, J.D.; FREEMAN, M.E.; TILLSON, S.A. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology*, 89: 1448- 1453, 1971.
- NOEL, G. L.; SUH, H. K.; STONE, J. G.; FRANTZ, A. G. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. n. 35, p. 840-851, 1972.
- NONAKA, K.O. Involvement of 5-HT₃ receptors in the prolactin release induced by immobilization stress in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Boil. Psychiatry*, v. 23, p. 497-503, 1999.
- POLETINI, M.O.; SZAWKA, R.E.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Ovarian steroids but not locus coeruleus regulate stress-induced prolactin secretion in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 18: 938-948, 2006.
- SELYE, H. The evolution of the stress concept. *American Scientist*, v. 61, p. 692-699, 1973.
- WARTELLA, J.; AMORY, E.; MACBETH, A. H.; STEVENS, L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H.; Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. *Physiology & Behavior*, v. 79, p. 373-381, 2003.