

Universidade Federal de Minas Gerais

Patrícia Costa Henriques

**Mecanismos neuroendócrinos envolvidos no controle da secreção de
prolactina e em sua ação ansiolítica**

Belo Horizonte

2021

Patrícia Costa Henriques

Mecanismos neuroendócrinos envolvidos no controle da secreção de prolactina e em sua ação ansiolítica

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Raphael Escorsim

Szawka

Belo Horizonte

2021

043 Henriques, Patrícia Costa.
 Mecanismos neuroendócrinos envolvidos no controle da secreção de prolactina e em sua ação ansiolítica [manuscrito] / Patrícia Costa Henriques. – 2021.
 113 f. : il. ; 29,5 cm.

 Orientador: Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

 1. Fisiologia. 2. Prolactina. 3. Estradiol. 4. Dopamina. 5. Adeno-Hipófise. 6. Ocitocina. 7. Ansiedade. I. Szawka, Raphael Escorsim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 352 DE PATRÍCIA COSTA HENRIQUES

Às 14:00 horas do dia **15 do mês de dezembro de 2021**, transmitida por webconferência pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Patrícia Costa Henriques**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura**, DCFIS/Universidade do Estado do Rio de Janeiro, **Prof. Dr. José Donato Júnior**, ICB/Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Lício Augusto Velloso**, FCM/Universidade Estadual de Campinas, e **Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Mecanismos Neuroendócrinos Envolvidos No Controle da Secreção de Prolactina e Em Sua Ação Ansiolítica**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Escorsim Szawka, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2021, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2021, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Egberto Gaspar de Moura, Usuário Externo**, em 15/12/2021, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Donato Junior, Usuário Externo**, em 18/12/2021, às 05:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lício Augusto Velloso, Usuário Externo**, em 28/12/2021, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1142086** e o código CRC **7376A23E**.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pelo amor incondicional diário.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho e ser meu suporte.

A minha mãe, por transbordar amor e otimismo todos os dias, nunca me deixando desanimar.

Ao meu pai, por sempre me incentivar a crescer na vida e apoiar, com muito amor, as minhas decisões.

Ao Matheus, por ser fonte infinita de amor e carinho, e por nunca me deixar desistir dos meus objetivos.

Ao Raphael, por ser um orientador excepcional, presente e humano. Obrigada pelos ensinamentos e lições de vida durante esses mais 8 anos de convivência.

Aos membros da banca examinadora, professores Fabrício de Araújo Moreira, Egberto Gaspar de Moura, José Donato Junior e Lício Augusto Velloso, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Ao professor Márcio Moraes nos ceder o espaço para realização dos experimentos comportamentais, e o pós-doutorando Leonargo Guarnieri por me ensinar e auxiliar na realização dos testes.

À Nayara e Roberta por me receberem calorosamente no laboratório em 2013, quando eu ainda não sabia nem segurar um rato! Obrigada por me ensinarem tanto e pela amizade!

Ao Juneo, por me ensinar tanto sobre o PCR e pela amizade.

À Dani e à Kaoma, por serem pessoas maravilhosas que tive a sorte de conhecer durante a minha caminhada acadêmica, e que hoje posso chamar de amigas.

Aos professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Adelina, Cândido, Maristela, Paula e Glauber, por todos os ensinamentos e por sempre estarei dispostos a ajudar no que fosse preciso.

Ana Clara, Paola, Fernanda, Lucas, Helton, Gleisy, André, Sandra, Paloma e por todas as pessoas que passaram pelo Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, tornando o meu dia-a-dia mais divertido e leve.

À secretaria de pós-graduação da Fisiologia, por se mostrarem sempre muito prestativos e por resolverem meus problemas com muita presteza.

Aos animais, pelo sacrifício.

Aos bioteristas, por serem sempre tão cuidadosos e prestativos.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

A prolactina (PRL) é um hormônio adenohipofisário que exerce diversas funções além do seu papel essencial na lactação, como a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) e do comportamento do tipo ansioso. No presente trabalho, investigamos mecanismos neuroendócrinos relacionados a essas duas funções da PRL. No primeiro estudo, avaliamos o mecanismo envolvido no pico da secreção de PRL induzido pelo estradiol (E2). Ratas ovariectomizadas (OV) foram tratadas com óleo ou com duas doses de E2, que resultam em níveis fisiológicos baixos (OVE-4) ou altos (OVE-80) deste hormônio. Ambas as doses de E2 promoveram picos na secreção de PRL de modo semelhante ao proestro (PRO), o que não ocorreu em ratas OV ou em diestro (DI). A atividade enzimática dos neurônios dopaminérgicos, medida pela marcação da tirosina hidroxilase (TH) fosforilada, apresentou-se diminuída apenas nas ratas OVE-80, mas não diferiu entre as ratas em DI e PRO, o que mostra que mudança nessa atividade não é determinante para gênese do pico de PRL. A análise da expressão de c-Fos na área pré-óptica, no núcleo periventricular e no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo também não demonstrou ativação neuronal relacionada ao aumento da secreção de PRL. Entretanto, análise neuroquímica das concentrações de dopamina (DA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) revelou um padrão de redução diária na atividade dos terminais dopaminérgicos neuroendócrinos independentemente dos níveis de E2. Por outro lado, ambas as doses de E2 foram capazes de alterar a expressão de genes chave para o controle da PRL na adenohipófise, incluindo redução do receptor dopaminérgico D2 e aumento do receptor para ocitocina (OT). Assim, estes dados sugerem que o pico de PRL induzido por E2 em ratas depende essencialmente da redução diária no tônus inibitório dopaminérgico associada ao efeito do E2 de alterar a responsividade dos lactotrofos aos inputs inibitórios e estimulatórios

hipotalâmicos. O segundo estudo de nosso trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da PRL sobre a ansiedade, e os possíveis mecanismos centrais envolvidos nesta ação. O tratamento intracerebroventricular de ratos com PRL confirmou seu efeito ansiolítico, o qual observamos ter um perfil de dose resposta em U invertido e não depender da presença de esteroides sexuais. Análise imunohistoquímica para proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 5 (STAT5) fosforilada revelou que, dentre as áreas cerebrais responsivas à PRL, os neurônios do PVN foram os que apresentaram o mesmo perfil dose resposta que o efeito ansiolítico. A administração de antagonistas para os receptores de PRL e de OT bloquearam o efeito ansiolítico da PRL, mostrando que a ativação de ambos é essencial na mediação desse efeito. Finalmente, a avaliação da imunorreatividade à Fos em ratos submetidos ao estresse por contenção demonstrou que, de fato, a ativação do PVN frente ao estresse é bloqueada pela PRL. Desse modo, nosso estudo demonstra que a ação ansiolítica da PRL é mediada pela inibição da atividade do PVN e que os neurônios OT possuem papel essencial neste mecanismo.

Palavras-chave: Prolactina, estradiol, dopamina, hipófise anterior, ocitocina, ansiedade, núcleo periventricular

ABSTRACT

Prolactin (PRL) is a pituitary hormone that exerts many functions besides its essential role in lactation, such as the modulation of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis and anxious behavior. In the present work, we investigated the neuroendocrine mechanisms related to these two functions of PRL. In the first study, we evaluated the mechanism involved in estradiol (E2)-induced PRL surge. Ovariectomized (OV) rats were treated with oil or two doses of E2, which resulted in low (OVE-4) and high (OVE-80) physiological levels of this hormone. Both E2 doses promoted surges in PRL secretion similarly to proestrus (PRO), which did not occur in OV or diestrus (DI) rats. The enzymatic activity of dopaminergic neurons, measured by phosphorylated tyrosine hydroxylase (TH) labeling, was reduced only in OVE-80 rats, but did not differ between DI of PRO, which indicated that change in this activity is not determinant for the PRL surge genesis. Analysis of c-Fos expression in the preoptic area, periventricular nucleus and paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus also did not demonstrate neuronal activation related to increased PRL secretion. However, neurochemical analysis of dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) concentrations revealed a pattern of daily reduction in the activity of neuroendocrine dopaminergic terminals regardless of E2 levels. On the other hand, both E2 doses were able to alter the expression of key genes for the control of PRL in the pituitary, including reduction of D2 receptor and increase of oxytocin (OT) receptor. Thus, these data suggest that the E2-induced PRL surge in female rats depends essentially on the daily reduction in dopaminergic inhibitory tone associated with E2 effect of altering lactotrophs responsiveness to hypothalamic inhibitory and stimulatory inputs. The second study of our work aimed to evaluate the effect of PRL on anxiety, and the possible central mechanisms involved in this action. Intracerebroventricular treatment of

rats with PRL confirmed its anxiolytic effect, which we observed to have dose-response in inverted U profile, and does not depend on the presence of sex steroids. Immunohistochemical analysis of phosphorylated transducer and activator of transcription proteins 5 (STAT5) revealed that, among the brain areas responsive to PRL, PVN neurons were the ones that presented the same dose-dependent profile of its anxiolytic effect. Administration of antagonists for PRL and OT receptors blocked PRL anxiolytic effect, showing that the activation of them both is essential in mediating this effect. Finally, the evaluation of Fos immunoreactivity in rats subjected to restraint stress demonstrated that, in fact, PVN activation in response to stress is blocked by PRL. Thus, our study demonstrates that PRL anxiolytic action is mediated by the inhibition of PVN activity and that OT neurons play an essential role in this mechanism.

Key-words: Prolactin, estradiol, dopamine, pituitary, oxytocin, anxiety, periventricular nucleus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos do estradiol (E2) sobre a secreção de prolactina (PRL).....	39
Figura 2: Efeitos do E2 sobre a fosforilação da tirosina hidroxilase (TH) na eminência mediana (ME).....	41
Figura 3: Imagens representativas dos efeitos do E2 na expressão de c-Fos na área pré-óptica medial (MPA) e núcleo periventricular (PeN) e dupla marcação Fos/OT no núcleo paraventricular (PVN).....	43
Figura 4: Efeitos do E2 na expressão de c-Fos na MPA e PeN, e dupla marcação Fos/OT no PVN.....	44
Figura 5: Diferentes concentrações de E2 não interferem no padrão diário de atividade dopaminérgica na ME e no lóbulo neurointermediário da hipófise (NIL).....	46
Figura 6: Efeitos do E2 na expressão de genes relacionados ao controle da PRL na adenohipófise.....	48
Figura 7: Efeito do tratamento com agonistas seletivos para ER α e ER β sobre a secreção de PRL e seus efeitos uterinos.....	50
Figura 8: Modelo proposto do controle do pico de PRL induzido por E2.....	63
Figura 9: Efeito de diferentes doses de PRL sobre o comportamento do tipo ansioso medido pelo labirinto em cruz elevado (LCE).....	79
Figura 10: Efeito de diferentes doses de PRL sobre o comportamento do tipo ansioso medido pelo teste de neofagia.....	81
Figura 11: Testosterona não interfere na ação ansiolítica da PRL medida pelo LCE....	83

Figura 12: Efeito do tratamento com testosterona no peso da próstata e da vesícula seminal.....	84
Figura 13: Efeito de diferentes doses de PRL sobre a fosforilação de STAT5 (pSTAT5) na MPA e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo.....	86
Figura 14: Efeito de diferentes doses de PRL sobre a expressão de pSTAT5 e OT no PVN.....	88
Figura 15: Mapeamento da expressão neural de pSTAT5 em resposta à PRL em doses que causam ou não efeito ansiolítico.....	89
Figura 16: Efeito dos antagonistas de PRL (S179D) e de OT (ATO) na ação ansiolítica da PRL.....	91
Figura 17: Efeito do S179D na imunorreatividade de Fos no ARC de ratos submetidos ao estresse por contenção.....	93
Figura 18: Efeito do S179D na imurreatividade de Fos no PVN de ratos submetidos ao estresse por contenção.....	94
Figura 19: Proposta do mecanismo neuroendócrino da ação ansiolítica da PRL.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes e sequências de nucleotídeos dos primers utilizados no RT-PCR tempo real.....	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARC – núcleo arqueado do hipotálamo

ATO – atosiban

AUC – área sob a curva

BSA – albumina bovina

CRH – hormônio liberador de corticotrofinas

DA – dopamina

DI – diestro

DMH – núcleo hipotalâmico dorsomedial

DOPAC – ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DPN – diarilpropionitrilo

DZP – diazepam

D2r – receptor para dopamina do tipo 2

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

ERs – receptores para estrógenos

E2 – Estradiol

HPG – eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

HPLC-ED – cromatografia líquida de alta eficiência e detecção eletroquímica

i.c.v. – intracerebroventricular

i.m. – intramuscular

i.p. – intraperitoneal

LCE – labirinto em cruz elevado

ME – eminência mediana

MPA – área pré-óptica medial

mRNA – RNA mensageiro

NIL – lóbulo neurointermediário da hipófise

oPRL – prolactina ovina

ORX – orquiectomizado

OT – ocitocina

OT-R – receptor de ocitocina

OV – ovariectomizada

OVE – ovariectomizada tratada com estradiol

PeN – núcleo periventricular do hipotálamo

PHDA – neurônios do sistema periventricular hipofiseal dopaminérgico

PB – tampão fosfato

PBS – tampão fosfato salina

PFA – paraformaldeído

PPT – propilpirazoltríol

PRF – fator liberador de prolactina

PRL – prolactina

PRL-R – receptor de prolactina

PRO – proestro

pSTAT5 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 fosforilado

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RIE – radioimunoensaio

s.c. – subcutâneo

SQN – núcleo supraquiasmático

STAT5 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 5

S179D - S179D-PRL

S⁴⁰pTH – tirosina hidroxilase fosforilada

THDA – neurônios do sistema tuberohipofiseal dopaminérgico

TH – tirosina hidroxilase

TIDA – neurônios do sistema tuberoinfundibular dopaminérgico

TX-100 – Triton X-100

VMH – núcleo hipotalâmico ventrimedial

Sumário

INTRODUÇÃO	19
ESTUDO 1: CONTROLE NEUROENDÓCRINO DO PICO DE PROLACTINA INDUZIDO POR E2	20
Ciclo estral e a secreção de PRL	20
Mecanismo de ação da PRL	21
Controle da secreção de PRL	22
1 OBJETIVO GERAL	25
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Animais.....	26
2.2 Planejamento experimental.....	26
2.2.1 Experimento 1 (referente ao objetivo 1): <i>Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a secreção de PRL e sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos</i>	26
2.2.2 Experimento 2 (referente aos objetivos 2 e 3): <i>Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a atividade dopaminérgica e responsividade hipofisária</i>	27
2.2.3 Experimento 3 (referente ao objetivo 4): <i>Papel dos subtipos de ER na gênese do pico de PRL induzido por E2</i>	28
2.3 Anestésicos e drogas.....	28
2.4 Cirurgias	29
2.4.1 Ovariectomia.....	29
2.4.2 Canulação da veia jugular	29
2.5 Coleta seriada de sangue.....	29
2.6 Radioimunoensaio para PRL	30
2.7 ELISA para PRL.....	30
2.8 Perfusão e processamento dos cérebros	31
2.9 Imunohistoquímica – Marcação peroxidase	32
2.10 Imunohistoquímica – Marcação fluorescente.....	33
2.11 HPLC-ED.....	34
2.12 qPCR	35
2.13 Análise estatística	37
3 RESULTADOS.....	38
3.1 Experimento 1: Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a secreção de PRL e sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos	38
3.2 Experimento 2: Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a atividade dopaminérgica e responsividade hipofisária.....	45
3.3 Experimento 3: Papel dos subtipos de ER na gênese do pico de PRL induzido por E2	49

4	DISCUSSÃO	51
	ESTUDO 2: MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS DA AÇÃO ANSIOLÍTICA DA PRL EM RATOS	64
	Ansiedade	64
	Ferramentas para a análise da ansiedade em roedores	64
	Efeitos ansiolíticos da PRL	66
1	OBJETIVO GERAL	69
1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
2	MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1	Animais	70
2.2	Planejamento experimental	70
2.2.1	Experimento 1 (referente ao objetivo 1): Efeito da administração aguda de PRL sobre a ansiedade em ratos	70
2.2.2	Experimento 2 (referente ao objetivo 2): Papel da testosterona sobre a ação ansiolítica da PRL	71
2.2.3	Experimento 3 (referente ao objetivo 3): Avaliação de possíveis regiões cerebrais responsáveis pelo efeito ansiolítico da PRL	71
2.2.4	Experimento 4 (referente ao objetivo 4): Avaliação do efeito do bloqueio de PRL-R e OT-R sobre o efeito ansiolítico da PRL	72
2.2.5	Experimento 5 (referente ao objetivo 5): Avaliação do efeito dos PRL-R sobre a expressão de Fos hipotalâmica em resposta ao estresse por contenção	72
2.3	Anestésicos e drogas	73
2.4	Cirurgias	74
2.4.1	Canulação do ventrículo cerebral direito	74
2.4.2	Orquiectomia	75
2.5	Testes comportamentais	75
2.5.1	Labirinto em cruz elevado (LCE)	75
2.5.2	Neofagia	75
2.6	Perfusão e processamento dos cérebros	76
2.7	Imunohistoquímica – Marcação peroxidase	76
2.8	Análise estatística	77
3	RESULTADOS	78
3.1	Experimento 1: Efeito da administração aguda de PRL sobre a ansiedade em ratos 78	
3.2	Experimento 2: Papel da testosterona sobre a ação ansiolítica da PRL	81
3.3	Experimento 3: Avaliação de possíveis regiões cerebrais responsáveis pelo efeito ansiolítico da PRL	85
3.4	Experimento 4: Efeito do bloqueio de PRL-R e OT-R sobre o efeito ansiolítico da PRL 90	

3.5	Experimento 5: Efeito do bloqueio de PRL-R sobre a expressão de Fos hipotalâmica em resposta ao estresse por contenção	92
4	DISCUSSÃO	95
5	CONCLUSÃO	103

INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico sintetizado, principalmente, pelos lactotrofos hipofisários (Bole-Feysot et al., 1998). Esse hormônio foi, primeiramente, reconhecido pelo seu papel na promoção da lactação (Freeman et al., 2000). No entanto, além do papel primordial na lactação e de diversas outras importantes funções, a PRL modula a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (Freeman et al., 2000). Camundongos fêmea com deleção do receptor de PRL (PRL-R) apresentam comprometimento da fertilidade (Ormandy et al., 1997; Bole-Feysot et al., 1998), o que ressalta a importância desse hormônio e do seu receptor no controle do eixo reprodutivo. A PRL também exerce importantes funções comportamentais. Ela promove comportamento maternal (Lucas et al., 1998; Brown et al., 2017) e alimentar (Grattan & Kokay, 2008), regula a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos (Grattan & Kokay, 2008; Vega et al., 2010), estimula a neurogênese (Shingo et al., 2003) e atenua respostas ao estresse e ansiedade (Torner et al., 2001; Torner & Neumann, 2002). De fato, a PRL é, muitas vezes, reconhecida como um “hormônio de estresse”, uma vez que vários estressores físicos e emocionais estimulam a sua secreção (Noel et al., 1972; Poletini et al., 2006). O aumento dos níveis circulantes de PRL é considerado uma adaptação para garantir a competência do sistema imune (Dorshkind & Horseman, 2000; Yu-Lee, 2002) e apropriada resposta fisiológica e comportamental ao estímulo estressor (Torner et al., 2001; Torner & Neumann, 2002).

Os mecanismos neuroendócrinos relacionados ao papel exercido pela PRL sobre o eixo reprodutivo e sobre a ansiedade foram investigados no presente trabalho, que foi dividido em dois estudos. O primeiro investigou o mecanismo do controle da secreção de PRL pelo estradiol (E2) durante o ciclo ovariano em ratas. No segundo estudo,

avaliamos o efeito da PRL sobre o comportamento do tipo ansioso em ratos e as vias centrais associadas a este efeito.

ESTUDO 1: CONTROLE NEUROENDÓCRINO DO PICO DE PROLACTINA INDUZIDO POR E2

Ciclo estral e a secreção de PRL

A secreção de PRL é essencial para a reprodução em roedores. Além do seu conhecido papel no desenvolvimento das glândulas mamárias e na promoção da lactação, esse hormônio também tem ação luteotrófica, exercendo papel crítico para a manutenção da gestação (Bartke, 1973; Ben-Jonathan et al., 2008). Ademais, a PRL tem se mostrado um importante hormônio na mediação de modificações adaptativas do cérebro maternal, sendo essencial na promoção do comportamento maternal (Lucas et al., 1998; Grattan & Kokay, 2008; Brown et al., 2017). Os níveis séricos de PRL variam ao longo do ciclo estral da rata, que é constituído por 4 fases: metaestro, diestro (DI), proestro (PRO) e estro. As suas concentrações plasmáticas permanecem baixas da tarde do estro até a manhã do PRO seguinte. Na tarde do PRO, ocorre um pico na secreção de PRL, de forma quase concomitante ao pico do hormônio luteinizante (LH) (Butcher et al., 1974; Smith et al., 1975; Szawka et al., 2005). Assim como para o pico preovulatório de LH, os crescentes níveis de E2 secretados pelos folículos ovarianos são um sinal endócrino para o eixo hipotálamo-hipófise gerar o pico de PRL no PRO. A administração de um anticorpo para E2 na manhã do DI bloqueia o pico de PRL no PRO (Neill et al., 1971). Além disso, em resposta à exposição ao E2, ratas ovariectomizadas (OV) apresentam picos diários de secreção de PRL no período da tarde, correspondentes ao pico observado no PRO (Neill, 1972; Neill & Smith, 1974).

Mecanismo de ação da PRL

A PRL exerce seus papéis fisiológicos através da ligação a seus receptores de membrana, pertencentes à superfamília de receptores de citocinas de classe 1 (Kelly et al., 1991). O PRL-R é expresso em duas diferentes isoformas: a forma longa e a forma curta, que diferem pela composição e tamanho da sua cauda citoplasmática (Bole-Feysot et al., 1998). Apesar do receptor curto também ser expresso no cérebro do roedor (Bakowska & Morrell, 2003), as ações da PRL no cérebro parecem ser predominantemente mediadas pela forma longa, onde ela ativa primariamente a via de sinalização intracelular mediada pela proteína citoplasmática janus tirosina quinase (JAK), que se encontra acoplada aos PRL-R (Lebrun et al., 1994; Pezet et al., 1997). A ativação do receptor leva à ativação de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT), que se ligam a sequências específicas de genes promotores e regulam, então, a transcrição gênica (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 1999; Freeman et al., 2000; Grattan et al., 2001; Lerant et al., 2001; Yip et al., 2012). A STAT5 é a principal variedade de STAT ativada pelo PRL-R, e é expressa em duas diferentes isoformas em diversas espécies animais, incluindo primatas e roedores: STAT5a e STAT5b (Grimley et al., 1999). Diferentes funções têm sido atribuídas a cada uma dessas isoformas, as quais são ativadas seletivamente em diferentes tecidos. O desenvolvimento das glândulas mamárias e a lactogênese dependem da expressão de STAT5a (Liu et al., 1997). A sinalização da PRL no cérebro e o seu controle hormonal, por outro lado, parecem estar atrelados ao STAT5b, uma vez que camundongos deficientes de STAT5b apresentam defeitos na retroalimentação negativa da PRL sobre os neurônios dopaminérgicos e, conseqüentemente, altos níveis séricos desse hormônio (Grattan et al., 2001). Assim, a fosforilação do STAT5 (pSTAT5) induzida por PRL é um marcador confiável da ação celular da PRL no cérebro (Brown et al., 2010; Kirk et

al., 2017; Salais-López et al., 2017; Oláh et al., 2018). Em adição à via de STAT5, a ativação do PRL-R também pode agir por mecanismos alternativos para gerar rápidas mudanças na excitabilidade neural (Nishihara & Kimura, 1989; Sirzen-Zelenskaya et al., 2011; Brown et al., 2012; Lyons et al., 2012; Patil et al., 2014; Buonfiglio et al., 2015; Georgescu et al., 2020).

Controle da secreção de PRL

A PRL controla a sua própria secreção através da inibição e estimulação dos neurônios hipotalâmicos dopaminérgicos (Grattan & Kokay, 2008). Estes neurônios secretam dopamina (DA), que inibe tonicamente a secreção de PRL (Freeman et al., 2000). A secreção de PRL se dá por exocitose dependente de cálcio, e a DA causa uma hiperpolarização na membrana do lactotrofo, diminuindo cálcio intracelular e, conseqüentemente, inibindo a secreção de PRL (Ben-Jonathan et al., 2008). Os neurônios neuroendócrinos dopaminérgicos pertencem a três diferentes populações de neurônios hipotalâmicos: neurônios do sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA), sistema tuberohipofiseal dopaminérgico (THDA) e sistema periventricular hipofiseal dopaminérgico (PHDA). Os neurônios TIDA localizam-se no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e projetam-se para a zona externa da eminência mediana (ME) (Kawano & Daikoku, 1987). Os neurônios THDA, por sua vez, localizam-se no ARC rostral, e projetam-se para os lobos intermediário e neural da hipófise (Holzbauer & Racke, 1985). Finalmente, os neurônios PHDA estão localizados no núcleo periventricular hipotalâmico, com projeções para o lobo intermediário (Goudreau et al., 1995). Ao estimular a atividade desses neurônios produtores de DA, a PRL regula a sua própria secreção, através de um mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Ainda em 1986, Thomas e colaboradores mostraram que uma cirurgia desconectando o hipotálamo da hipófise

causava aumento na secreção de PRL em ovelhas em anestro e em fase reprodutiva (Thomas et al., 1986), mostrando a importância do tônus inibitório proveniente do hipotálamo no controle de sua secreção. Adicionalmente, estudo eletrofisiológico conduzido em camundongos mostrou que há um rápido aumento na taxa de disparo dos neurônios TIDA após tratamento com PRL (Brown et al., 2012).

Os receptores dopaminérgicos localizados nas membranas dos lactotrofos pertencem à subclasse D2 da família de receptores para DA, sendo denominados D2r (Meador-Woodruff et al., 1989; Freeman et al., 2000). Camundongos com comprometimentos no gene que codifica o D2r apresentam hiperplasia dos lactotrofos e hiperprolactinemia (Kelly et al., 1997; Saiardi et al., 1997). O controle da PRL sobre a sua própria secreção é possível uma vez que esse hormônio atravessa a barreira hematoencefálica através de um sistema de transporte saturável mediado por carreadores (Grattan & Kokay, 2008; Brown et al., 2016), de modo que sua liberação pelos lactotrofos pode ter efeitos no sistema nervoso central. De fato, trinta minutos após a sua administração periférica, a PRL ativa neurônios cerebrais através da fosforilação do STAT5 (Brown et al., 2016). As ações da PRL sobre os neurônios TIDA, com exceção do estado de lactação, se dão através de mecanismos rápidos sobre a atividade elétrica desses neurônios, bem como mecanismos lentos através da via de STAT5 e alteração de padrões de expressão gênica. A PRL é capaz de induzir uma rápida despolarização dos neurônios TIDA e um consequente aumento na taxa de disparo de potenciais de ação, resultando em aumento da liberação de DA e inibição da secreção de PRL (Brown et al., 2012; Lyons et al., 2012; Romanò et al., 2013). Nesses mesmos neurônios, a PRL ativa vias transcricionais mediadas por STAT5, estimulando a expressão da tirosina hidroxilase (TH) para promover um aumento na síntese de DA (Arbogast & Voogt, 1996).

O E2 é um potente estimulador endógeno da secreção de PRL, sendo este efeito relacionado a ações hipofisárias e hipotalâmicas (West & Dannies, 1980; Samson et al., 1986; Yamamoto et al., 1986; Garris & Ben-Jonathan, 1991; De Paul et al., 1997; Kennett et al., 2009; Morel et al., 2009). Em ratas, o E2 induz um pico de secreção de PRL na tarde do PRO, que é reproduzido em ratas OV tratadas com E2 (OVE) (Caligaris et al., 1974; Poletini et al., 2004; Aquino et al., 2016). Isto ocorre, pelo menos em parte, devido a uma diminuição no tônus inibitório exercido pela DA sobre os lactotrofos, mediada pelo aumento dos níveis de E2 durante o ciclo estral (Carr & Voogt, 1980; Mai et al., 1994; Shieh & Pan, 1996). Todavia, por motivos ainda não entendidos, embora o E2 estimule a secreção basal de PRL, ele parece não promover um pico de secreção deste hormônio no período pré-ovulatório em mulheres (Ben-Jonathan et al., 2008). Esta é uma interessante questão que indica que os mecanismos pelos quais o E2 estimula a secreção de PRL em roedores e humanos ainda não são completamente compreendidos. Desse modo, este estudo exploratório teve como objetivo aprofundar o entendimento sobre os mecanismos responsáveis pela gênese do pico de PRL induzido por E2 em ratas. Para tanto, utilizamos tratamentos com diferentes doses de E2 de forma a diferenciar efeitos essenciais ou modulatórios do E2 na gênese do pico de PRL.

1 OBJETIVO GERAL

Investigar os componentes neuroendócrinos essenciais responsáveis pelo aumento da secreção de PRL induzido por E2 em ratas.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar o efeito de baixos e altos níveis fisiológicos de E2 sobre a secreção de PRL, e os efeitos hipotalâmicos desencadeados nestas duas condições estrogênicas;
- 2) Avaliar a atividade dopaminérgica em resposta aos diferentes níveis de E2;
- 3) Identificar a resposta hipofisária aos diferentes níveis de E2;
- 4) Determinar a participação dos receptores para estrógenos (ERs) no aumento da secreção de PRL induzido por E2.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar virgens de 2 a 3 meses de idade, com peso corporal entre 200-250 g provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de cinco por caixa (39 x 32 x 17 cm), em ambiente de temperatura (22 ± 2 °C) e luz (12:00 h claro/12:00 h escuro; luzes acesas às 07:00 h) controladas, com água e ração *ad libitum*. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. As fêmeas tiveram seu ciclo acompanhado diariamente através da análise da citologia vaginal. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 83/2014).

2.2 Planejamento experimental

2.2.1 Experimento 1 (referente ao objetivo 1): *Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a secreção de PRL e sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos*

Para alcançar o objetivo 1, foi avaliado o efeito de níveis baixos e altos de E2 sobre a secreção de PRL, e sobre parâmetros hipotalâmicos possivelmente relacionados ao controle dessa secreção. Para isso, ratas foram OV e, 7 dias depois, iniciou-se o tratamento diário, por 3 dias, com óleo de milho (OV; n = 6) ou E2 nas doses de 4 (OVE-4; n = 5) ou 80 (OVE-80; n = 5) µg/kg. Em estudo anterior, apresentado em congresso recentemente (Henriques et al., 2021), estabelecemos que estas doses de 4 e 80 µg/kg produzem baixos e altos níveis fisiológicos de E2, respectivamente. Ratas em proestro (PRO; n = 7) e em diestro (DI; n = 6) foram utilizadas como referência de condições fisiológicas de altos e baixos níveis de E2, respectivamente. No dia anterior

ao experimento, os animais tiveram a veia jugular canulada. No dia experimental, foram realizadas coletas de sangue em intervalos de 1 h, das 13:00 h às 18:00 h. Após a última coleta, as ratas foram perfundidas e os cérebros processados para análise imunohistoquímica da expressão de TH e TH fosforilada (S^{40} pTH) na ME, c-Fos e ocitocina (OT) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), e Fos no núcleo periventricular (PeN) e na área pré-óptica medial (MPA). As concentrações plasmáticas de PRL das amostras de sangue foram determinadas por radioimunoensaio (RIE).

2.2.2 Experimento 2 (referente aos objetivos 2 e 3): *Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a atividade dopaminérgica e responsividade hipofisária*

Para alcançar o objetivo 2, foi avaliado o efeito de níveis baixos e altos de E2 sobre as variações temporais das concentrações de DA e seu metabólito, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), na ME e nos lóbulos neural e intermediário da hipófise (NIL). Como parte do objetivo 3, investigamos os efeitos dos dois níveis de E2 sobre a expressão de genes hipofisários relacionados às ações do E2 e ao controle da secreção de PRL. Ratas foram OV e, 7 dias depois, iniciou-se o tratamento diário, por 3 dias, com óleo de milho (OV; n = 6) ou E2 nas doses de 4 (OVE-4; n = 6) ou 80 (OVE-80; n = 6) μ g/kg. No dia experimental, as ratas foram decapitadas nos horários de 10:00 h, 16:00 h e 18:00 h e tiveram o sangue colhido pelo tronco. A ME, o NIL, a adenohipófise e o PVN foram dissecados e armazenados. As concentrações plasmáticas de PRL das amostras de sangue foram determinadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). DA e DOPAC na ME e NIL foram dosados por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção eletroquímica (HPLC-ED). Hipófise e PVN foram processados para a quantificação da expressão do mRNA dos genes para PRL (*Prl*),

receptor D2 de DA (*Drd2*), receptor para OT (OT-R) (*Oxtr*), ER α (*Ers1*), ER β (*Esr2*), receptor para progesterona (*Pgr*) e OT (*Oxt*) por RT-PCR em tempo real (qPCR).

2.2.3 Experimento 3 (referente ao objetivo 4): *Papel dos subtipos de ER na gênese do pico de PRL induzido por E2*

Para alcançar o objetivo 4, foi avaliado o efeito da ativação seletiva de ER α ou ER β sobre a secreção de PRL. Para isso, ratas foram OV e, 7 dias depois, iniciou-se o tratamento diário, por 3 dias, com 6 mg/kg, s.c. (Sánchez-Criado et al., 2004; Aquino et al., 2017), do agonista seletivo para ER α , propilpirazoltríol (PPT; OV+PPT; n = 5) ou do agonista seletivo para ER β , diarilpropionitrilo (DPN; OV+DPN; n = 3). No dia anterior ao experimento, os animais tiveram a veia jugular canulada. No dia experimental, foram realizadas coletas de sangue em intervalos de 1 h, das 13:00 h às 18:00 h. Após a última coleta, os animais foram sacrificados e os úteros foram coletados para pesagem. As concentrações plasmáticas de PRL das amostras de sangue foram determinadas por ELISA.

2.3 Anestésicos e drogas

Para a realização da ovariectomia e perfusão, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (cloridrato de cetamina; 80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Para a canulação da veia jugular, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,2,2-tribromoetanol 99%, Aldrich; 250 mg/Kg, i.p.). Após as cirurgias, os animais receberam tratamento profilático com antibiótico (Pentabiótico, Fort Dodge; 24000 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixinina meglumina; Banamine, Schering-Plough; 2,5 mg/Kg peso corporal, s.c.). O E₂ (17 β -estradiol; Sigma-Aldrich, EUA), o PPT (Tocris

Bioscience, Bristol, UK) e o DPN (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foram administrados dissolvidos em óleo de milho.

2.4 Cirurgias

2.4.1 Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada através da laparotomia bilateral. Após anestesia, foi feita a tricotomia e assepsia da região lateral do abdômen. Um corte foi realizado na região e, após incisão do tecido muscular, o tecido adiposo foi exteriorizado para que se obtivesse o acesso ao ovário. A tuba uterina foi clampeada, o ovário removido e as incisões no músculo e na pele foram suturadas.

2.4.2 Canulação da veia jugular

Após anestesia, foi realizada a tricotomia e assepsia da região clavicular direita, onde, após uma incisão, a veia jugular foi exposta. Um cateter de Silastic (10 cm de comprimento total, dividido em 3 e 7 cm por um ponto de ancoragem) foi implantado na veia jugular conforme previamente descrito (Harms & Ojeda, 1974). Um fio de aço inox (diâmetro 0,70 mm) foi utilizado para oclusão da cânula ao final da cirurgia.

2.5 Coleta seriada de sangue

Nos experimentos 1 e 3, amostras de 400 µL de sangue foram colhidas através da veia jugular nos horários determinados pelo protocolo experimental, e o mesmo volume foi repostado com solução de salina heparinizada (30 UI/mL) estéril. As amostras foram centrifugadas a 1200 g, por 20 min, a 4 °C e o plasma, armazenado a -20 °C até o momento das dosagens hormonais.

2.6 Radioimunoensaio para PRL

As concentrações plasmáticas de PRL do experimento 1 foram determinadas por RIE de duplo anticorpo como previamente descrito (Szawka et al., 2007; Szawka et al., 2010). Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas no mesmo ensaio para evitar variações inter-ensaio. O anticorpo utilizado foi fornecido pelo Programa Nacional de Peptídeos e Hormônios (Harbor-UCLA), e foi PRL-S9 e o padrão de referência, PRL-RP3.

2.7 ELISA para PRL

A dosagem de PRL dos experimentos 2 e 3 foram realizadas a partir de plasma por meio do método de ELISA para PRL de rato, adaptado em nosso laboratório (Aquino et al., 2017; Silva et al., 2020a). Placas de 96 poços (Corning, 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Band Microplate; Life Science; St. Louis, EUA) foram pré-adsorvidas com 50 µL/poço do anticorpo de captura anti-rPRL-IC [AFP65191, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program (NIDDK-NHPP), diluição 1:1500 em tampão fosfato-salina (PBS)]. Todas as incubações subsequentes foram feitas sob agitação em câmara úmida, a temperatura ambiente, exceto quando mencionado. As placas foram vertidas e incubadas durante 2 h com 200 µL de solução de bloqueio (leite em pó 5% em PBS 0,05% + Tween-20; PBS-T). Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes por 3 minutos com PBS-T. As placas foram incubadas durante 24 h com 50 µL de padrão de PRL para rato rPRL-RP-3 (AFP-4459B, NIDDK-NHPP) ou amostras. Amostras com concentrações conhecidas de PRL foram utilizadas como controle de qualidade. Após o período de incubação, 50 µL do anticorpo de detecção rabbit anti-mouse PRL (F.

Talamantes; University of Santa Cruz, CA, USA; diluição 1:25000 em solução de bloqueio) foi adicionado e incubado por 24 h a 4°C. As placas foram, então, lavadas e incubadas durante 90 minutos com 50 µL do anticorpo secundário goat anti-rabbit (Dako Pathology Solutions, Santa Clara, CA, USA; diluição 1:2000 em 50% solução de bloqueio e 50% PBS). As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL de OPD (o-Phenylenediamine; P1526, Sigma-Aldrich, 2 mg/mL diluído em tampão citrato; pH 5,0 contendo 0,02% de peróxido de hidrogênio) por 45 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido clorídrico 3 M. A leitura das placas foi feita a 490, e a leitura a 650 nm foi utilizada para correção de leitura inespecífica. As concentrações foram obtidas a partir da interpolação da densidade óptica das amostras desconhecidas na regressão não-linear das respectivas curvas de calibração.

2.8 Perfusão e processamento dos cérebros

Os animais foram perfundidos através da aorta ascendente, com 50 mL de PBS 0,01 M heparinizado (5 UI/mL), seguido de 400 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2 h e crioprotetidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato (PB) 0,1M a 4 °C. Em seguida, foram congelados em isopentano 99% (C₅H₁₂), a -50 °C. Depois de congelados, os cérebros foram armazenados à -80 °C até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Quatro séries de secções coronais de 30 µm da extensão rostrocaudal da MPA, PVN e ARC foram obtidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 2007). As secções foram armazenadas em solução crioprotetora a -20 °C (Watson et al., 1986) para a posterior realização de análises de imunohistoquímica de marcação fluorescente para TH e S⁴⁰pTH no ARC, e de marcação via peroxidase para c-Fos na MPA e PeN, e dupla marcação para c-Fos e OT

no PVN, conforme protocolos previamente descritos (Aquino et al., 2016; Aquino et al., 2017).

2.9 Imunohistoquímica – Marcação peroxidase

Foi utilizado o método de free-floating para a realização da imunohistoquímica pelo método da peroxidase (Araujo-Lopes et al., 2014; Aquino et al., 2016). As secções passaram por lavagens em PBS 0,01M em todos os passos do processo. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS contendo Triton X-100 (TX-100) 0,3% e albumina bovina (BSA) 1%. Para a marcação simples de c-Fos, as secções foram retiradas da solução crioprotetora e lavadas 10 vezes durante 6 minutos com PBS 0,01M. Em seguida, as secções foram lavadas com glicina 0,1M por 10 minutos, para que os sítios antigênicos mascarados pelo PFA 4% utilizado para a fixação fossem expostos. Em seguida, as secções foram incubadas durante 30 minutos em H₂O₂ 1%, com o objetivo de bloquear peroxidases endógenas, e depois incubadas durante 30 min em TX-100 0,4%. O TX-100 possui a função de permeabilizar a membrana celular, permitindo a penetração dos anticorpos. As secções foram incubadas em BSA 3% por 1 h, para evitar a formação de ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário anti-c-Fos produzido em coelho (Ab-5; PC38, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha; 1: 20.000) A incubação foi feita por 48 h a uma temperatura de 4 °C. Foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na concentração de 1:2.000, por 2 h. As secções foram, então, incubadas por 1 h em complexo avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories) a 1:600. A marcação foi revelada com solução contendo 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e H₂O₂ (1 µL/mL de

solução de H₂O₂ 30%) em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e as lamínulas coladas com Entellan (Merck). Imagens das secções foram obtidas em microscópio óptico utilizando-se como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007) (Paxinos & Watson, 2007).

Para a dupla marcação de c-Fos/OT, foi feito o mesmo procedimento realizado para a marcação simples, mas após a revelação da marcação para c-Fos, foi feita uma nova incubação com H₂O₂ 1% por 30 minutos, seguida da incubação com o anticorpo primário anti-OT produzido em camundongo (Chemicon International, Temecula, CA, EUA, diluição 1:100.000). As secções foram mantidas a 4 °C por 48 h, e em seguida incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na concentração de 1:2.000 por 2 h. Foi feita uma segunda incubação em complexo avidina DH-peroxidase biotilada (ABC Elite, Vector Laboratories) a 1:600 por 1 h e, em seguida, foi feita a revelação com solução de DAB (0,2 mg/mL) e H₂O₂ (0,083µL/mL de H₂O₂ 30%) em tampão Tris-HCl. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratadas e as lamínulas coladas com Entellan (Merck) e as imagens obtidas em microscópio óptico.

2.10 Imunohistoquímica – Marcação fluorescente

Para a dupla marcação de TH e S⁴⁰pTH, foi utilizada a técnica de imunofluorescência (Silva et al., 2020a; Silva et al., 2020b). Assim como o método anterior, a imunofluorescência foi realizada por free-floating. Foram feitas lavagens em PBS 0,01M em todos os passos do processo, e os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS contendo TX-100 0,3% e BSA 1%. As secções foram lavadas por 10 minutos com boridreto de sódio 0,1 M, e em seguida incubadas por 30 minutos

em TX-100 0,4%. Após incubação de 1 h em BSA 3%, as secções foram incubadas nos anticorpos primários anti-TH produzido em camundongo (T1299; Sigma-Aldrich; 1:10.000) e anti-pTH produzido em coelho (serina40-pTH, 36-8600 Zymed Laboratories; Invitrogen, Camarillo, CA; 1:10.000) por 48 h. Após este período, as secções foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentes anti-camundongo Alexa Fluor 568 (Life Technologies, Eugene, OR, USA; 1:1.000) e anti-coelho Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Eugene, OR, USA; 1:1.000) por 2 h. Os cortes foram lavados e montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e as lamínulas foram coladas com Krystalon (EMD). A análise e obtenção de imagens foram feitos em microscópio de fluorescência.

2.11 HPLC-ED

As dissecções da ME e NIL foram homogeneizadas com sonicator, respectivamente, em 100 μ L e 150 μ L de ácido perclórico (PCA) 0,15 M contendo 0,1 mM de EDTA e 57 nM de 3,4-diidroxibenzilamina (DHBA; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), utilizado como padrão interno. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min, em temperatura de 4 °C. O pellet obtido foi utilizado para dosagem do conteúdo proteico pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O sobrenadante foi removido para avaliação das concentrações de DA e DOPAC como previamente descrito (Aquino et al., 2017; Silva et al., 2020b). A fase móvel do sistema foi constituída de NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,38 mM, em água MiliQ e metanol 10%; pH 3,5 ajustado com H₃PO₄. O fluxo da bomba do HPLC foi ajustado para 1,0 mL/min e o potencial do detector eletroquímico 0,4 V (Decade II, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden). Com o auxílio de um auto injetor (SIL-10A autosampler, Shimadzu

Corporation), 20 μ L de cada amostra foram injetadas no HPLC. As catecolaminas foram separadas em coluna de fase reversa (Purospher Star, 5 μ m, 250 x 4 mm; Merck) precedida de pré-coluna C18 (Lichrospher 5 μ m, 4 x 4 mm; Merck). O forno foi mantido a uma temperatura constante de 40 °C. Foi utilizado o software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) para a análise dos dados cromatográficos. A DA e o DOPAC foram identificados de acordo com seu tempo de eluição e quantificados utilizando-se curvas de calibração pelo método do padrão interno (DHBA). Considerou-se a concentração de DA como a estimativa do estoque desse neurotransmissor nas vesículas sinápticas, enquanto que os níveis de DOPAC foram definidos como a estimativa da liberação de DA (Lookingland et al., 1987). A razão DOPAC/DA foi utilizada como índice do turnover dopaminérgico. Todas as amostras de um mesmo experimento foram diluídas em mesma solução e dosadas no mesmo ensaio, a fim de evitar variabilidade inter ensaio.

2.12 qPCR

A análise de expressão gênica por qPCR foi realizada utilizando método previamente descrito (Silva et al., 2020a). A hipófise anterior foi dissecada para avaliação dos níveis de RNAm dos genes para PRL (*Prl*), receptor D2 de DA (*Drd2*), receptor para OT (*Oxtr*), receptor de estrógenos do tipo alfa (*Ers1*), receptor de estrógenos do tipo beta (*Esr2*), receptor de progesterona (*Pgr*). O PVN foi analisado para o RNAm de OT (*Oxt*). Após a decapitação, a hipófise anterior foi coletada e os cérebros foram removidos e congelados em gelo seco. Em seguida, o PVN foi dissecado em criostato na temperatura de -8 °C pela técnica de “punch”, a aproximadamente 1,32mm do bregma, com agulha de 2 mm de diâmetro, centralizada no terceiro ventrículo, a aproximadamente 1mm da base do cérebro. A hipófise anterior e o PVN

foram homogeneizados em 500 uL Tri-Reagent-LS (Life Technologies), utilizando uma seringa de 1 mL e então congelados à -80°C . RNAm total foi extraído adicionando mais 500 μL Tri-Reagent-LS aos eppendorfs contendo as amostras. 1 μg de RNAm foi convertido em cDNA utilizando-se o kit Superscript III (Invitrogen). O cDNA sintetizado foi amplificado utilizando-se 4 μL de cDNA, 600 nM de cada primer, 10 μL do reagente SYBR Green água DNase e RNase-free conforme descrito pelo fabricante (kit Platinum® SYBR® GREEN qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen Life Technologies). Os ensaios foram realizados em um termociclador Applied Biosystems 7500 seguintes condições: 2 min a 50°C , 10 min a 95°C , seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C ; em seguida foi realizada análise da curva de dissociação nas seguintes condições: 1 min a 60°C , 1 min a 95°C , 1 min a 60°C e 80 ciclos de 10 s a 55°C , com aumento gradativo de $0,5^{\circ}\text{C}$. A análise da expressão de RNAm foi feita pela comparação do número de cópias do RNAm entre os grupos experimentais. O número de cópias foi inferido de acordo com o número mínimo de ciclos necessário para atingir um sinal de fluorescência superior ao nível basal (CT). A expressão relativa do RNAm de *Prl*, *Drd2*, *Oxtr*, *Ers1*, *Esr2*, *Pgr* e *Oxt* foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak & Schmittgen, 2001), onde o ΔCT foi determinado pela subtração dos valores de CT do gene de interesse e do respectivo *Gapdh* (gene normalizador), e o $\Delta\Delta\text{CT}$ foi obtido pela subtração do valor de ΔCT de cada amostra pelo ΔCT das amostras do grupo calibrador (grupo OV). A exponencial negativa na base 2 do valor de $\Delta\Delta\text{CT}$ forneceu a medida do número de vezes que o RNAm de *Prl*, *Drd2*, *Oxtr*, *Ers1*, *Esr2*, *Pgr* e *Oxt* variou em relação ao grupo calibrador. A tabela 1 apresenta os primers utilizados para amplificação.

Gene	Primers	Nº de acesso
<i>Prl</i>	Foward primer: 5'- CATCAATGACTGCCCCACTTC-3'	NM_012629.1
	Reverse primer: 5'- CCAAAGTGGAGGATCAGGTTCAA-3'	
<i>Esr1</i>	Foward primer: 5'-GCACATTCCTTCCTTCCGTCT-3'	NM_012689.1
	Reverse primer: 5'-GCCGAGGTACAGATTGGCTT-3'	
<i>Esr2</i>	Foward primer: 5'-TGAGCAAAGCCAAGAGAAACG-3'	NM_012754.1
	Reverse primer: 5'-CCAGTTGCTCTGGACTCAAGGT-3'	
<i>Gapdh</i>	Foward primer: 5'-ACAGCCGCATCTTCTTGTGC-3'	NM_017008.4
	Reverse primer: 5'-GCCTCACCCATTTGATGTT-3'	
<i>Drd2</i>	Foward primer: 5'-TGCCCTTCATCGTCACTCTG-3'	NM_012547.1
	Reverse primer: 5'-GGGTACAGTTGCCCTTGAGT-3'	
<i>Oxt</i>	Foward primer: 5'-CATCTGCTGTAGCCCGGATGG-3'	NM_012996.3
	Reverse primer: 5'-TGGTAGTGGCCATGGGGAATG-3'	
<i>Oxtr</i>	Foward primer: 5'-AATCCGCACGGTGAAGATGA-3'	NM_012871.3
	Reverse primer: 5'-GAAGGCAGAAGCTTCCTTGG-3'	
<i>Pgr</i>	Forward primer: GGACTCTCCACACATCTGGC	NM_022847.2
	Reverse primer: CCAGGGAGATCGGTATTGGC	

Tabela 1: Genes e seqüências de nucleotídeos dos primers utilizados no RT-PCR tempo real

2.13 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm EPM. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak, conforme a ocorrência de um ou dois fatores de variação nos dados a serem analisados. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1: Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a secreção de PRL e sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos

Em estudo anterior, determinamos regimes de tratamento com E2 nas doses de 4 e 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ que, respectivamente, resultam em níveis plasmáticos e efeitos no útero e secreção de hormônio luteinizante correspondentes às fases de DI e PRO do ciclo estral da rata (Henriques et al., 2021). O presente experimento teve o objetivo de utilizar este modelo para investigar os efeitos neuroendócrinos do E2 na gênese do pico de secreção de PRL. Como se pode observar na figura 1, tanto a dose de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como a dose de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ induziram a ocorrência de um pico na secreção de PRL ($P < 0,05$), semelhante ao pico observado em ratas em PRO ($P < 0,001$). Estes resultados são evidenciados nos gráficos da área sob a curva (AUC) ($P < 0,001$) (Fig. 1C-D). No entanto, ratas OVE-80 apresentaram uma antecipação e amplificação do pico, que exibe um platô nos níveis máximos de PRL, que permanecem altos até a última coleta. Este perfil é diferente do observado nas ratas em PRO e OVE-4, que apresentam um único ponto máximo nos níveis de PRL no horário de 16:00 h, que começam a cair a partir das 17:00 h. De modo interessante, as ratas DI e OV apresentam um pequeno mas significativo aumento nos níveis de PRL no horário das 18:00 h ($P < 0,05$).

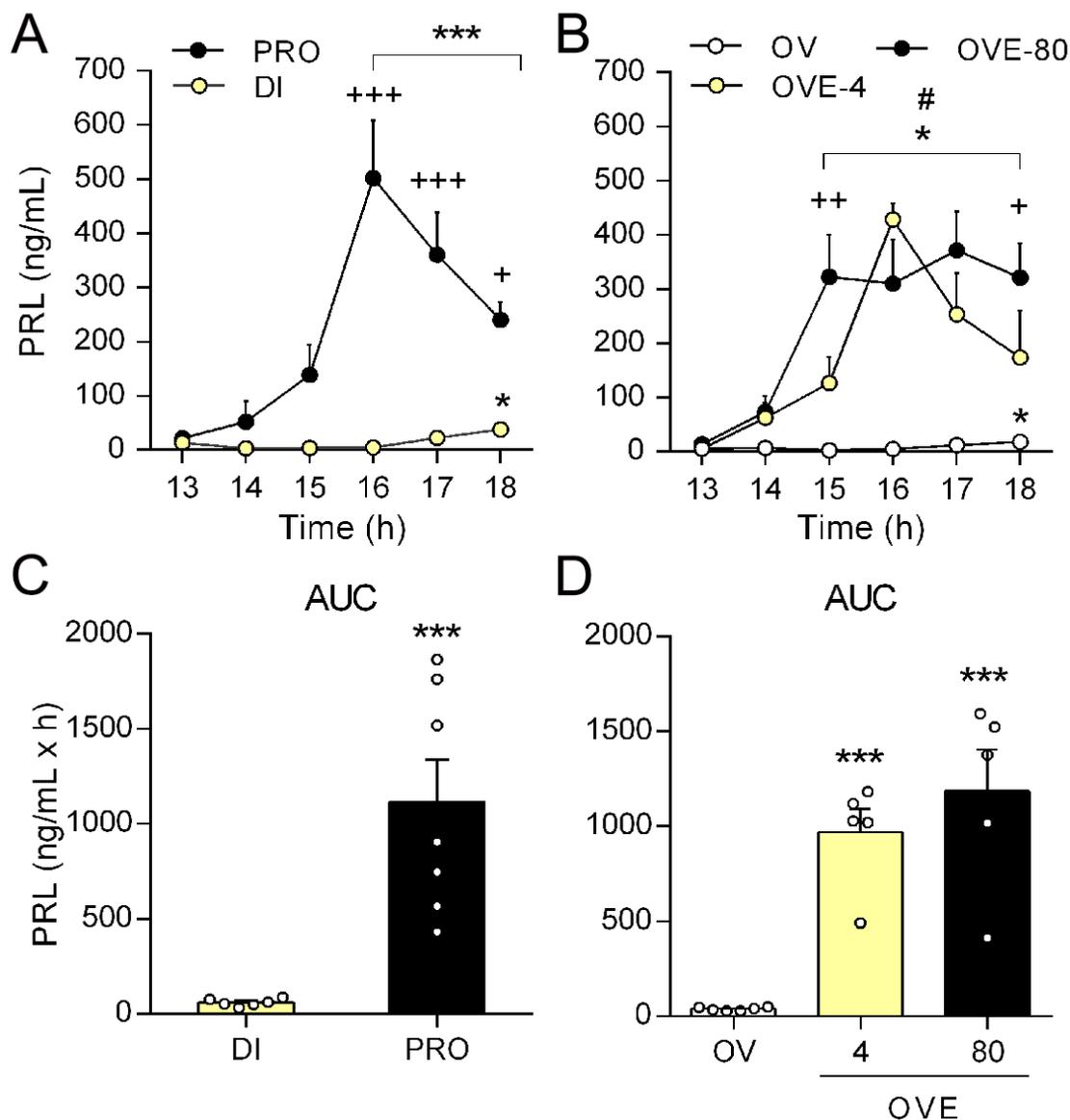


Figura 1: Efeitos do estradiol (E2) sobre a secreção de prolactina (PRL). Ratas ovariectomizadas (OV) foram tratadas com óleo de milho (OV; n = 6) ou E2 em doses de 4 (OVE-4; n = 5) ou 80 (OVE-80; n = 5) $\mu\text{g}/\text{kg}$ por três dias. Ratas intactas em diestro (DI; n = 6) e proestro (PRO; n = 7) foram usadas como controles fisiológicos de baixos e altos níveis de E2, respectivamente. No dia experimental, amostras de sangue foram coletadas de hora em hora, das 13:00 h às 18:00 h. Os níveis de PRL das amostras de sangue foram dosados através de radioimunoensaio (RIE). (A) Perfil de secreção de PRL em ratas em PRO e DI. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado às 13:00 h. + $P < 0,05$; +++ $P < 0,001$ comparado aos mesmos horários em DI. (B) Perfil de secreção de PRL em ratas OV tratadas com E2. * $P < 0,05$ comparado às 13:00 h. + $P < 0,05$; ++ $P < 0,01$ comparado ao mesmo horário no grupo OVE-4. # $P < 0,05$ comparado ao mesmo horário no grupo OV. (C) Área sob a curva (AUC) dos níveis de PRL em ratas intactas. *** $P < 0,001$ comparado ao DI. (D) AUC dos níveis de PRL em ratas OV tratadas com E2. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. Dados expressos em média \pm EPM.

Para investigar a participação dos neurônios TIDA na gênese do pico de PRL, realizamos a dupla marcação para TH e S⁴⁰pTH na ME (Fig 2 A-C). A razão S⁴⁰pTH/TH foi utilizada como referência do grau de fosforilação da TH na ME. A razão S⁴⁰pTH/TH não diferiu entre as ratas em DI e PRO (Fig. 2B). Por outro lado, uma diminuição da razão S⁴⁰pTH/TH foi vista somente em ratas OVE-80 em relação à OV e OVE-4 ($P < 0,05$) (Fig. 2C). Deste modo, a ocorrência do pico não poderia estar associada a um efeito estrogênico de reduzir a atividade enzimática dos neurônios TIDA, uma vez que ratas em PRO e OVE-4 não diferiram dos respectivos controles DI e OV, apesar de apresentarem marcante pico de PRL à tarde. A modulação da atividade desses neurônios por altos níveis de E2 pode ser responsável, no entanto, por uma facilitação do pico de PRL, que se apresentou maior no início e final da tarde no grupo OVE-80 em relação ao OVE-4.

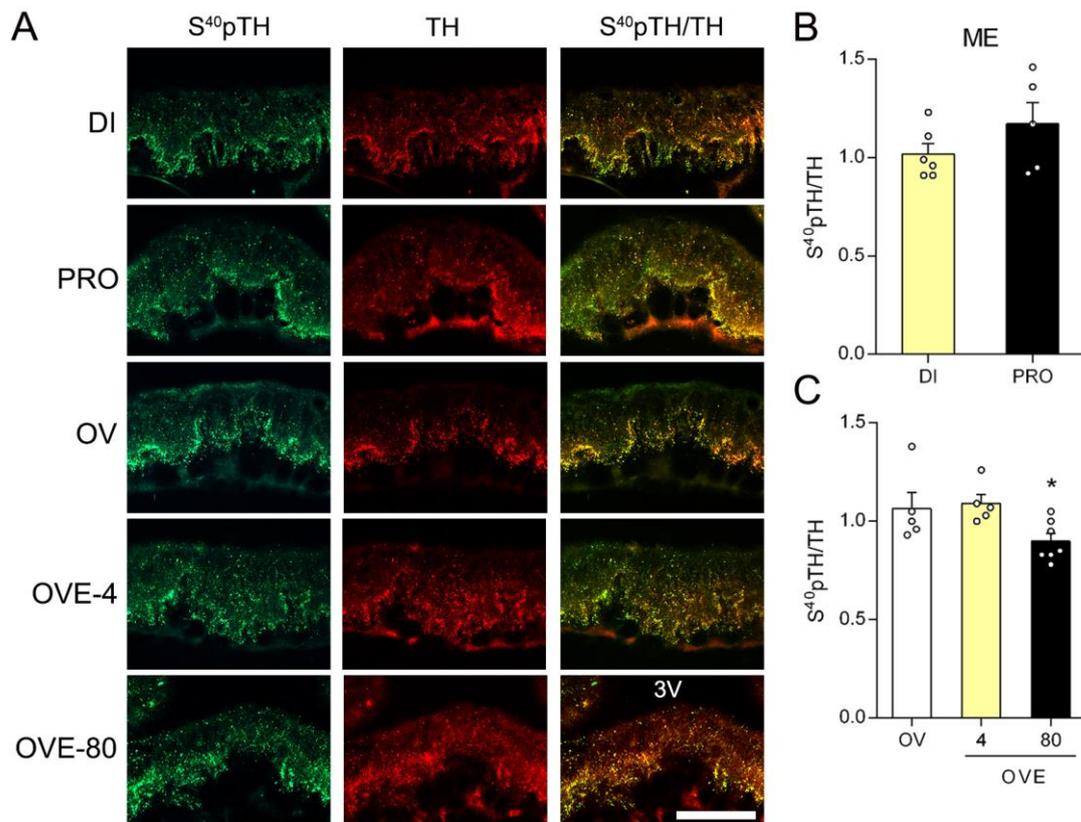


Figura 2: Efeitos do E2 sobre a fosforilação da tirosina hidroxilase (TH) na eminência mediana (ME). Ratas OV foram tratadas com óleo de milho (OV; n = 5) ou E2 em doses de 4 (OVE-4; n = 5) ou 80 (OVE-80; n = 7) $\mu\text{g}/\text{kg}$ por três dias. Ratas intactas em DI (DI; n = 6) e PRO (PRO; n = 5) foram usadas como controles fisiológicos de baixos e altos níveis de E2, respectivamente. No dia experimental, as ratas foram perfundidas às 18:00 h, e seus cérebros foram processados para a marcação imunofluorescente de TH e TH fosforilada (S⁴⁰pTH) na ME. (A) Imagens representativas da dupla marcação de S⁴⁰pTH e TH na ME. A cor verde indica marcação para S⁴⁰pTH, a cor vermelha indica marcação para TH, na coluna S⁴⁰pTH/TH é apresentada a sobreposição das duas marcações. (B) Razão da expressão de S⁴⁰pTH e TH na ME de ratas intactas. (C) Razão da expressão de S⁴⁰pTH e TH na ME de ratas OV tratadas com E2. * $P < 0,05$ comparado aos grupos OV e OVE-4. Dados expressos em média \pm EPM. 3V, terceiro ventrículo. Escala, 100 μm .

As figuras 3 e 4 demonstram a expressão de c-Fos em regiões hipotálamicas associadas ao controle da secreção de PRL nas diferentes condições estrogênicas. Não houve diferença no número de neurônios c-Fos-imunorreativos (ir) na MPA entre os grupos (Fig. 3A, 4A). O PeN e o PVN também não apresentaram diferença entre ratas DI

e PRO mas, por outro lado, apresentaram menor número de neurônios c-Fos-ir em ratas OVE-4 do que em OV e OVE-80 ($P < 0,05$ para PeN; $P < 0,05$ e $P < 0,01$ comparado ao OVE-80 e ao OV, respectivamente, no PVN) (Fig. 3B, 4B e C). Ainda, a expressão de c-Fos em neurônios OT do PVN não variou entre DI e PRO, mas se mostrou maior em ratas OVE-80 do que nas OVE-4 ($P < 0,01$). Esses resultados demonstram que nenhuma dessas regiões cerebrais deve ser essencial para a gênese do pico de PRL induzido por E2, uma vez que não apresentaram ativação neuronal associada a este evento hormonal. A maior expressão de c-Fos no PeN e no PVN das ratas OVE-80 pode estar associada a modulação do formato do pico, mas não parece ter papel essencial para a ocorrência do mesmo.

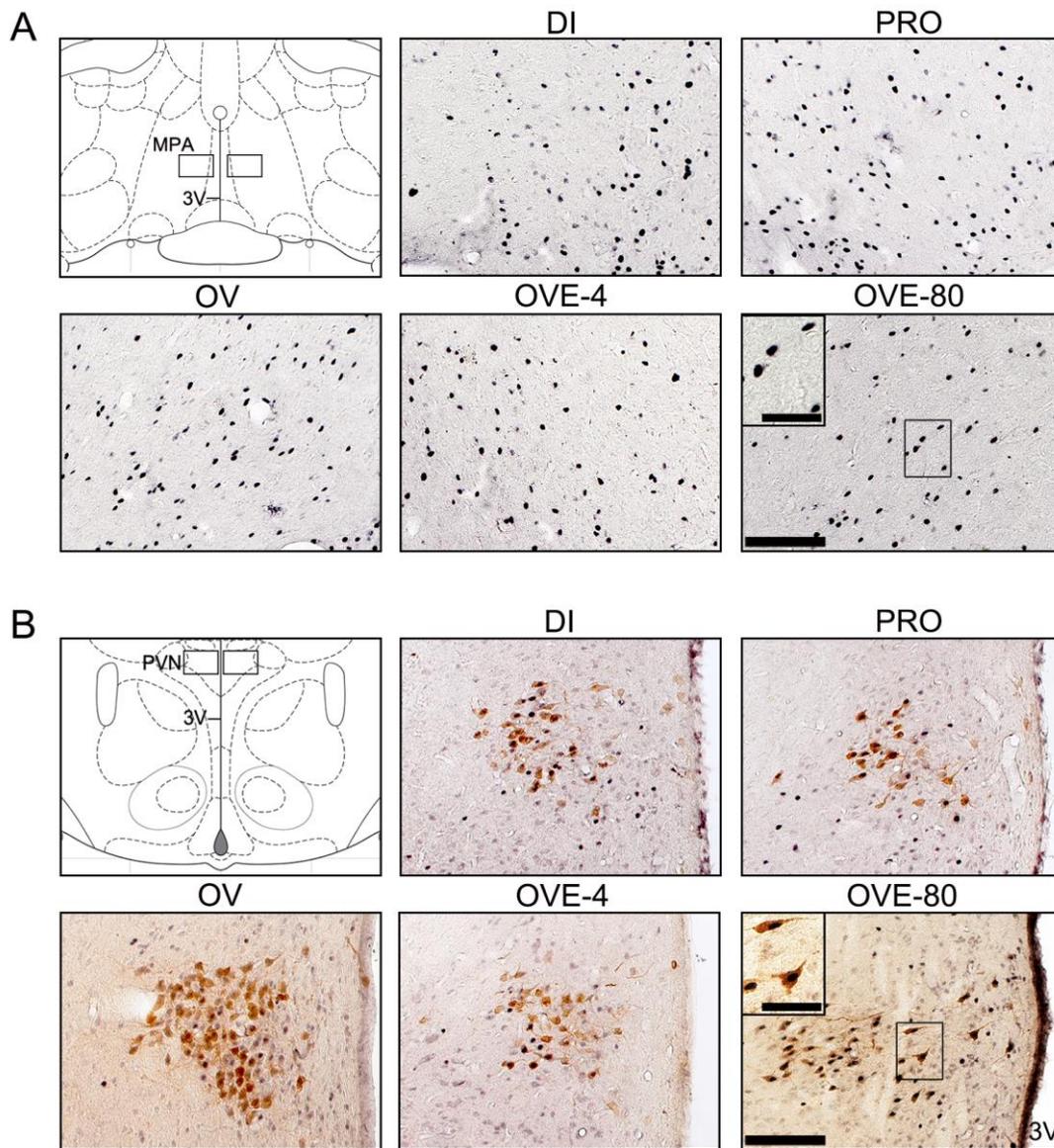


Figura 3: Imagens representativas dos efeitos do E2 na expressão de c-Fos na área pré-óptica medial (MPA) e núcleo periventricular (PeN) e dupla marcação para c-Fos e ocitocina (OT) no núcleo paraventricular (PVN). Ratas OV foram tratadas com óleo de milho (OV; $n = 6$) ou E2 em doses de 4 (OVE-4; $n = 6$) ou 80 (OVE-80; $n = 6$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ por três dias. Ratas intactas em DI (DI; $n = 5$) e PRO (PRO; $n = 5$) foram usadas como controles fisiológicos de baixos e altos níveis de E2, respectivamente. No dia experimental, as ratas foram perfundidas às 18:00 h, e seus cérebros foram processados para a marcação imunohistoquímica simples de c-Fos na MPA e PeN e dupla marcação de c-Fos e OT no PVN. (A) Imagens representativas da expressão de c-Fos na MPA. (B) Imagens representativas da expressão c-Fos e OT no PVN. 3V, terceiro ventrículo. Inset indica ampliação da área destacada pelo retângulo da foto. Escalas, 100 μm e 20 μm (inset).

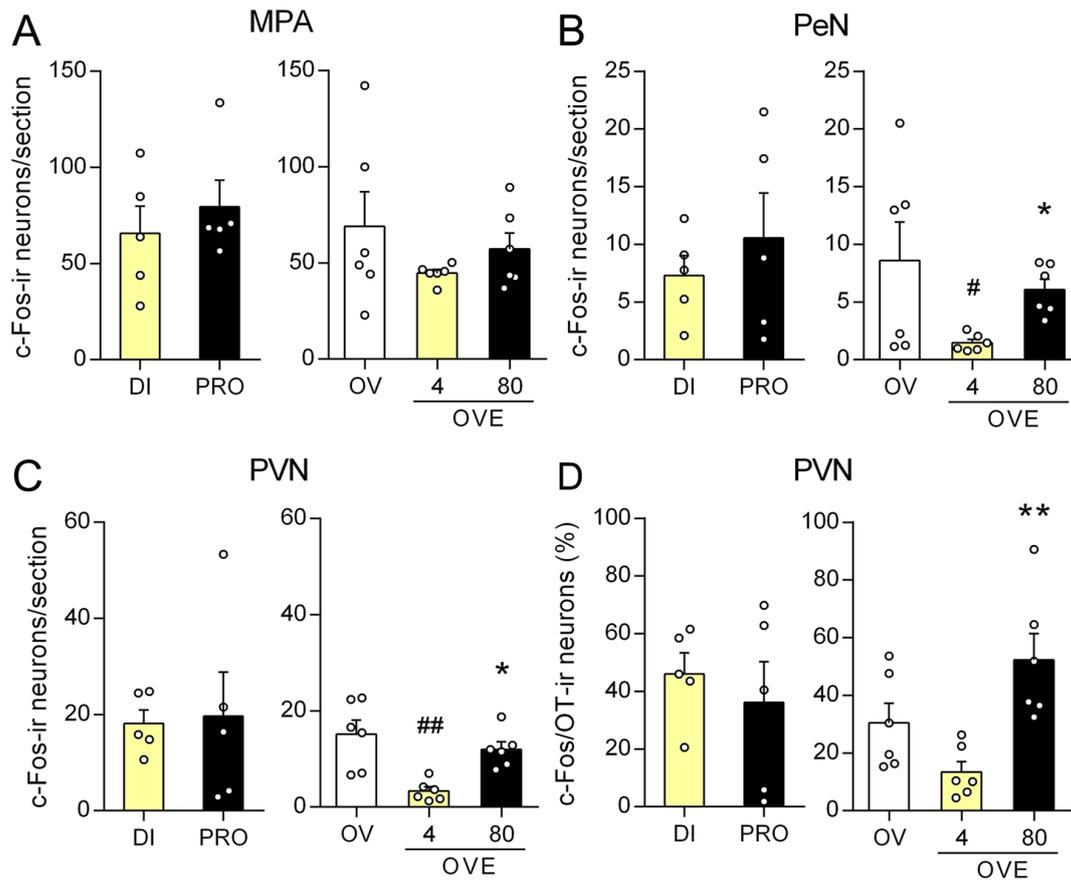


Figura 4: Efeitos do E2 na expressão de c-Fos na MPA e PeN, e dupla marcação c-Fos/OT no PVN. Ratas OV foram tratadas com óleo de milho (OV; $n = 6$) ou E2 em doses de 4 (OVE-4; $n = 6$) ou 80 (OVE-80; $n = 6$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ por três dias. Ratas intactas em DI (DI; $n = 5$) e PRO (PRO; $n = 5$) foram usadas como controles fisiológicos de baixos e altos níveis de E2, respectivamente. No dia experimental, as ratas foram perfundidas às 18:00 h, e seus cérebros foram processados para a marcação imunohistoquímica de c-Fos na MPA e PeN, e c-Fos e OT no PVN. (A) Expressão de Fos na MPA de ratas intactas e OV tratadas com E2. (B) Expressão de c-Fos no PeN de ratas intactas e OV tratadas com E2. * $P < 0,05$ comparado ao grupo OVE-4. # $P < 0,05$ comparado ao grupo OV. (C) Expressão de c-Fos no PVN de ratas intactas e OV tratadas com E2. * $P < 0,05$ comparado ao grupo OVE-4. ## $P < 0,01$ comparado ao grupo OV. (D) Porcentagem de neurônios OT que expressam c-Fos no PVN de ratas intactas e OV tratadas com E2. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo OVE-4. Dados expressos em média \pm EPM.

3.2 Experimento 2: Efeito de baixos e altos níveis de E2 sobre a atividade dopaminérgica e responsividade hipofisária

Com o objetivo de investigar os efeitos estrogênicos sobre a atividade dos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos, variações nas concentrações de DA e DOPAC ao longo do dia foram determinadas na ME e NIL por HPLC-ED (Fig. 5). Em ambas as regiões, houve uma marcante diminuição no DOPAC ($P < 0,001$) (Fig. 5B, E) e na razão DOPAC/DA ($P < 0,01$) (Fig. 5C, F) às 18:00 h em relação aos demais horários. Essa diminuição foi idêntica entre as ratas OV, OVE-4 e OVE-80. Entretanto, como esperado, apenas as ratas OVE-4 e OVE-80 apresentaram o pico de secreção de PRL induzido por E2 ($P < 0,001$) (Fig. 5G). Essa diminuição tanto de DOPAC como da razão DOPAC/DA foi vista tanto na ME como no NIL, indicando uma diminuição diária da atividade dopaminérgica dos neurônios TIDA, PHDA e THDA que independe dos níveis circulantes de E2. Esses dados indicam que, no período da tarde, há uma redução no tônus inibitório dopaminérgico, o qual parece ter um efeito de sinalizador temporal para a gênese do pico de PRL. Este pico, no entanto, só ocorre na sua completa magnitude na presença de E2.

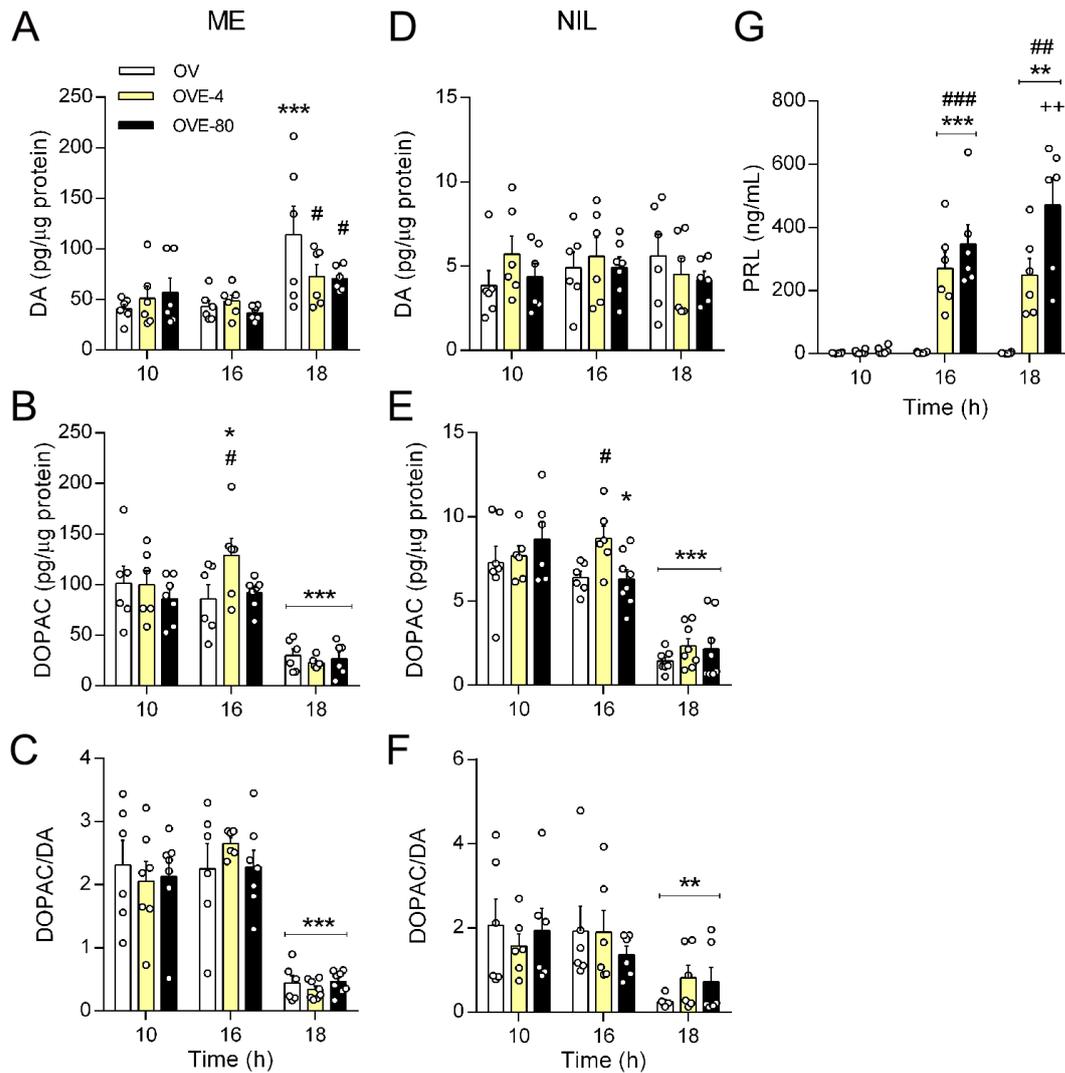


Figura 5: Diferentes concentrações de E2 não interferem no padrão diário de atividade dopaminérgica na eminência mediana (ME) ou no lóbulo neurointermediário da hipófise (NIL). Ratas OV foram tratadas com óleo de milho (OV; $n = 6$) ou E2 em doses de 4 (OVE-4; $n = 6$) ou 80 (OVE-80; $n = 6$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ por três dias. No dia experimental, as ratas foram decapitadas às 10:00 h, 16:00 h ou 18:00 h, e a ME e o NIL foram dissecados e processados para a análise das concentrações de dopamina (DA) e seu metabólito ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por HPLC-ED. O sangue foi coletado pelo tronco e utilizado para a dosagem das concentrações plasmáticas de PRL por ELISA. (A) Concentração de DA na ME. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV nos horários de 10:00 h e 16:00 h. # $P < 0,05$ comparado ao grupo OV às 18:00 h. (B) Concentração de DOPAC na ME. * $P < 0,05$ comparado ao horário de 10:00 h no mesmo grupo; *** $P < 0,001$ comparado a 10:00 e 16:00 h dos respectivos grupos; # $P < 0,05$ comparado ao OV e OV-4 às 16:00 h. (C) Razão DOPAC/DA na ME. *** $P < 0,001$ comparado aos respectivos grupos nos horários de 10:00 h e 16:00 h. (D) Concentração de DA no NIL. (E) Concentração de DOPAC no NIL. * $P < 0,05$ comparado ao horário de 10:00 h no

mesmo grupo; *** $P < 0,001$ comparado ao horário de 10:00 e 16:00 h dos respectivos grupos. # $P < 0,05$ comparado aos grupos OV e OVE-80 às 16:00 h. (F) Razão DOPAC/DA no NIL. ** $P < 0,01$ comparado aos horários de 10:00 h e 16:00 h nos respectivos grupos. (G) Concentração plasmática de PRL. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao horário de 10:00 h para os grupos OVE-4 e OVE-80. ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ comparado ao grupo OV no mesmo tempo. ++ $P < 0,01$ comparado ao grupo OVE-4 às 18:00 h. Dados expressos em média \pm EPM.

Desse modo, ainda buscando identificar o fator-chave para a gênese do pico de PRL, foi realizada a quantificação na adenohipófise do mRNA de genes relacionados à PRL. Neste caso, em concordância com o perfil de secreção de PRL, ambos os grupos tratados com E2 apresentaram maior expressão de *Prl* quando comparados aos animais OV ($P < 0,001$) (Fig. 6A). Em comparação ao grupo OV, os dois níveis de E2 reduziram a expressão de *Drd2* ($P < 0,01$ para OVE-4 e $P < 0,001$ para OVE-80) e aumentaram a expressão de *Oxtr* ($P < 0,01$ para OVE-4 e $P < 0,001$ para OVE-80) (Fig. 6B, C). Em termos de receptores esteroidais, os genes *Esr1* e *Esr2* foram inibidos por ambos os tratamentos com E2 ($P < 0,01$ para OVE-4 e $P < 0,001$ para OVE-80) (Fig. 6D, E), enquanto o *Pgr* aumentou somente no grupo OVE-80 ($P < 0,001$) (Fig. 6F). Em oposição às alterações hipofisárias, o mRNA de *Otx* no PVN não foi alterado em resposta ao E2. Desse modo, a regulação pelo E2 dos genes de PRL, receptor D2 dopaminérgico, OT-R, ER α e ER β na adenohipófise apresentou-se associada à gênese do pico de PRL induzido por E2.

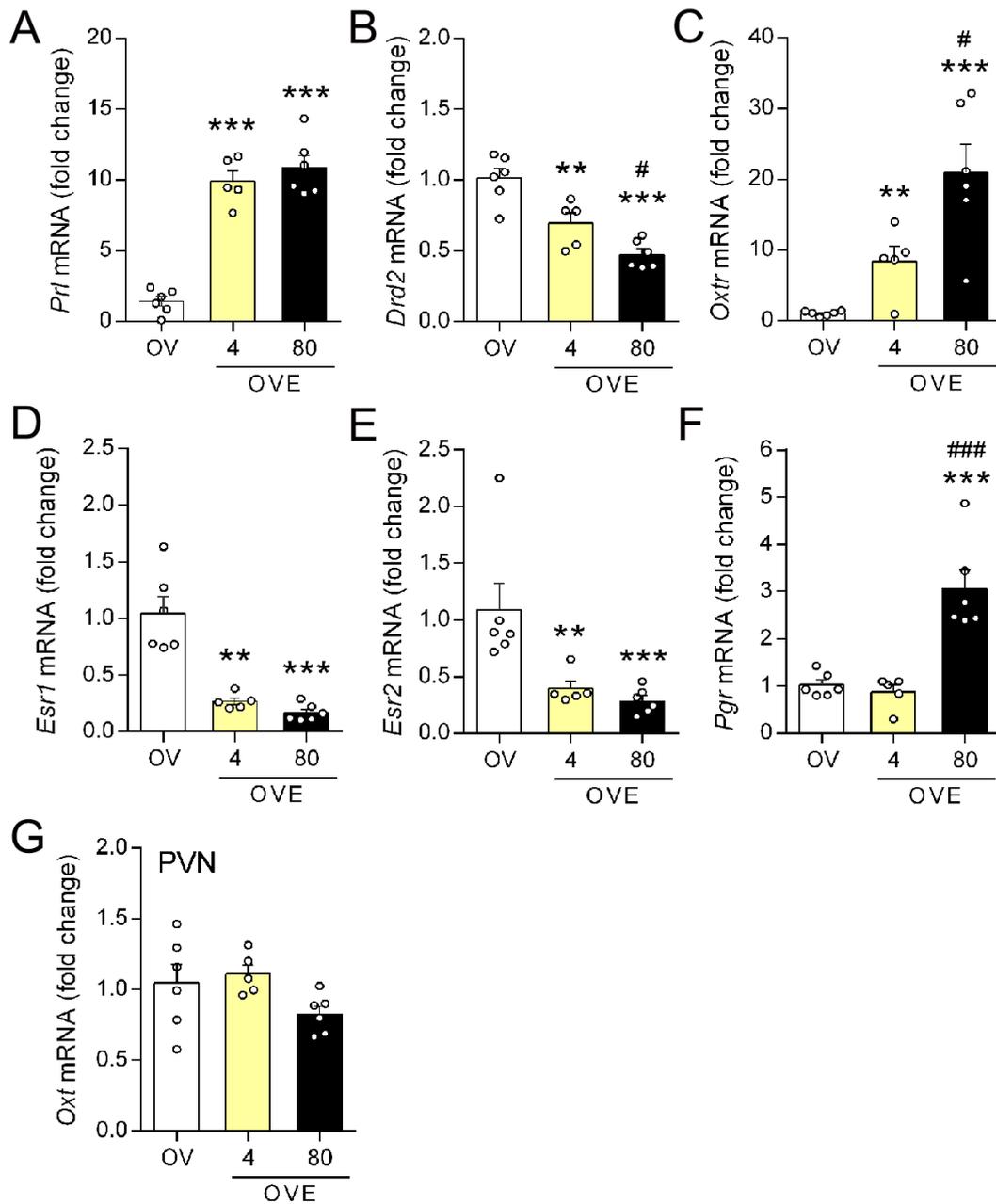


Figura 6: Efeitos do E2 na expressão de genes relacionados ao controle da PRL na adenohipófise. Ratas OV foram tratadas com óleo de milho (OV; n = 6) ou E2 em doses de 4 (OVE-4; n = 5) ou 80 (OVE-80; n = 6) µg/kg por três dias. No dia experimental, as ratas foram decapitadas às 16:00 h, e a hipófise anterior foi dissecada e processada para a análise do RNAm de *Prl*, *Drd2*, *Oxtr*, *Ers1*, *Esr2* e *Pgr*. Adicionalmente, o mRNA de *Oxt* foi quantificado no PVN. (A) Expressão de *Prl* na hipófise anterior. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. (B) Expressão de *Drd2* na hipófise anterior. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. # $P < 0,05$ comparado ao grupo OVE-4. (C) Expressão de *Oxtr* na hipófise anterior. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. # $P < 0,05$ comparado ao grupo OVE-4. (D) Expressão de *Ers1* na hipófise anterior. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. (E)

Expressão de *Ers2* na hipófise anterior. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. (F) Expressão de *Pgr* na hipófise anterior. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV. ### $P < 0,001$ comparado ao grupo OVE-4. (G) Expressão de *Oxt* no PVN. Dados expressos em média \pm EPM.

3.3 Experimento 3: Papel dos subtipos de ER na gênese do pico de PRL induzido por E2

No experimento anterior, observamos que a regulação da expressão do mRNA para ERs na hipófise anterior está relacionada a gênese do pico de PRL induzido por E2. Este experimento teve por objetivo determinar o papel específico dos receptores ER α e ER β nesse processo. Como se pode observar na figura 7, o tratamento das ratas com o agonista seletivo para ER β , o DPN, não foi capaz de induzir a ocorrência de um pico na secreção de PRL. Por sua vez, a ativação seletiva de ER α com PPT aumentou os níveis basais de PRL em relação às ratas OV-DPN e induziu um pico na secreção de PRL no período da tarde ($P < 0,001$), embora de magnitude inferior ao aumento observado em ratas OVE-80 (Fig. 7A-B). Como prova da eficiência da ativação de ER α (Aquino et al., 2017), o tratamento com PPT promoveu um aumento no peso uterino de forma similar ao observado em ratas OVE-80 ($P < 0,05$ para OV-PPT e $P < 0,01$ para OVE-80), o que não ocorreu no grupo OV-DPN (Aquino et al., 2017). Estes dados demonstram que ER α está envolvido na gênese do pico de PRL induzido por E2. A menor magnitude do pico de PRL em relação ao induzido por E2 pode ser devido à dose de PPT utilizada. Embora esta dose tenha sido efetiva tal qual o E2 para aumentar o peso uterino, é possível que doses maiores de PPT sejam requeridas para indução de um pico de PRL de tamanho correspondente ao PRO. Esta possibilidade é reforçada pelo fato das ratas OV+PPT não terem apresentado aumento da secreção de LH (dados não apresentados).

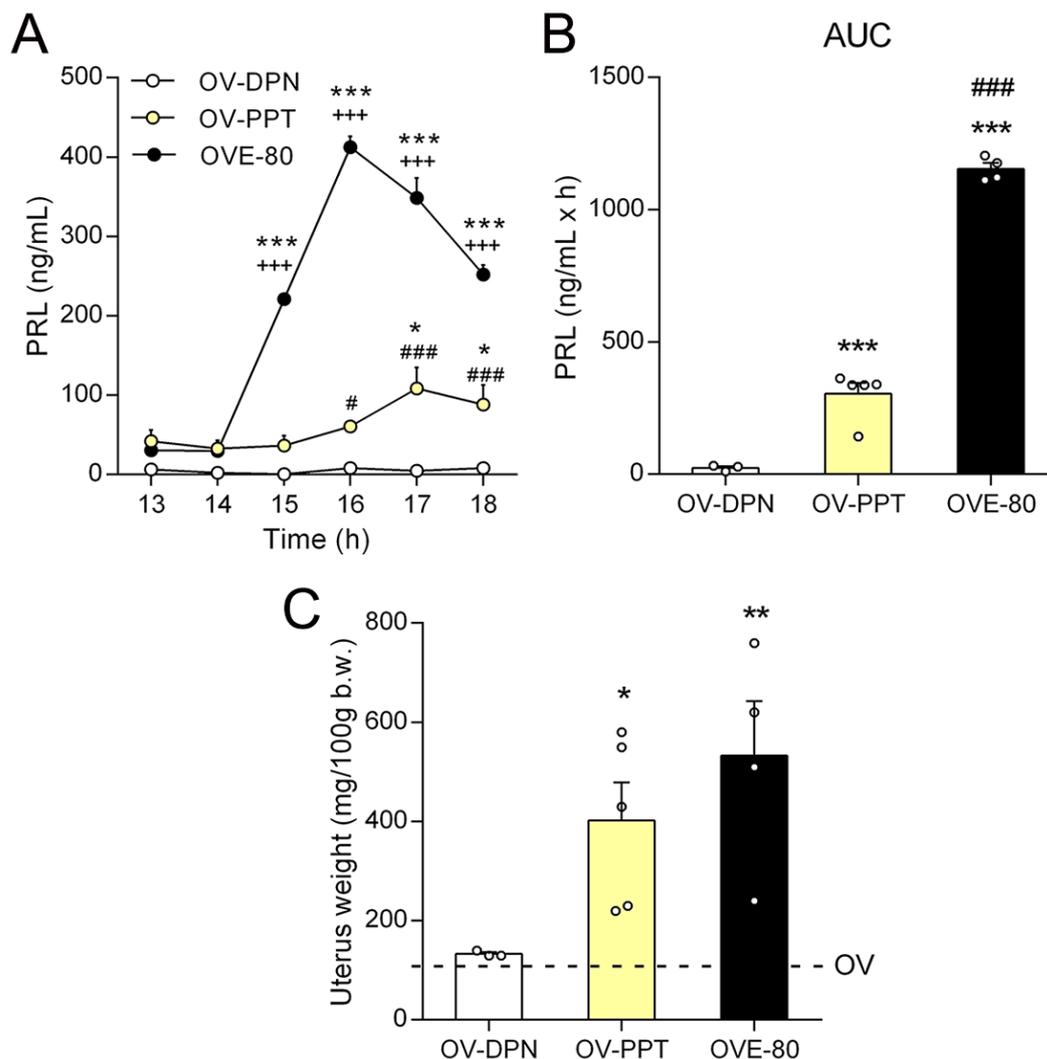


Figura 7: Efeito do tratamento com agonistas seletivos para ER α e ER β sobre a secreção de PRL e seus efeitos uterinos. Ratas OV foram tratadas com E2 na dose de 80 μ g/kg (OVE-80; n = 4), com o agonista para ER α (OV-PPT; n = 5) ou o agonista para ER β (OV-DPN; n = 3) por três dias. No dia experimental, amostras de sangue foram coletadas de hora em hora, das 13:00 h às 18:00 h, e os úteros foram retirados para a pesagem. Os níveis de PRL das amostras de sangue foram dosados através de ELISA. (A) Perfil de secreção de PRL ao longo da tarde. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado às 13:00 h. +++ $P < 0,001$ comparado ao mesmo horário nos grupos OV-PPT e OV-DPN. # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ comparado ao mesmo horário no grupo OV-DPN. (B) AUC dos níveis de PRL. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo OV-DPN. ### $P < 0,001$ comparado ao grupo OV-PPT. (C) Peso do útero das ratas tratadas com agonistas seletivos para ERs e de ratas OVE-80. As linhas pontilhadas correspondem ao peso uterino de ratas OV, como parâmetro de comparação. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparado ao grupo OV-DPN. Dados expressos em média \pm EPM.

4 DISCUSSÃO

O controle hipotalâmico da secreção de PRL é exercido, principalmente, pela inibição e estimulação da atividade de neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos (Grattan & Kokay, 2008). No entanto, síntese (Maurer & Gorski, 1977) e liberação de PRL (Caligaris et al., 1974) pela hipófise anterior são induzidas pela elevação nos níveis sanguíneos de E2. Assim, no presente estudo, utilizamos como ferramentas duas diferentes doses de E2, uma baixa de 4 µg/kg e outra alta de 80 µg/kg, para investigar o mecanismo através do qual o E2 estimula a ocorrência do pico na secreção de PRL em ratas. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa mostrou que essas doses promovem níveis sanguíneos de E2 e efeitos uterinos similares às fases de DI e PRO (Henriques et al., 2021). Ademais, ratas intactas nessas duas fases do ciclo estral foram utilizadas como nossos controles fisiológicos de baixos e altos níveis de E2, respectivamente. De modo interessante, nossos resultados mostraram que há uma diminuição diária no tônus dopaminérgico, independente dos níveis sanguíneos de E2 e que, portanto, alterações na atividade dopaminérgica não são capazes de gerar, por si só, o pico de PRL induzido por E2. Ao mesmo tempo, o E2 parece agir na hipófise anterior modulando genes relacionados à PRL, e tornando os lactotrofos menos responsivos a inibição dopaminérgica e mais responsivos a fatores liberadores de PRL (PRFs) como a OT, possibilitando assim a ocorrência do pico hormonal.

O primeiro passo desse estudo foi avaliar o efeito das doses baixa e alta de E2 sobre a secreção de PRL, e comparar esses resultados aos observados em ratas em DI e PRO. De modo consistente com a literatura, em nosso trabalho, ratas em PRO apresentaram um pico na secreção de PRL à tarde (Lerant & Freeman, 1997; DeMaria et al., 1998; Yang et al., 1999; Freeman et al., 2000; Ben-Jonathan et al., 2008), enquanto ratas OV apresentaram níveis constantes de PRL ao longo da tarde (Lerant &

Freeman, 1997). Adicionalmente, nossos resultados mostram que tanto baixos quanto altos níveis fisiológicos de E2 são igualmente capazes de induzir um pico na secreção de PRL em ratas OV, de modo semelhante ao observado em ratas em PRO. O efeito do E2 sobre a secreção de PRL em ratas OV já é bastante claro na literatura, e doses baixas de E2 já se mostraram eficientes na promoção do aumento na secreção de PRL (Mallampati & Johnson, 1973; Caligaris et al., 1974). Ainda, de modo interessante, foi observado um pequeno aumento na secreção de PRL no último horário de coleta em ratas OV e DI. O estabelecimento de doses alta e baixa de E2 na promoção do pico de PRL foi um importante passo nesse estudo e foi utilizado como ferramenta para decifrar o que é essencial e o que é modulatório na geração do pico de PRL. A maior parte dos artigos na literatura utiliza altas doses de E2, sem saber, portanto, se aqueles efeitos observados são de fato essenciais para o pico.

Em seguida, então, nós avaliamos a participação dos neurônios dopaminérgicos no pico de PRL induzido por E2 através da marcação imunofluorescente da enzima-limitante para a produção de DA (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001), a TH, bem como sua forma fosforilada. A razão $S^{40}pTH/TH$ na ME é um indicativo da taxa de atividade da TH nos terminais de neurônios TIDA. Não houve diferença na razão $S^{40}pTH/TH$ entre as ratas em DI e PRO. Já na análise das ratas OV, uma diminuição na razão $S^{40}pTH/TH$ foi observada somente nas ratas OVE-80. Trabalhos de Liu e colaboradores mostraram que há uma diminuição da fosforilação de TH na ME às 17:00 h do PRO comparado com o período da manhã, e que, às 11:00h do estro, esses níveis retornam aos encontrados na manhã do PRO (Liu & Arbogast, 2008, 2010). No entanto, este trabalho não analisa os níveis de fosforilação de TH às 17:00 h nas ratas em estro. Se esta análise fosse feita, é possível que uma diminuição na fosforilação de TH também fosse observada, já que esta parece ser uma variação diária, que independe dos níveis

circulantes de E2. Arbogast e colaboradores observaram uma diminuição da atividade de TH em ratas OVE comparadas a ratas OV (Arbogast & Hyde, 2000). Neste trabalho, no entanto, foram utilizadas doses de E2 muito altas, que resultaram em níveis circulantes de E2 extrafisiológicos. Em nosso estudo, essa diminuição da fosforilação de TH foi observada somente nas ratas tratadas com a maior dose de E2. Estes exemplos frisam a importância da utilização de mais de uma dose de E2 para a distinção dos fatores essenciais e modulatórios na gênese do pico de PRL induzido por E2. A utilização das duas doses em nosso estudo mostrou que a ocorrência do pico de PRL não parece ser dependente de um efeito estrogênico de reduzir a atividade enzimática desses neurônios, uma vez que ratas em PRO e OVE-4 não diferiram dos seus respectivos controles DI e OV, apesar de apresentarem marcante pico de PRL à tarde. A modulação da atividade desses neurônios por altos níveis de E2 pode ser responsável, no entanto, por uma facilitação do pico de PRL, que se apresentou maior no início e no final da tarde no grupo de ratas OVE-80. Este é um resultado interessante que mostra que o mecanismo regulador do pico da secreção de PRL no PRO não possui a mesma gênese do aumento dos níveis de PRL observado, por exemplo, em ratas lactantes. Durante a lactação, a sucção do mamilo é um importante estímulo que gera uma diminuição na razão $S^{40}pTH/TH$ (Silva et al., 2020b), característica que não está, obrigatoriamente, presente nas ratas virgens durante o pico de PRL induzido por E2.

Em seguida, avaliamos o efeito dos tratamentos com E2 sobre a atividade de núcleos hipotalâmicos associados ao controle da secreção de PRL. No entanto, não encontramos uma correlação entre a expressão de c-Fos nesses núcleos e a ocorrência do pico, uma vez que houve diminuição na ativação neuronal no PeN e PVN em ratas OVE-4, em contraste com um aumento nessa ativação no grupo OVE-80. Ademais, não houve diferença na ativação desses núcleos entre ratas em DI e PRO, ainda que o pico

de PRL esteja presente somente no último grupo. Esses resultados sugerem que a ativação hipotalâmica também não deve ser o fator-chave responsável pela ocorrência do pico de PRL induzido por E2, mas, assim como a atividade enzimática dos neurônios dopaminérgicos, também pode ter papel modulatório no formato do pico, devido ao aumento da atividade de c-Fos no PeN e PVN observado apenas no grupo OVE-80. De modo divergente do nosso estudo, trabalho de Yang e colaboradores mostraram maior expressão de Fos na MPA às 18:00 h em ratas em PRO quando comparadas à ratas em DI (Yang et al., 1999). No entanto, a região analisada parece ter sido mais extensa do que a região analisada no presente estudo. Yang e colaboradores parecem ter contabilizado a região periventricular no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), que sabidamente sofre ativação associada a secreção de GnRH/LH pré-ovulatórios. Em nossa análise, essa região não foi considerada como parte da MPA, o que pode justificar a diferença entre esses resultados. Por outro lado, de modo semelhante aos nossos resultados, o trabalho de Yang não detectou diferença na expressão de Fos no PVN entre ratas em DI e PRO no momento do pico de PRL. Apesar de não termos encontrado correlação entre a ativação dos núcleos analisados e o pico de PRL induzido por E2, não se pode excluir a participação de outros núcleos hipotalâmicos nesse processo. Existem controvérsias na literatura quanto à ativação de outras regiões hipotalâmicas em associação ao pico na secreção de PRL. Há estudos que mostram aumento da ativação da amígdala, núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH) no momento do pico de PRL em ratas em PRO (Yang et al., 1999) e gestantes (Lee et al., 1998). O trabalho de Auger e colaboradores (Auger & Blaustein, 1995), por outro lado, só observou o aumento de Fos no DMH em ratas OVE comparadas às ratas OV, com ausência de ativação da amígdala e VMH.

No experimento 2, avaliamos a atividade neuroquímica dopaminérgica em resposta ao E2 através da análise das concentrações de DA e seu metabólito, o DOPAC, na ME e no NIL, regiões onde se encontram os terminais dos neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos (Holzbauer & Racké, 1985; Kawano & Daikoku, 1987; Goudreau et al., 1995). A razão DOPAC/DA é uma medida da atividade dopaminérgica advinda desses terminais neuronais (Lookingland et al., 1987; Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Nossos resultados mostraram que há uma diminuição nessa atividade em todos os grupos experimentais no final da tarde, o que indica que, nesse período, há uma redução no tônus dopaminérgico inibitório de forma independente da presença do E2. Essa redução parece funcionar como um sinalizador temporal para a ocorrência do pico de PRL que, no entanto, só ocorre em sua total magnitude em ratas expostas ao E2. Todavia, esta variação diária é condizente com o leve aumento observado nos níveis de PRL ao final da tarde do DI e em ratas OV, as quais apresentam baixos níveis de E2. Apesar de apresentarem níveis circulantes de E2 compatíveis com ratas OVE-4, ratas na fase de DI não apresentam o pico de PRL induzido por E2. Assim, é provável que haja algum fator de origem ovariana ainda não determinado que impede a ocorrência do pico de PRL no DI.

Estudos anteriores já haviam mostrado uma diminuição na atividade de neurônios TIDA através da análise de DOPAC na ME em ratas OV e OVE (Mai et al., 1994; Shieh et al., 1997), assim como foi visto em nosso estudo. Shieh e colaboradores também observaram essa diminuição em ratas intactas, independente da fase do ciclo em que elas se encontravam (Shieh & Pan, 1996). De modo interessante, lesões bilaterais no núcleo supraquiasmático (SCN) foram capazes de abolir essa mudança na atividade dopaminérgica observada no período da tarde (Mai et al., 1994). Isso acontece porque os neurônios dopaminérgicos em ratas apresentam atividade circadiana, e essa

ritmicidade não depende de E2 (Sellix & Freeman, 2003). Esse controle circadiano se dá por fibras eferentes do SCN, que liberam o peptídeo vasoativo intestinal, que modula os ritmos circadianos dos neurônios dopaminérgicos neuroendócrinos (Gerhold et al., 2001; Egli et al., 2004). De fato, existe ampla evidência de que a secreção de PRL em ratas seja controlada por inputs circadianos. Sabe-se que ratas que recebem estímulo no cérvix uterino apresentam dois picos diários na secreção de PRL. Estudos de Bethea e colaboradores mostraram que a secreção de PRL é mantida em ambiente de luz ou escuro constante, e é abolida pela lesão do SQN em ratas que receberam estímulo cervical (Bethea & Neill, 1979, 1980). Lesão no SQN também é capaz de abolir o pico de PRL em ratas OVE (Mai et al., 1994). O tratamento de ratas estimuladas cervicalmente com coquetel de antisenses de genes do relógio aboliu os picos de PRL observados nessa condição fisiológica, o que reforça o papel-chave do SQN na secreção de PRL (Poletini et al., 2010).

Utilizando outra metodologia, Lerant e Freeman fizeram dupla marcação para TH e antígenos relacionados ao Fos (FRA) no ARC e PeN em cérebros de ratas em PRO e OV que foram sacrificadas ao longo do dia. Eles observaram que a porcentagem de neurônios TH expressando FRA era maior no começo do dia, e apresentava significativa diminuição das 15:00 h às 17:00 h, retornando aos altos níveis no período da noite (Lerant & Freeman, 1997). De modo interessante, e em concordância com os nossos dados, não houve diferença nesse padrão entre ratas em PRO e ratas OV, o que é coerente com nossos achados de que há uma diminuição diária da atividade dopaminérgica independente dos níveis circulantes de E2 no período da tarde em ratas.

Os resultados dos experimentos 1 e a dosagem de DA e DOPAC realizada na primeira parte do experimento 2 indicam que ações hipotalâmicas do E2 não sejam fator-chave responsável pela gênese do pico de secreção de PRL. De fato, estudos

anteriores também já haviam mostrado que a diminuição fisiológica do tônus dopaminérgico em ratas não é suficiente para desencadear, por si só, um pico na secreção da PRL (De Greef & Neill, 1979; Arey et al., 1989). Por outro lado, sabe-se que a ativação de receptores D2 dopaminérgicos com bromocriptina é capaz de bloquear o pico de PRL do PRO (Krieg & Cassidy, 1984). Assim, embora não modulada pelo E2, a redução diária do tônus dopaminérgico corresponde a um componente hipotalâmico essencial para a gênese do pico de PRL induzido por este hormônio.

Nosso próximo passo foi, então, analisar a regulação hipofisária exercida pelo E2. Em concordância com os dados hormonais anteriores, e como já observado por Shull e colaboradores em 1985 (Shull & Gorski, 1985), o tratamento com E2 estimulou a transcrição do gene para PRL. A análise da expressão de receptores dopaminérgicos na hipófise anterior ao longo do ciclo estral de ratas mostra uma diminuição rápida e marcante no número de receptores na tarde do PRO, que coincide com o pico de PRL (Pasqualini et al., 1984; Zabavnik et al., 1993). Além disso, em 1985, DiPaolo e colaboradores (Di Paolo & Falardeau, 1985) mostraram que o tratamento de ratas OV com E2 causa diminuição na expressão de receptores dopaminérgicos na hipófise anterior. Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos no nosso estudo, que mostraram que há uma diminuição na expressão de *D2r* na hipófise anterior de ratas OVE em relação às ratas OV, e que essa diminuição ocorre mediante baixos e altos níveis de E2. Dessa forma, o estudo de Pasqualini e de DiPaollo corrobora nossa hipótese de que uma regulação na expressão desse receptor contribua para a gênese do pico de PRL.

De modo contrário ao observado para *D2r*, o tratamento de ratas OV com ambas as doses de E2 aumentou a expressão do mRNA para OT-R na hipófise anterior. Este resultado está de acordo com os achados de Kennett e colaboradores (Kennett et al.,

2009) que observaram, em 2009, que ratas OVE apresentam maior densidade de OT-R na hipófise anterior do que ratas OV. A OT, identificada como um potencial PRF, exerce papel importante na manutenção do ritmo endógeno de secreção da PRL. Ela é produzida a nível hipotalâmico e, além de ser liberada pela hipófise posterior na circulação periférica, também pode ser transportada para a hipófise anterior via vasculatura porta (Sarkar & Gibbs, 1984). Swanson e Sawchenko (Swanson & Sawchenko, 1983) mostraram que neurônios OT do PVN se projetam para a ME. Foi observado que as concentrações plasmáticas de OT aumentam em resposta à administração de E2 (Yamaguchi et al., 1979) e já foi demonstrado, também, que há um pico na concentração de OT no sangue porta hipofisário na tarde do PRO (Sarkar & Gibbs, 1984), quando os níveis de E2 estão elevados (Smith et al., 1975). Adicionalmente, estudos prévios relatam que a imunoneutralização da OT endógena ou a administração periférica de antagonista OT-R atenuam ou inibem o pico de PRL induzido por E2 (Samson et al., 1986; Johnston & Negro-Vilar, 1988; Sarkar, 1988). A expressão de OT-R é influenciada por E2, uma vez que seu gene promotor contém um elemento responsivo ao estrógeno (Bale & Dorsa, 1997). O estudo de Breton e colaboradores mostrou que a expressão desse receptor na hipófise anterior é altamente específica e restrita aos lactotrofos e que o tratamento com E2 aumenta substancialmente a expressão do RNAm para OT-R na hipófise anterior de ratas OV (Breton et al., 1995). Nossos dados demonstram que essa regulação do E2 sobre a expressão desse receptor se dá sob baixos e altos níveis de E2, estando, portanto, associada a gênese do pico de PRL induzido por E2.

Maior porcentagem de neurônios OT expressando Fos foi observada em ratas OV sacrificadas às 17:00 h em relação a ratas sacrificadas às 12:00 h (Arey & Freeman, 1992). Nós só fizemos essa análise de dupla marcação de c-Fos e OT em um horário do

dia (às 18:00 h), e nossos dados mostraram que o grupo OVE-80 exibe maior porcentagem de neurônios OT expressando c-Fos em relação aos grupos OV e OVE-4. Todavia, assim como o estudo citado anteriormente, é possível que a ativação de neurônios OT estivesse menor no período da manhã em todos os nossos grupos experimentais e que houvesse aumento nesse parâmetro em todos eles, independente dos níveis circulantes de E2.

Em estudo feito por Bertram e colaboradores (Bertram et al., 2010), foi feita a administração de OT em lactotrofos coletados na manhã do metaestro ou no PRO, e a secreção de PRL foi avaliada. De modo muito interessante, os lactotrofos obtidos no PRO foram significativamente mais responsivos à OT do que os obtidos na fase de metaestro. Essa maior responsividade dos lactotrofos do PRO correspondeu a uma maior reposta de cálcio intracelular. Isto vai ao encontro a outras observações feitas pelo mesmo grupo de pesquisa, que viu que a expressão de receptores para OT é estimulada por E2 na hipófise anterior (Kennett et al., 2009). Ao mesmo tempo, a PRL entra no cérebro através de um sistema de transporte mediado por carreador (Brown et al., 2016) e inibe a atividade de neurônios OT (Kokay et al., 2006) pela indução de uma hiperpolarização (Sirzen-Zelenskaya et al., 2011) para diminuir a secreção de PRL induzida por OT. De fato, análise imunohistoquímica de dupla marcação para OT e pSTAT5 mostrou que neurônios OT estavam constantemente inibidos pela administração icv de PRL em ratas virgens (Augustine et al., 2017). Esses estudos mostram o importante papel da OT no controle da secreção de PRL e do pico desse hormônio. A análise do mRNA para OT no PVN em nosso estudo mostrou que não há diferença nessa expressão entre ratas que receberam ou não tratamento com E2. No entanto, houve um importante aumento na expressão de OT-R na hipófise anterior pelo

E2, que deve ser considerado, portanto, como um componente hipofisário adicional na geração do pico de secreção de PRL.

No presente trabalho, ratas OV que receberam tratamento com E2 apresentaram expressão diminuída do mRNA para *Esr1* e *Esr2* na adenohipófise. Nesse caso, esses receptores foram regulados negativamente pelo tratamento com E2. Esse resultado está de acordo com o trabalho de Schreihofe e colaboradores (Schreihofe et al., 2000), em que foram feitas análises na hipófise anterior de ratas *in vivo* e *in vitro*. Esse grupo observou que o tratamento de ratas OV com E2 suprime a expressão hipofisária de ER α e ER β , o que também foi observado em ratas em PRO. Além disso, o mesmo padrão foi observado em cultura de lactotrofos, cuja expressão de ERs foi inibida pelo tratamento com E2. Tena-Sempere e colaboradores também observaram que a castração de ratas gera um aumento na expressão de ERs quando comparado a ratas em PRO, que mostra o efeito inibitório do E2 sobre a expressão desses receptores (Tena-Sempere et al., 2004). Assim, nossos dados demonstram que baixos e altos níveis de E2 resultam em redução da expressão de ER α e ER β na hipófise, enquanto apenas altos níveis de E2 foram capazes de induzir a expressão do receptor para progesterona. O efeito modulatório do E2 sobre a expressão de seus receptores na hipófise anterior que observamos no nosso trabalho nos levou à realização do último experimento desse estudo. Neste experimento, ativamos seletivamente os receptores ER α e ER β com seus respectivos agonistas seletivos: PPT e DPN, respectivamente, e avaliamos o perfil de resposta da PRL. Os resultados obtidos nesse experimento mostraram que somente o PPT foi capaz de estimular a ocorrência de um pico na secreção de PRL, ainda que a magnitude desse pico tenha sido inferior a observada nas ratas tratadas com E2. Estes dados demonstram que ativação seletiva de ER α , mas não de ER β , é capaz de gerar um pico de PRL semelhante ao induzido pelo E2. Sanchez-Criado e colaboradores

(Sánchez-Criado et al., 2004) trataram ratas OV com E2, PPT e DPN, e avaliaram a secreção de LH e PRL no período da manhã. Embora não tenham avaliado a gênese do pico de secreção hormonal, foi observado que os tratamentos com E2 e com PPT promoveram aumento nos níveis basais de PRL, enquanto o tratamento com DPN não teve efeitos sobre os níveis basais de PRL ou peso uterino. Nossos dados indicam que o ER α está envolvido na gênese do pico de PRL induzido por E2. Estudos anteriores mostraram que ER α está presente em níveis mais elevados que ER β na hipófise anterior, inclusive nos lactotrofos (Mitchner et al., 1998; Shughrue et al., 1998). Essa diferença nos níveis de expressão entre os ERs está em concordância com o papel mais expressivo exercido por ER α no controle do pico de PRL induzido por E2. Todavia, é possível que a dose de PPT utilizada em nosso estudo não tenha sido suficientemente alta para recriar a magnitude fisiológica do pico de PRL do PRO, ainda que seu efeito uterino tenha sido semelhante. Esta interpretação é reforçada pelo fato desta dose de PPT não ter sido capaz de induzir aumento da secreção de LH nestes animais, embora seja sabido que o ER α é responsável pelo efeito de retroalimentação positiva do E2 sobre a secreção de LH. No entanto, o envolvimento de outros receptores esteroidais na gênese do pico de PRL não pode ser totalmente descartado, e também poderia explicar a menor magnitude do pico induzido pelo PPT. Um dos possíveis receptores que possa ter importante participação nesse processo é o próprio ER β . Isto porque, estudo realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que, apesar do DPN não ser capaz de gerar um pico na secreção do LH, ele causa uma amplificação significativa no tamanho do pico hormonal quando administrado juntamente com E2 (Henriques et al., 2021). É possível que o mesmo processo ocorra para o pico de PRL. Outra hipótese que podemos levantar é da participação do receptor para estrógenos de membrana (GPER), uma vez que estudos mostram que o tratamento de cultura de células hipofisárias com seu agonista estimula a

secreção de PRL (Camilletti et al., 2019), e sua administração i.c.v. pode provocar um pico na secreção de PRL em ratas OV (Lebesgue et al., 2009). Assim, experimentos adicionais são ainda necessários para se esclarecer o envolvimento de ER e GPER na gênese do pico de PRL induzido por E2.

CONCLUSÃO

Os experimentos realizados neste trabalho nos permitem concluir, conforme representado na figura 8, que há uma diminuição diária, à tarde, no tônus inibitório exercido pela DA, independente da presença de E2. Ao mesmo tempo, o E2 age na hipófise anterior, ao menos em parte através do seu receptor do tipo α , modulando genes responsáveis pela tradução da PRL, dos receptores para DA e para OT, alterando assim a responsividade dos lactotrofos aos inputs hipotalâmicos inibitórios e excitatórios. Esta ação hipofisária do E2 é permissiva para a ocorrência do pico de secreção de PRL, que é deflagrado pela redução diária na secreção de DA e possível envolvimento de PRFs.

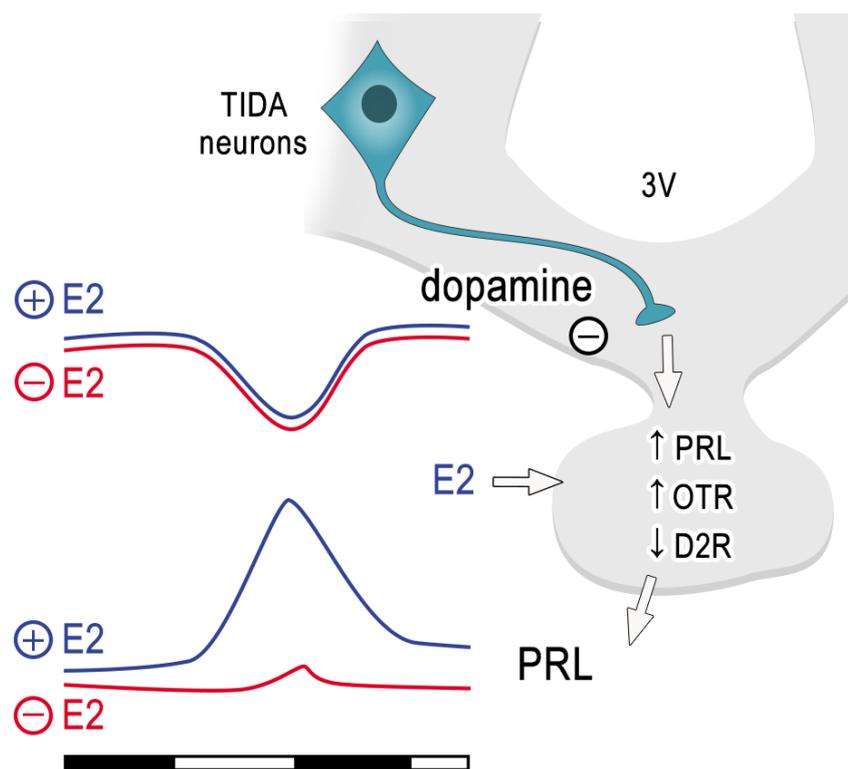


Figura 8: Modelo proposto do controle do pico de PRL induzido por E2. Os experimentos realizados nesse estudo nos permitiram concluir que há uma diminuição diária no tônus dopaminérgico que independe da presença de E2. Ao mesmo tempo, o E2 controla a expressão hipofisária dos genes *D2r*, *OTr* e *Prl*, ao menos em parte através da ligação ao $ER\alpha$, sensibilizando os lactotrofos aos inputs estimulatórios e inibitórios provenientes do hipotálamo, e possibilitando a ocorrência do pico na secreção de PRL.

ESTUDO 2: MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS DA AÇÃO ANSIOLÍTICA DA PRL EM RATOS

Ansiedade

A ansiedade é definida como antecipação a uma ameaça futura. Do ponto de vista evolutivo, a ansiedade é considerada uma resposta adaptativa, uma vez que promove comportamentos de cautela, que aumentam a taxa de sobrevivência (Crocq, 2015). As respostas fisiológicas e comportamentais que acompanham a ansiedade preparam o indivíduo para reagir de forma apropriada em situações potencialmente perigosas. Portanto, a ansiedade possibilita o indivíduo a escapar de um perigo e a evitá-lo no futuro (Ohl et al., 2008). No entanto, há uma linha que divide a ansiedade adaptativa normal e a ansiedade patológica, que causa prejuízos ao sujeito, e requer tratamento clínico (Crocq, 2015; Robinson et al., 2019). A ansiedade patológica é um quadro persistente de ansiedade e preocupação excessiva, que gera respostas fisiológicas e comportamentais sem valor adaptativo. A imprevisibilidade dos fatores ambientais é um fator-chave para o desenvolvimento dessas disfunções comportamentais (Ohl et al., 2008). O estudo das desordens de ansiedade é essencial uma vez que elas afetam parcela significativa da população e são altamente prevalentes na vida adulta (Remes et al., 2016).

Ferramentas para a análise da ansiedade em roedores

Existe grande variedade de testes para a avaliação do comportamento do tipo ansioso em roedores. Estes testes se dividem em duas categorias: os que envolvem respostas condicionadas e os que envolvem respostas não condicionadas (Bourin, 2015). A primeira categoria abrange respostas condicionadas dos animais a eventos estressantes ou dolorosos como, por exemplo, a exposição a um choque elétrico. Já a segunda categoria envolve reações naturais ou espontâneas dos animais a estímulos

estressores que não envolvem, explicitamente, dor ou desconforto. Uma grande vantagem dessa categoria é que não requer treinamento prévio dos animais. A exposição do animal a um ambiente novo e altamente iluminado ou a um predador são exemplos de testes de resposta não condicionada (Bourin, 2015). Neste trabalho, nós utilizamos dois testes de resposta não condicionada, que foram o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste da neofagia.

No teste do LCE, o animal é colocado no centro de uma plataforma elevada do chão que possui dois braços abertos e dois braços fechados, e o seu comportamento é gravado por um período de cinco minutos (Pellow et al., 1985; Walf & Frye, 2007). Esse teste é baseado na aversão natural dos roedores a espaços abertos, e baseia-se no conflito entre essa aversão e a sua motivação inata de explorar novos ambientes (Pellow et al., 1985; Rodgers & Dalvi, 1997; Walf & Frye, 2007; Ohl et al., 2008; Bourin, 2015). Os braços abertos do aparato representam um ambiente novo, desprotegido e elevado, e o comportamento exploratório desses braços pode ser parcial ou completamente inibido pela ansiedade, podendo ser utilizado como medida dos níveis de ansiedade do animal (Ohl et al., 2008; Bourin, 2015). Para a realização de análises confiáveis, é importante que cada laboratório valide o teste em suas próprias condições, fazendo uso, por exemplo, de controles positivos, como drogas com comprovado efeito ansiolítico (Walf & Frye, 2007). Em 1985, Pellow e colaboradores (Pellow et al., 1985) realizaram extenso trabalho de validação do teste do LCE, tratando animais com drogas ansiolíticas como o diazepam (DZP). Foi observado que ratos não tratados passam mais tempo nos braços fechados, e entram neles mais frequentemente do que nos braços abertos. Essa preferência provavelmente reflete uma aversão pelos braços abertos causada por ansiedade. Além disso, maior gama de comportamentos relacionados à ansiedade foi observada nos braços abertos (congelamento, imobilidade, defecação). De modo

bastante interessante, maiores concentrações de corticosterona plasmática foram encontradas em ratos confinados nos braços abertos do que em ratos confinados em braços fechados, comprovando o caráter aversivo dos braços abertos (Pellow et al., 1985; Rodgers & Dalvi, 1997). O aumento da exploração dos braços abertos no LCE foi observado somente com drogas clinicamente efetivas como ansiolíticas. A porcentagem de tempo gasto dos braços abertos parece ser mais sensível aos efeitos de drogas do que o número de entradas nos mesmos (Pellow et al., 1985).

O teste da neofagia (em inglês, novelty-induced suppression of feeding) mede o consumo de um alimento familiar em um ambiente novo (Rex et al., 1998). Para sua realização, o animal deve ser submetido a um período anterior de jejum, e, no dia do teste, o animal é colocado em uma arena que possui um centro mais iluminado, onde está localizado o alimento. O avaliador medirá a letência para o início da alimentação bem como o peso de alimento consumido (Rex et al., 1998). Esse teste é baseado no fato de que o animal deve primeiramente se sentir seguro no ambiente novo (se habituar), antes de fazer o comportamento ingestivo (Sousa et al., 2006).

Efeitos ansiolíticos da PRL

Os efeitos ansiolíticos da PRL já são conhecidos, apesar de ainda estarem apenas começando a ser estudados. Em um estudo realizado em 2001, foi observado que a administração aguda intracerebroventricular (i.c.v.) de PRL ovina (oPRL) em ratos machos e fêmeas causa uma diminuição no comportamento do tipo ansioso (Torner et al., 2001). Efeito semelhante também foi observado em 2007 por Donner e colaboradores (Donner et al., 2007), que demonstraram que em ratas OVE, a infusão i.c.v. de oPRL diminuiu o comportamento do tipo ansioso causado pelo estresse por contenção. Além disso, a supressão de PRL-R através da infusão i.c.v. crônica de sequências anti-senses aumenta o comportamento do tipo ansioso em ratas, eliminando

o seu efeito ansiolítico (Torner et al., 2001). De modo interessante, estados fisiológicos de altos níveis séricos de PRL também são caracterizados por reduzidos níveis de ansiedade. Assim, sabe-se que ratas em PRO (Szawka et al., 2005) e lactantes (Silva et al., 2020b), bem como ratos machos após copularem (Kamel et al., 1975; Kamel et al., 1977) exibem elevados níveis séricos de PRL. Animais nesses estados fisiológicos também apresentam reduzidos níveis de ansiedade (Kamel et al., 1977; Frye et al., 2000; Groër, 2005; Waldherr & Neumann, 2007).

O estresse é um importante estímulo para o aumento da PRL. Estudos em roedores mostraram que os níveis de PRL sofrem aumentos rápidos e significativos em resposta a estressores como contenção, vapor de éter, choque elétrico e barulho (Terkel et al., 1972; Siegel et al., 1980; Kant et al., 1983; Meerlo et al., 2001; Poletini et al., 2006; Kirk et al., 2017). Esses estressores agudos causam um aumento transiente nos níveis de PRL, que caem aproximadamente 60 minutos após o final do estímulo estressor (Ajika et al., 1972; Euker et al., 1975).

De modo interessante, embora a PRL seja um dos principais genes expressos na adenohipófise tanto de fêmeas quanto de machos (Cheung et al., 2018), não existe ainda um efeito claramente atribuído à PRL em machos. Diferentemente das fêmeas, a deficiência de PRL nos machos por si só não é capaz de causar infertilidade. Camundongos machos com deleção no gene para PRL apresentam pequenas alterações nos níveis de LH e FSH, e no tamanho da próstata e vesícula seminal (Steger et al., 1998). Já animais com deleção no receptor para PRL não apresentam nenhum tipo de alteração nos níveis de gonadotrofinas ou no peso dos órgãos reprodutivos (Binart et al., 2003). De qualquer forma, a capacidade reprodutiva desses dois grupos de animais geneticamente modificados se mantém inalterada, o que mostra que a PRL não é essencial para a fertilidade em machos. Neste sentido, talvez sua ação ansiolítica venha

a revelar-se como um importante efeito no sexo masculino. Desse modo, este segundo estudo teve como objetivo avaliar o efeito da PRL sobre a ansiedade em machos, e investigar o substrato neural responsável por mediar esse efeito.

1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos neuroendócrinos envolvidos no efeito da PRL sobre o comportamento do tipo ansioso em ratos.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos da administração aguda de PRL sobre a ansiedade em ratos;
- 2) Investigar o papel da testosterona no efeito da PRL sobre a ansiedade;
- 3) Mapear as possíveis regiões cerebrais responsáveis pelo efeito ansiolítico da PRL;
- 4) Avaliar o efeito do bloqueio do PRL-R e do receptor para OT (OT-R) sobre a ação ansiolítica da PRL;
- 5) Avaliar o papel da PRL na ativação do PVN induzida por estresse.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2 a 3 meses de idade, com peso corporal entre 250-300 g provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de cinco por caixa (39 x 32 x 17 cm), em ambiente de temperatura (22 ± 2 °C) e luz (12:00 h claro/12:00 h escuro; luzes acesas às 07:00 h) controlados, com água e ração *ad libitum*. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 338/2019).

2.2 Planejamento experimental

2.2.1 Experimento 1 (referente ao objetivo 1): Efeito da administração aguda de PRL sobre a ansiedade em ratos

Com o objetivo de determinar o efeito da PRL sobre a ansiedade em ratos, foi avaliado o efeito da administração aguda i.c.v. de PRL sobre o comportamento dos animais em dois testes comportamentais. Para isso, ratos foram implantados com cânulas i.c.v. Após 10 dias da cirurgia, foi feita a administração i.c.v. de 1 µL de veículo (Veh; n = 9) ou oPRL nas doses de 0,05 (PRL-0.05; n = 6), 0,5 (PRL-0.5; n = 6), 1 (PRL-1; n = 8) ou 3 (PRL-3; n = 6) µg/µL. Dez minutos após a infusão, os animais foram colocados no LCE por um período de 5 minutos. Animais tratados com DZP foram utilizados como controle positivo, uma vez que essa é uma droga com comprovado efeito ansiolítico (Fernández-Guasti & Picazo, 1997; Liebsch et al., 1998). Esses animais foram colocados no LCE 30 minutos após a administração i.p. da droga.

No dia seguinte, os mesmos animais foram colocados em jejum por 24 h e, na manhã seguinte, receberam novamente a infusão das mesmas doses de PRL ou veículo e, 10 minutos depois, passaram pelo teste de neofagia, onde permaneceram por trinta minutos.

2.2.2 Experimento 2 (referente ao objetivo 2): Papel da testosterona sobre a ação ansiolítica da PRL

Ações hipotalâmicas da PRL em fêmeas são frequentemente dependentes de E2 (Anderson et al., 2008). Assim, este experimento teve o objetivo de avaliar se o efeito da PRL sobre a ansiedade é dependente de esteroides sexuais em machos. Para isso, ratos foram implantados com cânulas i.c.v. e orquiectomizados (ORX). 3 dias após a cirurgia, iniciou-se o tratamento diário com testosterona (ORX+T) ou óleo (ORX) por 7 dias. No dia seguinte ao último dia de tratamento, os ratos receberam a infusão i.c.v. de PRL na dose de 0,5 µg/µl, definida a partir do experimento 1 (ORX+PRL, n = 7; ORX+T+PRL, n = 6) ou veículo (ORX+Veh, n = 8; ORX+T+Veh, n = 8) e, 10 minutos depois, foram colocados no LCE por um período de 5 minutos.

2.2.3 Experimento 3 (referente ao objetivo 3): Avaliação de possíveis regiões cerebrais responsáveis pelo efeito ansiolítico da PRL

Baseado nos achados do experimento 1, utilizamos as doses de PRL-0,5 e PRL-3, que induziram e não induziram efeito ansiolítico, respectivamente, com objetivo de determinar áreas cerebrais responsivas à PRL em associação ao seu efeito ansiolítico. A responsividade à PRL foi avaliada pela fosforilação do STAT5 (pSTAT5) (Brown et al., 2016). Ratos intactos foram implantados com cânulas i.c.v. Dez dias depois, foi feita a

administração i.c.v. de PRL-0,5 (n = 5), PRL-3 (n = 7) ou Veh (n = 6). Após 30 minutos, os ratos foram perfundidos e seus cérebros processados para a análise imunohistoquímica da marcação simples de pSTAT5 ou dupla marcação para pSTAT5 e OT.

2.2.4 Experimento 4 (referente ao objetivo 4): Avaliação do efeito do bloqueio de PRL-R e OT-R sobre o efeito ansiolítico da PRL

Resultados obtidos nos experimentos anteriores mostraram a diminuição da ansiedade causada pela administração da PRL e indicaram um possível envolvimento da OT neste efeito. Dessa forma, o experimento 4 teve o objetivo de avaliar se o bloqueio de PRL-R e OT-R, através da utilização de seus antagonistas, preveniria o efeito ansiolítico da PRL. Para isso, ratos intactos foram implantados com cânulas i.c.v.. Dez dias depois, foi feita a administração i.c.v. do modulador seletivo de PRL-R [S179D-PRL (S179D)], do antagonista para OT [Atosiban (ATO)] ou veículo. 10 minutos depois, foi feita a administração i.c.v. de PRL-0,5 ou veículo. Desse modo, obtivemos, neste experimento, 4 grupos experimentais: S179D + PRL (n = 6), ATO+PRL (n = 6), Veh+PRL (n = 12) e veículo + veículo (Veh; n = 12). Dez minutos após a última infusão, os animais foram colocados no LCE por um período de 5 minutos.

2.2.5 Experimento 5 (referente ao objetivo 5): Avaliação do efeito dos PRL-R sobre a expressão de Fos hipotalâmica em resposta ao estresse por contenção

Com o objetivo de confirmar o papel dos PRL-R no PVN no efeito ansiolítico da PRL, analisamos a taxa de expressão do marcador neuronal Fos, que é responsiva ao

aumento no nível de estresse dos animais (Weinberg et al., 2007), em resposta ao estresse por contenção. Para isso, ratos intactos foram implantados com cânulas i.c.v. Dez dias depois, foi feita a administração i.c.v. do S179D ou veículo. Dez minutos depois, foi feita a administração i.c.v. de PRL-0,5 ou veículo. Dez minutos após esta última injeção, os animais foram submetidos ao estresse por contenção por um período de 40 minutos. Desse modo, investigamos 3 grupos experimentais sob condições de estresse: S179D + PRL (S179D+PRL *stress*; n = 6), veículo + PRL (veh+PRL *stress*; n = 8) e veículo + veículo (Veh *stress*; n = 8). 30 minutos após a retirada do contensor, os ratos foram perfundidos e seus cérebros processados para a análise imunohistoquímica da marcação simples de Fos no ARC e PVN. Como controle para o estímulo de estresse, foram utilizados ratos que não passaram pelo protocolo de estresse por contenção (Cont; n = 5).

2.3 Anestésicos e drogas

Para a realização da cirurgia de i.c.v., orquiectomia e perfusão, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (cloridrato de cetamina; 80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.). Após as cirurgias, os animais receberam tratamento profilático com antibiótico (Pentabiótico, Fort Dodge; 24000 UI/Kg, i.m.) e analgésico (Flunixin meglumina; Banamine, Schering-Plough; 2,5 mg/Kg peso corporal, s.c.). A testosterona (propionato de testosterona; Organon, São Paulo, Brazil), foi administrada dissolvida em óleo de milho na dose de 0,25 mg/0.2mL, s.c. (Ribeiro et al., 2015). A PRL ovina (NHPP-oPRL-21, NIDDK-NHPP, EUA), foi utilizada nas doses de 0,05, 0,5, 1 ou 3 µg/µL diluída em salina 0,9% e administrada i.c.v.. O modulador seletivo de PRL-R (S179D-PRL, doação de Dr. Ameae M. Walker, University of California, Riverside, CA 92521) (Nephew et al., 2007; Morales et al., 2014) foi diluído em salina 0,9% na dose

de 2,5 µg/2µg e administrado i.c.v. Esta dose foi calculada para equivaler a 5 vezes a dose de oPRL utilizada como dose ansiolítica. O antagonista para OT (Atosiban, Tocris Bioscience, Bristol, UK) (Benoussaidh et al., 2005; Moghimian et al., 2013; Gómora-Arrati et al., 2019) foi administrado dissolvidos em salina 0,9% na dose de 0,5 µg/2µl e administrado i.c.v. (Gómora-Arrati et al., 2019). O DZP (Compaz, Cristália, Brasil) foi dissolvido em salina 0,9% e administrado i.p. na dose de 1mg/kg (Fernández-Guasti & Picazo, 1997).

2.4 Cirurgias

2.4.1 Canulação do ventrículo cerebral direito

Foi feita a tricotomia e assepsia da região da calota craniana. Uma incisão longitudinal na porção superior do crânio foi feita e foi aplicado anestésico local (cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina 1:200.000) para analgesia suplementar e hemostasia. Em seguida, os animais foram adaptados ao estereotáxico para animais de pequeno porte com a barra dos incisivos ajustada em -3,3 mm. Foi feita uma craniotomia com auxílio de broca odontológica para implantação de uma cânula guia (22 G, 16 mm de comprimento). A cânula foi posicionada seguindo as coordenadas estabelecidas a partir do atlas de Paxinos e Watson 2007 (AP = 1,0 mm posterior ao bregma, ML = 1,6 mm à direita da sutura longitudinal e DV = 3,2-3,6 mm abaixo da calota craniana). A cânula foi fixada à calota craniana com o auxílio de 2 parafusos de aço inoxidável e acrílico odontológico autopolimerizável. Posicionamento correto confirmado com deslocamento de um manômetro de água. Ao fim da cirurgia, a cânula foi ocluída em toda a sua extensão com um mandril de aço inox (diâmetro 0,40 mm).

2.4.2 Orquiectomia

Após assepsia, foi feita uma incisão da pele e túnica vaginalis até a exposição dos testículos. Foi realizada a ligadura dos funículos espermáticos bem como dos vasos sanguíneos, possibilitando assim a secção desse local para retirada do testículo. Esse mesmo procedimento foi repetido para a remoção do testículo contralateral. Feito isto, o escroto foi devidamente suturado.

2.5 Testes comportamentais

2.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Os animais foram colocados no centro de um LCE, e permaneceram no teste por um período de 5 minutos. Dimensões do LCE: comprimento dos braços = 500 cm; largura dos braços = 10 cm; altura da parede do braço fechado = 40 cm; altura do piso = 60 cm. Foi quantificado o número de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e no centro, além do número de entradas e tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos (Pellow et al., 1985; Rodgers & Dalvi, 1997).

2.5.2 Neofagia

Para a realização do teste de neofagia, os animais foram privados do acesso à ração por um período de 24 h. Ao final deste período, eles foram alocados por 30 minutos em uma caixa grande (39 x 32 x 17 cm) que continha, no centro mais iluminado, um pellet de ração. Foi quantificada a latência dos animais para começarem a se alimentar, bem como o peso da ração consumida (Rex et al., 1998).

2.6 Perfusão e processamento dos cérebros

Os animais foram perfundidos através da aorta ascendente, com 50 mL de PBS 0,01 M heparinizado (5 UI/mL), seguido de 400 mL de PFA 4% em PB 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2 h e crioprotégidos em solução de sacarose 30% em PB 0,1M a 4 °C. Em seguida, foram congelados em isopentano 99% (C5H12), a -50 °C. Depois de congelados, os cérebros foram armazenados à -80 °C até o momento da obtenção dos cortes em criostato. Quatro séries de secções coronais de 30 µm da extensão rostrocaudal do hipotálamo e tronco cerebral foram obtidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 2007). As secções foram armazenadas em solução crioprotetora a -20 °C (Watson et al., 1986) para a posterior realização de análises imunohistoquímicas de marcação simples para pSTAT5 no hipocampo, área pré-óptica medial (MPA), ARC, amígdala, locus coeruleus, A1 e A2, de marcação simples para Fos e de dupla marcação para pSTAT5 e OT no PVN, conforme protocolos previamente descritos (Aquino et al., 2016; Aquino et al., 2017).

2.7 Imunohistoquímica – Marcação peroxidase

Assim como no estudo 1, foi utilizado o método de free-floating para a realização da imunohistoquímica de marcação peroxidase. Para a marcação simples de pSTAT5 ou Fos, as secções foram primeiramente incubadas com o anticorpo primário anti-pSTAT5 feito em coelho (Cell Signaling Technology; 1:2.000) ou anticorpo primário anti-Fos produzido em coelho (K-25, sc-253; Santa Cruz Biotechnology, 1:7.500). O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na concentração de 1:2.000.

Para a dupla marcação de pSTAT5/OT, após a incubação com o anticorpo para pSTAT5 e seu anticorpo secundário, foi feita a incubação com o anticorpo primário

anti-OT produzido em camundongo (Chemicon International, Temecula, CA, EUA, diluição 1:100.000). O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) foi utilizado na concentração de 1:2.000.

2.8 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm EPM. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak, conforme a ocorrência de um ou dois fatores de variação nos dados a serem analisados. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1: Efeito da administração aguda de PRL sobre a ansiedade em ratos

Com o objetivo de padronizar uma curva dose-resposta do efeito ansiolítico da PRL, foi feita a administração i.c.v. de diferentes doses de oPRL e, em seguida, foi avaliado o comportamento do tipo ansioso nos testes do LCE (Fig. 9) e da neofagia (Fig. 10). A figura 9A apresenta a porcentagem de entradas dos animais nos braços abertos do labirinto. Dentre as quatro doses testadas, apenas os animais que receberam as doses de PRL-0.5 e de PRL-1 apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados ao grupo Veh ($P < 0,05$ para PRL-1 e $P < 0,001$ para PRL-0.5). Este efeito foi semelhante ao do DZP ($P < 0,001$), droga que foi utilizada como controle devido ao seu comprovado efeito ansiolítico (Fernández-Guasti & Picazo, 1997; Liebsch et al., 1998). As maiores doses de oPRL apresentaram uma tendência em aumentar o tempo de permanência nos braços abertos ($P < 0.1$). No entanto, somente o grupo DZP apresentou aumento significativo neste parâmetro em relação ao grupo Veh ($P < 0,05$) (Fig. 9B). Como pode-se observar na figura 9C, o grupo PRL-0.05 foi o único com um menor número total de entradas nos braços abertos e fechados ($P < 0,001$), o que pode indicar um comprometimento na atividade locomotora desses animais (Rodgers & Dalvi, 1997). Não houve diferença no tempo gasto no centro do labirinto entre os grupos (Fig. 9D). Observou-se maior número de acessos às extremidades abertas do labirinto, bem como maior tempo de permanência nas mesmas, em todos os grupos tratados com PRL ($P < 0,05$), com exceção do grupo PRL-0.05, sendo nestes parâmetros os efeitos menores que os do DZP ($P < 0,001$) (Fig. 9E-F). O número aumentado de acesso aos braços abertos, bem como o acesso às

extremidades dos mesmos, são indicativos de ansiedade diminuída, uma vez que esses são os locais do LCE mais aversivos aos roedores (Bourin, 2015).

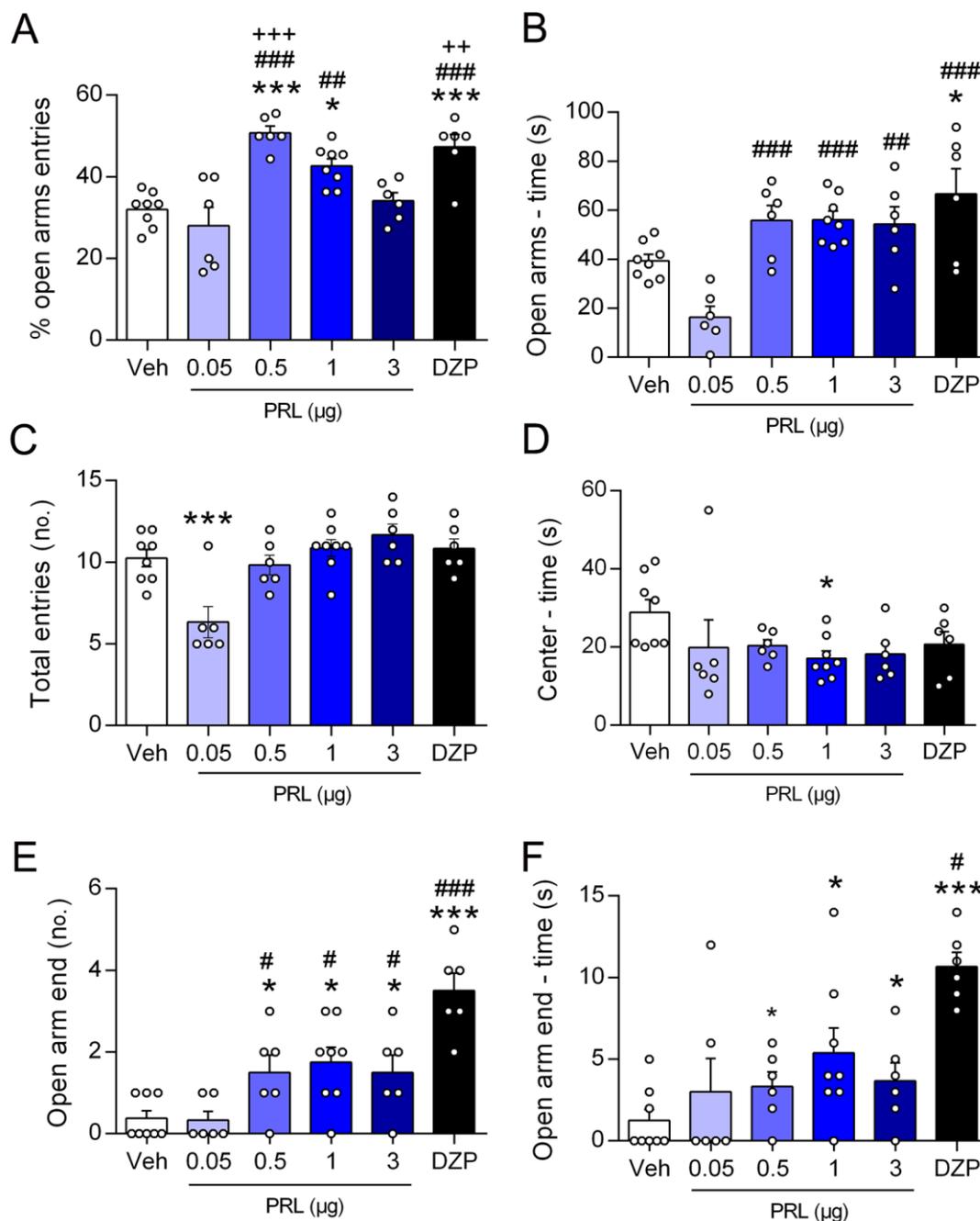


Figura 9: Efeito de diferentes doses de PRL sobre o comportamento do tipo ansioso medido pelo labirinto em cruz elevado (LCE). Ratos receberam a implantação de uma cânula intracerebroventricular (i.c.v.) e, dez dias depois, receberam a infusão de veículo (Veh; n = 8) ou PRL ovina nas doses de 0,05 (PRL-0,05; n = 6), 0,5 (PRL-0,5; n = 6), 1 (PRL-1; n = 8) ou 3 μg (PRL-3; n = 6). Ratos que receberam diazepam i.p. (DZP; n = 6) foram utilizados como controle positivo. Dez minutos após as injeções i.c.v., os animais foram colocados no LCE por

um período de 5 minutos. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ comparado ao grupo PRL-0.05. ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$ comparado ao grupo PRL-3. (B) Tempo total de permanência nos braços abertos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Veh. ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ comparado ao grupo PRL-0.05. (C) Número total de entradas nos braços abertos e fechados. *** $P < 0,001$ comparado aos demais grupos. (D) Tempo de permanência no centro do labirinto. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Veh. (E) Número de idas às extremidades dos braços abertos. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ comparado ao grupo PRL-0.05. (F) Tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. # $P < 0,05$ comparado a todos os grupos tratados com PRL. Dados expressos em média \pm EPM.

A figura 10 apresenta os resultados obtidos no teste de neofagia, realizado ao final de 24 h de jejum dos animais. A figura 10A mostra que os animais tratados com PRL, com exceção do grupo PRL-3, apresentaram menor latência para começar a se alimentar, de modo semelhante aos animais tratados com DZP ($P < 0,05$ para PRL-0.5, $P < 0,01$ para PRL-1 e $P < 0,001$ para PRL-0.05 e DZP). Ou seja, esses animais demoraram menos tempo para acessar o pellet de ração que se localizava no centro iluminado, um local aversivo para os roedores, o que indica menor nível de ansiedade nesses animais (Rex et al., 1998). De modo interessante, os animais tratados com a dose de 1 μ g de PRL apresentaram maior consumo de ração quando comparado aos grupos Veh e 0.05-PRL ($P < 0,05$) (Fig. 10B).

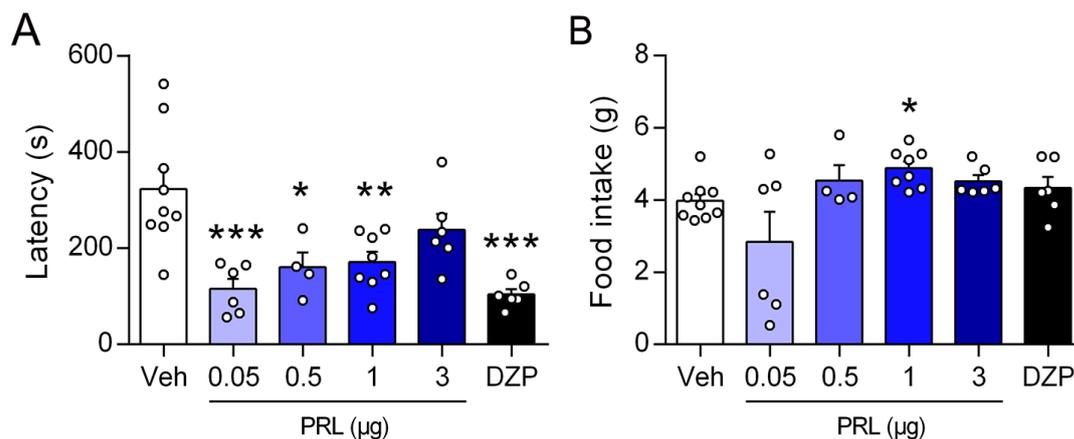


Figura 10: Efeito de diferentes doses de PRL sobre o comportamento do tipo ansioso medido pelo teste de neofagia. Ratos receberam a implantação de uma cânula i.c.v. e, onze dias depois, foram submetidos à privação alimentar por 24 h. Ao final desse período, receberam injeção i.c.v. de veículo (Veh; n = 9) ou PRL nas doses de 0,05 (PRL-0,05; n = 6), 0,5 (PRL-0,5; n = 4), 1 (PRL-1; n = 8) ou 3 µg (PRL-3; n = 6). Ratos que receberam diazepam i.p. (DZP; n = 6) foram utilizados como controle positivo. Dez minutos após a infusão, os animais foram colocados em uma caixa com um pellet de ração localizado no centro mais iluminado, onde permaneceram por um período de 30 minutos. (A) Latência para o início da alimentação. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. (B) Peso de ração consumida. * $P < 0,05$ comparado aos grupos Veh e PRL-0,05. Dados expressos em média \pm EPM.

Após esses dois testes comportamentais, concluímos que as doses de PRL i.c.v. mais eficientes na diminuição do comportamento do tipo ansioso foram a de 0,5 e a de 1 µg. No entanto, a dose de 1 µg também causou um aumento na ingestão alimentar nos animais, característica que não foi observada no grupo DZP. Assim, nos experimentos seguintes, a dose de PRL-0.5 foi selecionada como uma dose de efeito ansiolítico e a de PRL-3, como uma de não efeito ansiolítico.

3.2 Experimento 2: Papel da testosterona sobre a ação ansiolítica da PRL

Após a validação do efeito ansiolítico da PRL, buscou-se responder se os esteroides sexuais seriam essenciais para esse efeito, uma vez que, em fêmeas, efeitos

hipotalâmicos da PRL parecem requerer exposição prévia ao E2 (Anderson et al., 2008). A figura 11 mostra que ambos os grupos ORX e ORX+T que receberam PRL apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos em relação aos respectivos grupos que receberam Veh ($P < 0,05$). Observou-se, também, uma tendência de aumento do tempo gasto nos braços abertos no grupo ORX+T que recebeu PRL, em relação ao que recebeu a injeção de veículo. No entanto, essa diferença não foi significativa ($P < 0,1$). Não houve comprometimento na atividade locomotora dos animais, como demonstrado pelo número total de entradas nos braços abertos e fechados (Fig. 11C). Finalmente, o tratamento com PRL e a orquiectomia não interferiram no tempo gasto pelos animais no centro do LCE. Desta forma, concluiu-se que a presença da testosterona não é essencial para o efeito ansiolítico da PRL em ratos.

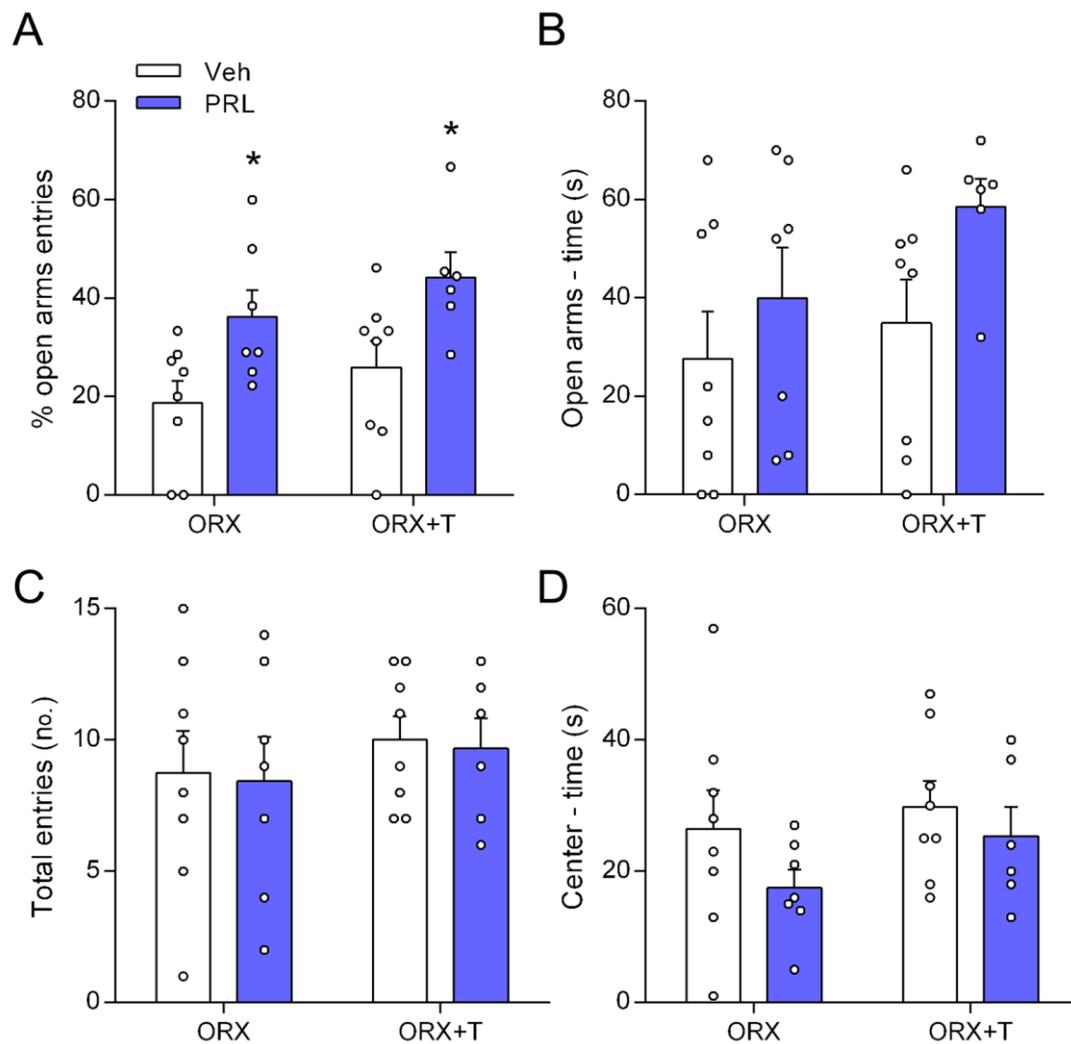


Figura 11: Testosterona não interfere na ação ansiolítica da PRL medida no LCE. Ratos foram orquiectomizados (ORX) e receberam a implantação de uma cânula i.c.v.. Três dias após a cirurgia, iniciou-se o tratamento diário com testosterona (ORX+T) ou óleo (ORX), por 7 dias. No dia do experimento, os animais receberam a injeção de veículo (ORX+Veh; n = 8 e ORX+T+Veh; n = 8) ou PRL ovina (ORX+PRL; n = 7 e ORX+T+PRL; n = 6). Dez minutos após a infusão, os animais foram colocados no LCE por um período de 5 minutos. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. * $P < 0,05$ comparado aos respectivos grupos Veh. (B) Tempo total de permanência nos braços abertos. (C) Número total de entradas nos braços abertos e fechados. (D) Tempo de permanência no centro do labirinto. Dados expressos em média \pm EPM.

A figura 12 apresenta o peso da próstata e vesícula seminal de ratos intactos (Experimento 1), ORX e ORX+T (Experimento 2). Os animais ORX apresentaram

menor peso da próstata e da vesícula seminal quando comparado aos animais intactos ($P < 0,001$). A reposição hormonal, por outro lado, foi capaz de reestabelecer os pesos desses órgãos, que chegaram a atingir valores levemente maiores que os observados nos animais intactos ($P < 0,01$ para próstata e $P < 0,001$ para vesícula seminal). Assim, estes dados confirmam a eficiência da orquiectomia e da reposição com testosterona em nosso modelo experimental.

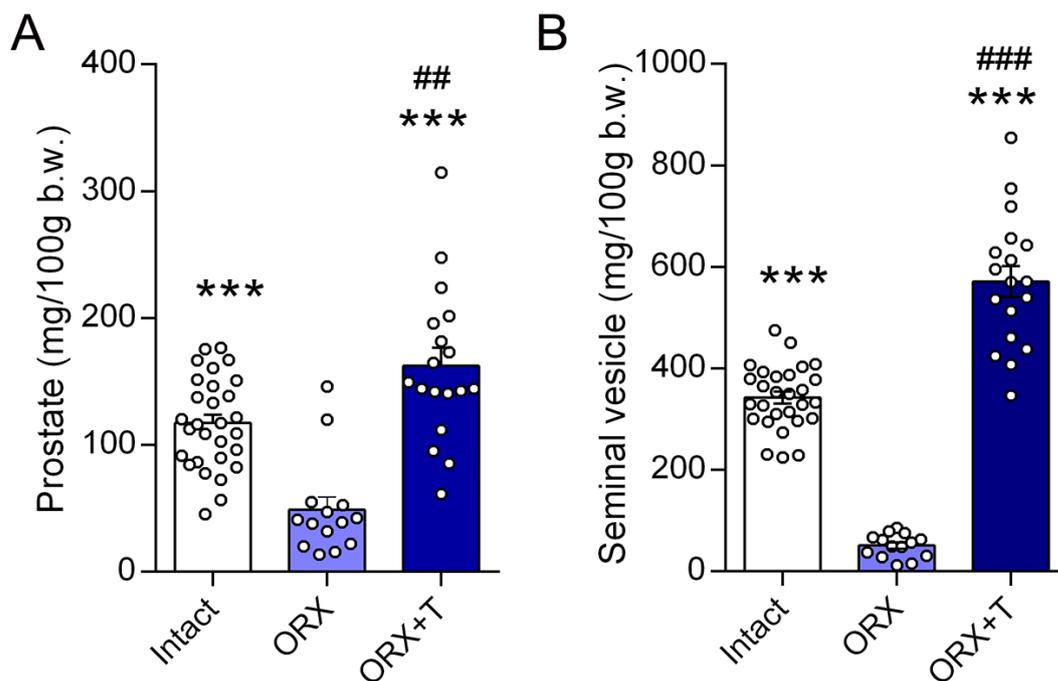


Figura 12: Efeito do tratamento com testosterona no peso da próstata e da vesícula seminal. Ratos foram ORX e receberam a implantação de uma cânula i.c.v.. Três dias após a cirurgia, iniciou-se o tratamento diário com testosterona (ORX+T; $n = 16$) ou óleo (ORX; $n = 14$), por 7 dias. No dia do experimento, foi feita a retirada e pesagem das próstatas e vesículas seminais, e os pesos foram comparados a animais intactos (Intact; $n = 28$). (A) Peso das próstatas. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo ORX. ## $P < 0,01$ comparado ao grupo Intact. (B) Peso das vesículas seminais. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo ORX. ### $P < 0,001$ comparado ao grupo Intact. Dados expressos em média \pm EPM.

3.3 Experimento 3: Avaliação de possíveis regiões cerebrais responsáveis pelo efeito ansiolítico da PRL

No experimento 3, buscamos mapear as regiões cerebrais envolvidas no efeito ansiolítico da PRL. Sabe-se que a administração i.c.v. de PRL induz a expressão de pSTAT5 na MPA e no ARC (Sapsford et al., 2012). Secções do hipocampo, amígdala, locus coeruleus, A1 e A2 foram avaliadas e, todavia, não apresentaram expressão de pSTAT5 em resposta as doses de PRL-0.5 ou PRL-3 i.c.v., indicando pouca ou nenhuma responsividade à PRL nestas áreas cerebrais. Por outro lado, a figura 13 mostra que houve um aumento na expressão de pSTAT5 tanto na MPA como no ARC de animais tratados com oPRL, sem diferença de resposta entre as doses ($P < 0,01$ para as duas doses de PRL no ARC e para a dose de 0.5 μg na MPA; $P < 0,001$ para a dose de 3 μg na MPA). Desta forma, essas não parecem ser regiões envolvidas na diminuição do comportamento do tipo ansioso, uma vez que os animais tratados com PRL-3 não apresentaram diminuição desse comportamento.

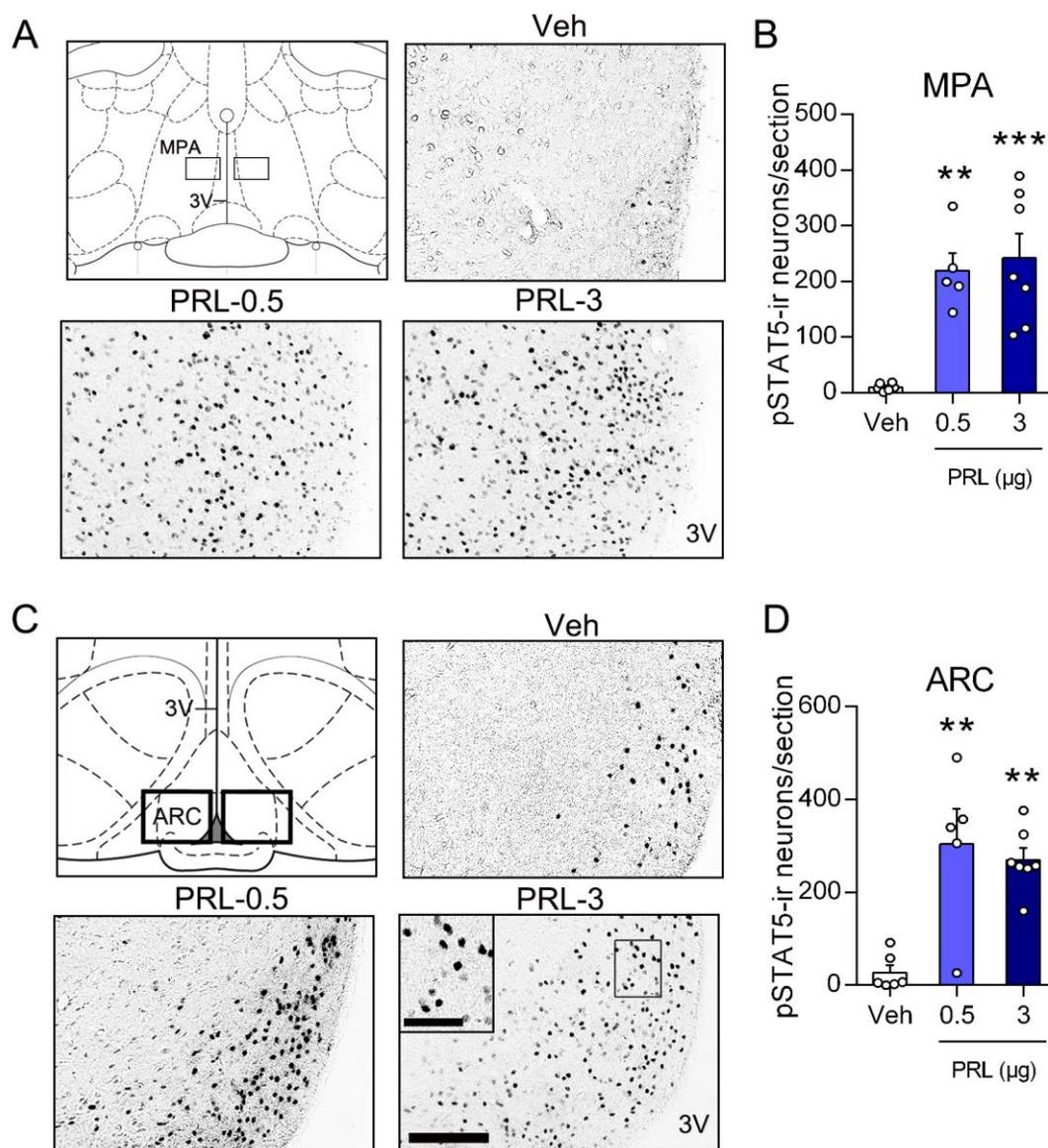


Figura 13: Efeito de diferentes doses de PRL sobre a fosforilação de STAT5 (pSTAT5) na área pré-óptica medial (MPA) e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo. Ratos receberam a implantação de uma cânula i.c.v. e, dez dias depois, receberam a injeção de veículo (Veh; $n = 6$) ou PRL nas doses de, 0.5 (PRL-0,5; $n = 5$) ou 3 μg (PRL-3; $n = 7$). 30 minutos após a infusão, os animais foram perfundidos e seus cérebros foram processados para a análise da marcação de pSTAT5 na MPA e no ARC. (A) Imagens representativas da expressão de pSTAT5 na MPA. (B) Número de neurônios pSTAT5 imunorreativos (ir) na MPA. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. (C) Imagens representativas da expressão de pSTAT5 no ARC. (D) Número de neurônios pSTAT5-ir no ARC. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Veh. Dados expressos em média \pm EPM. 3V, terceiro ventrículo. Inset indica ampliação da área destacada pelo retângulo da foto. Escalas, 100 μm e 20 μm (inset).

Como apresentado na figura 14, também foi feita a análise do PVN, uma região sabidamente envolvida na resposta a estímulos estressores (Palkovits, 2000). Como se pode observar na figura 14B, também houve um aumento na expressão de pSTAT5 nos animais tratados com PRL. Interessantemente, a expressão de pSTAT5 no PVN foi quantitativamente maior no grupo PRL-0.5 do que no PRL-3 ($P < 0,01$), embora ambas tenham sido significativamente aumentadas em relação aos ratos Veh ($P < 0,001$ para PRL-0.5 e $P < 0,05$ para PRL-3). Considerando que a OT é um importante peptídeo na diminuição do comportamento do tipo ansioso (Uvnäs-Moberg et al., 1994; Windle et al., 1997), avaliamos também a coexpressão de pSTAT5 em neurônios OT do PVN. Como se pode observar na figura 14D, não há diferença no número total de neurônios que expressam OT entre os grupos. No entanto, a porcentagem de neurônios OT expressando pSTAT5 foi maior nos grupos tratados com PRL ($P < 0,001$ para PRL-0.5 e $P < 0,05$ para PRL-3) e, seguindo o padrão observado na marcação simples para pSTAT5, a resposta dos ratos PRL-0,5 foi significativamente maior do que a do grupo PRL-3 ($P < 0,05$; Fig. 14C). Assim, a responsividade à PRL em neurônios OT e não OT do PVN apresenta o mesmo perfil dose-resposta observado no seu efeito ansiolítico, indicando este núcleo como possível alvo de ação da PRL para deflagrar este efeito.

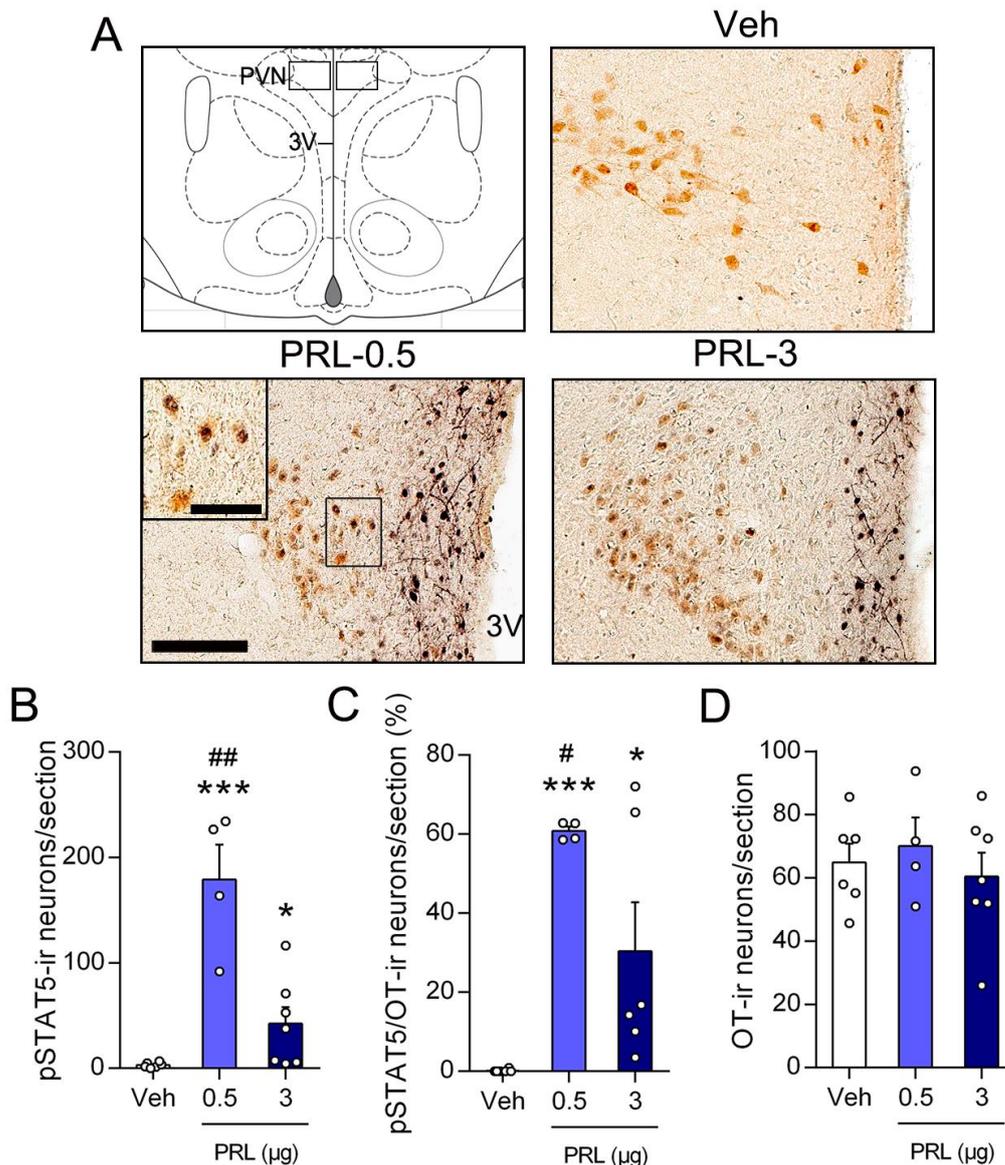


Figura 14: Efeito de diferentes doses de PRL sobre a expressão de pSTAT5 e OT no PVN. Ratos receberam a implantação de uma cânula i.c.v. e, dez dias depois, receberam a infusão de veículo (Veh; $n = 6$) ou PRL nas doses de, 0,5 (PRL-0,5; $n = 4$) ou 3 μg (PRL-3; $n = 7$). 30 minutos após a infusão, os animais foram perfundidos e seus cérebros foram processados para a dupla marcação de pSTAT5 e OT no PVN. (A) Imagens representativas da expressão de pSTAT5 e OT no PVN. (B) Número de neurônios pSTAT5-ir no PVN. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. ## $P < 0,01$ comparado ao grupo PRL-3. (C) Porcentagem de neurônios OT que expressam pSTAT5 no PVN. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Veh. # $P < 0,05$ comparado ao grupo PRL-3. (D) Número de neurônios OT-ir no PVN. Dados expressos em média \pm EPM. 3V, terceiro ventrículo. Inset indica ampliação da área destacada pelo retângulo da foto. Escalas, 100 μm e 20 μm (inset).

A figura 15 exibe um mapeamento da expressão de pSTAT5 em resposta à infusão i.c.v. de PRL nas doses ansiolítica (PRL-0.5) e não ansiolítica (PRL-3). Em síntese observamos que a PRL não foi capaz de gerar alterações na expressão de pSTAT5 no HPC, BLA, LC A1 ou A2. Por outro lado, ambas as doses utilizadas tiveram efeito na MPA, PVN e ARC. A dose de PRL-0,5, no entanto, exerceu efeito ainda mais significativo no PVN, o que indica que esse núcleo possa estar associado ao efeito ansiolítico dessa dose de PRL.

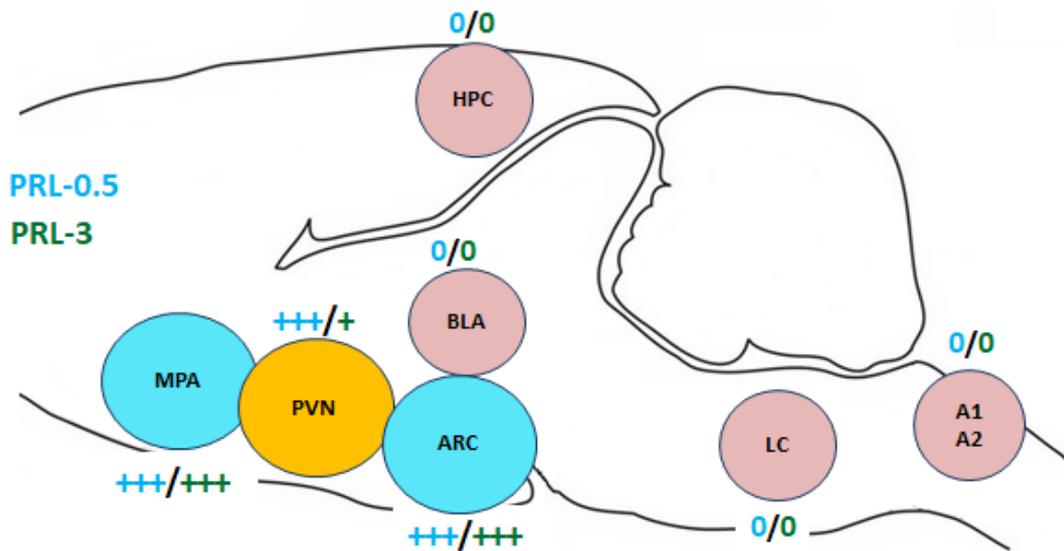


Figura 15: Mapeamento da expressão neural de pSTAT5 em resposta à PRL em doses que causam ou não efeito ansiolítico. A expressão de pSTAT5 foi investigada na MPA, PVN, ARC, amígdala basolateral (BLA), hipocampo (HPC), locus coeruleus (LC), A1 e A2. Áreas com expressão estão representadas em azul ou amarelo e, sem resposta, em rosa. Os símbolos em azul indicam avaliação semi-quantitativa de expressão de pSTAT5 em resposta ao tratamento com PRL-0,5, enquanto os símbolos em verde indicam a mesma avaliação em resposta ao tratamento com PRL-3.

3.4 Experimento 4: Efeito do bloqueio de PRL-R e OT-R sobre o efeito ansiolítico da PRL

O experimento anterior apontou um possível envolvimento dos neurônios OT na ação ansiolítica da PRL. Assim, o presente experimento teve como objetivo avaliar o efeito do bloqueio de PRL-R e OT-R, através da utilização dos seus antagonistas, sobre a ação ansiolítica da PRL. Como apresentado nas figuras 16A e B, os animais Veh+PRL apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos ($P < 0,01$), bem como maior tempo gasto nesses braços ($P < 0,05$), quando comparado ao controle que recebeu somente injeção de Veh. Esse efeito foi bloqueado tanto com a administração do S179D como de ATO anterior à administração da PRL. Não foram observadas diferenças entre os grupos no total de entradas nos braços abertos e fechados, indicando que não houve comprometimento da atividade locomotora dos animais em resposta a administração de nenhuma das drogas (Fig. 16C). O tempo no centro do LCE também não sofreu alterações entre os grupos (Fig. 16D). De modo importante e consistente com o efeito ansiolítico da PRL, o grupo Veh+PRL apresentou maior número de acessos e tempo gasto nas extremidades dos braços abertos do LCE em relação ao Veh ($P < 0,01$), efeito que também foi bloqueado pelo S179D e ATO (Fig 16E e F). Sendo assim, estes resultados mostram que o bloqueio tanto dos receptores para PRL quanto para OT elimina o efeito ansiolítico da PRL, comprovando o envolvimento dos dois receptores na ação da PRL sobre o comportamento do tipo ansioso.

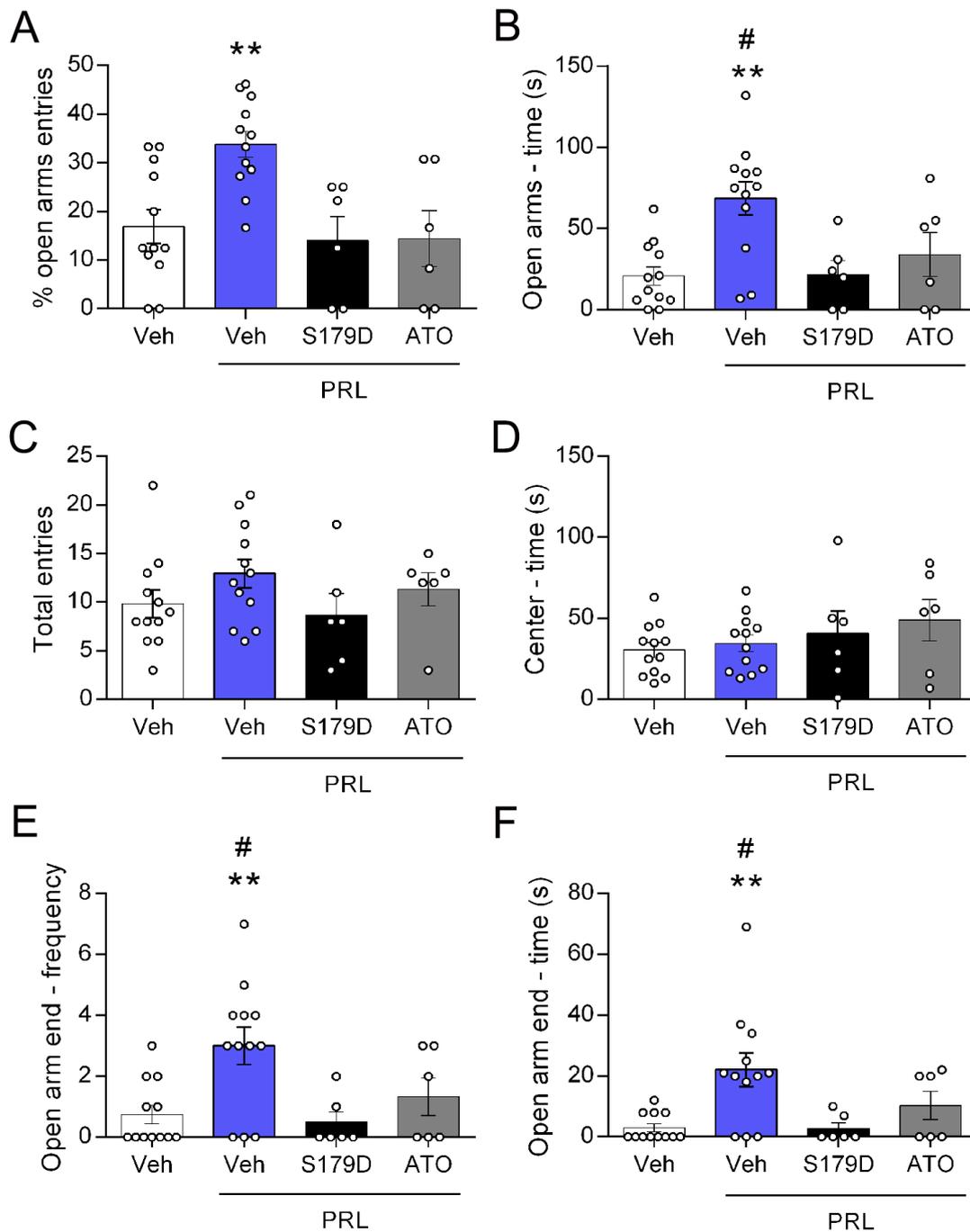


Figura 16: Efeito dos antagonistas de PRL (S179D) e de OT (ATO) na ação ansiolítica da PRL. Ratos receberam a implantação de uma cânula intracerebroventricular (i.c.v.) e, dez dias depois, receberam a infusão de veículo, S179D ou ATO. 10 minutos depois, parte dos animais que recebeu Veh, recebeu uma segunda administração de Veh (Veh; n = 12). Os demais animais receberam 0,5 µg de PRL (Veh+PRL, n = 12; S179D+PRL, n = 6; ATO+PRL, n = 6). Dez minutos após a última injeção i.c.v., os animais foram colocados no LCE por um período de 5 minutos. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. ** $P < 0,01$ comparado aos demais grupos. (B) Tempo total de permanência nos braços abertos. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Veh. # $P < 0,05$ comparado ao grupo S179D+PRL. (C) Número total de entradas nos braços

abertos e fechados. (D) Tempo de permanência no centro do labirinto. (E) Número de idas às extremidades dos braços abertos. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Veh. # $P < 0,05$ comparado ao grupo S179D+PRL. (F) Tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Veh. # $P < 0,05$ comparado ao grupo S179D+PRL. Dados expressos em média \pm EPM.

3.5 Experimento 5: Efeito do bloqueio de PRL-R sobre a expressão de Fos hipotalâmica em resposta ao estresse por contenção

Os experimentos anteriores mostraram o envolvimento do PVN, com possível mediação dos neurônios OT, no efeito ansiolítico da PRL. Para confirmar o envolvimento desse núcleo nesse efeito, analisamos a expressão de Fos, marcador neuronal responsivo ao estresse (Weinberg et al., 2007), em animais que tiveram bloqueio do PRL-R anterior à administração de PRL em resposta ao estresse por contenção. Analisamos o ARC com objetivo de ter um núcleo controle, sem envolvimento na ação ansiolítica da PRL. E de modo consistente, a expressão de Fos no ARC foi maior em todos os grupos que passaram pelo estresse, em relação ao grupo que não recebeu o estímulo estressor ($P < 0,05$) (Fig. 17A-B), e o tratamento com PRL não foi capaz de diminuir essa imunorreatividade.

Ao analisarmos o PVN (Fig. 18), também observamos, como esperado, um aumento expressivo na imunorreatividade para Fos nos animais Veh estressados, em relação ao seu controle não estressado ($P < 0,001$). A administração da PRL a estes animais estressados foi capaz de diminuir de forma expressiva o número de neurônios Fos-positivos ($P < 0,001$), efeito este que foi parcialmente bloqueado em animais que receberam injeção prévia do S179D. Portanto, o S179D aplicado preveniu o efeito da PRL sobre a diminuição da imunorreatividade para Fos no PVN.

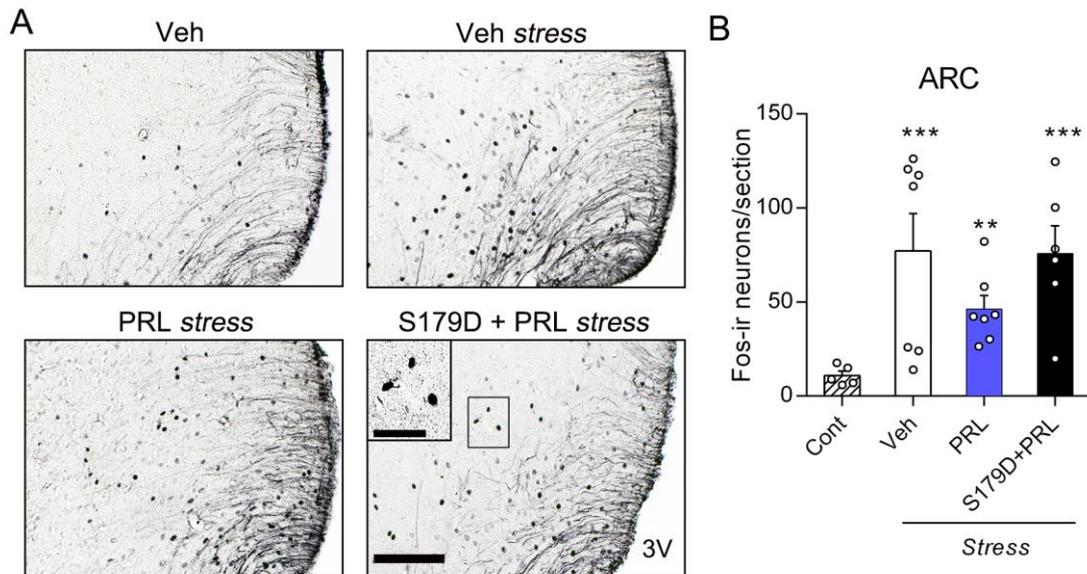


Figura 17: Efeito do S179D na imunorreatividade de Fos no ARC de ratos submetidos ao estresse por contenção. Ratos receberam a implantação de uma cânula intracerebroventricular (i.c.v.). Dez dias depois, foram feitas duas injeções i.c.v. separadas por um intervalo de 10 minutos. Os animais receberam Veh e Veh (*Veh stress*; $n = 7$), Veh e PRL (*PRL stress*; $n = 7$) ou antagonista de PRL e PRL (*S179D + PRL stress*; $n = 6$). 30 minutos após a última injeção, os animais foram submetidos ao estresse por contenção por 40 minutos. 30 minutos após o final do estresse, eles foram perfundidos e seus cérebros foram processados para a análise da marcação de Fos no ARC. Os resultados desse experimento foram comparados aos níveis basais de Fos nessa região em ratos que não passaram pelo protocolo de estresse por contenção (Cont; $n = 5$). (A) Imagens representativas da expressão de Fos no ARC. (B) Número de neurônios Fos-ir no ARC. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Cont. Dados expressos em média \pm EPM. 3V, terceiro ventrículo. Inset indica ampliação da área destacada pelo retângulo da foto. Escalas, 100 μm e 20 μm (inset).

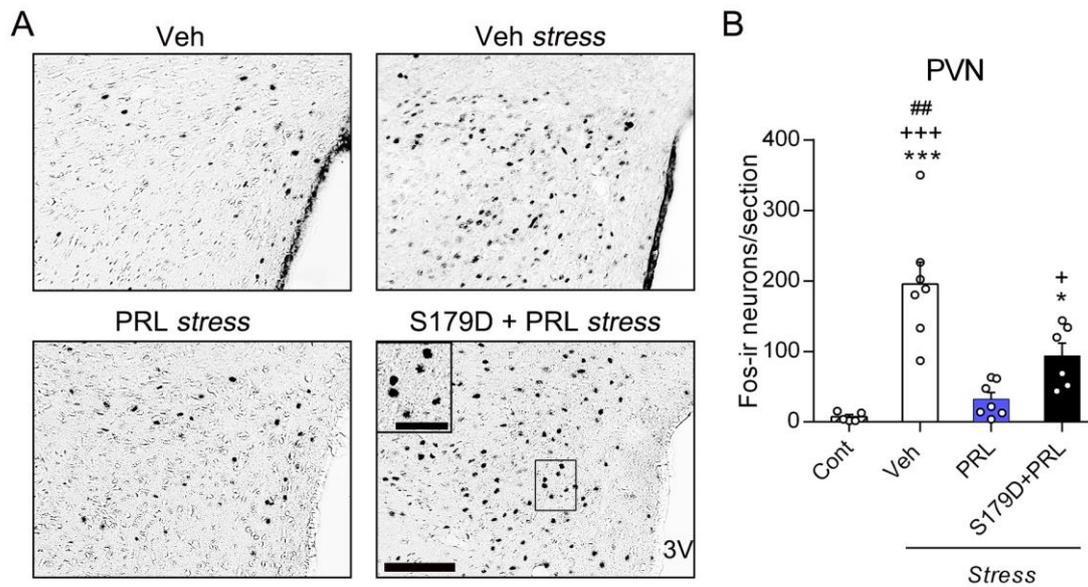


Figura 18: Efeito do S179D na imureatividade de Fos no PVN de ratos submetidos ao estresse por contenção. Ratos receberam a implantação de uma cânula intracerebroventricular (i.c.v.). Dez dias depois, foram feitas duas injeções i.c.v. separadas por um intervalo de 10 minutos. Os animais receberam Veh e Veh (*Veh stress*; $n = 8$), Veh e PRL (*PRL stress*; $n = 8$) ou antagonista de PRL e PRL (*S179D + PRL stress*; $n = 6$). 30 minutos após a última injeção, os animais foram submetidos ao estresse por contenção por 40 minutos. 30 minutos após o final do estresse, eles foram perfundidos e seus cérebros foram processados para a análise da marcação de Fos no PVN. Os resultados desse experimento foram comparados aos níveis basais de Fos nessas regiões em ratos que não passaram pelo protocolo de estresse por contenção (Veh; $n = 5$). (A) Imagens representativas da expressão de Fos no PVN. (B) Número de neurônios Fos-ir no PVN. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Cont. + $P < 0,05$; +++ $P < 0,001$ comparado ao grupo *PRL stress*. ## $P < 0,01$ comparado ao grupo *S179D+PRL stress*. Dados expressos em média \pm EPM. 3V, terceiro ventrículo. Inset indica ampliação da área destacada pelo retângulo da foto. Escalas, 100 μ m e 20 μ m (inset).

4 DISCUSSÃO

Os resultados de diferentes estudos publicados na literatura sugerem fortemente que a PRL exerça um papel importante na diminuição da ansiedade. Ratos em estados fisiológicos de altos níveis de PRL, como fêmeas lactantes (Silva et al., 2020b) e em PRO (Butcher et al., 1974; Szawka et al., 2005), e machos pós-cópula (Kamel et al., 1975; Kamel et al., 1977), apresentam níveis reduzidos de comportamento do tipo ansioso (Frye et al., 2000; Groër, 2005; Waldherr & Neumann, 2007). Além disso, a administração i.c.v. de oPRL exerce efeitos ansiolíticos tanto em fêmeas como em machos (Torner et al., 2001; Torner et al., 2002; Donner et al., 2007). Desse modo, o presente estudo objetivou investigar os mecanismos neuroendócrinos pelos quais a PRL exerce esse importante efeito sobre a ansiedade em ratos. Primeiramente, padronizamos uma dose de PRL com efeito ansiolítico, de modo a utilizá-la como ferramenta para nosso estudo. Após elegermos a dose de 0,5 µg i.c.v. de PRL como dose de efeito ansiolítico, tratamos animais ORX e tratados com óleo ou testosterona a fim de avaliar se o efeito da PRL na atenuação da ansiedade é dependente da presença de esteroides sexuais. Nossos resultados mostraram que a testosterona não é essencial para esse efeito. Em seguida, avaliamos a responsividade de diferentes regiões cerebrais à administração de doses ansiolíticas e não ansiolíticas de PRL através de imunohistoquímica para pSTAT5. Observamos que a MPA e o ARC apresentam o mesmo padrão de resposta ao tratamento com dose ansiolítica e não ansiolítica de PRL, e que somente o PVN apresentou maior responsividade à dose ansiolítica, juntamente com maior resposta dos neurônios OT. Isto nos levou a hipotetizar que o PVN estaria envolvido nas ações ansiolíticas da PRL, e que essa ação seria mediada pelos neurônios OT. O bloqueio de PRL-R e OT-R com seus respectivos antagonistas mostrou que a ativação de ambos os receptores é essencial para a ação ansiolítica da PRL. Finalmente, tratamos animais submetidos ao estresse por contenção com PRL e a avaliação da

ativação do PVN por Fos reafirmou a ação ansiolítica desse hormônio. O bloqueio do PRL-R preveniu esta ação da PRL no PVN. Assim, nossos dados indicam que a PRL atua em neurônios do PVN, incluindo neurônios ocitocinérgicos, para exercer sua ação ansiolítica.

No primeiro experimento desse trabalho, nós fizemos a administração i.c.v. de diversas doses de PRL com o objetivo de padronizar uma dose de efeito ansiolítico. A escolha das doses utilizadas foi baseada em estudo anterior conduzido por Torner e colaboradores (Torner et al., 2001) em 2001, que observaram efeito ansiolítico da dose de 1 µg de PRL. Utilizamos, portanto, essa dose como uma dose intermediária, e administramos doses maiores e menores com o objetivo de obter uma curva dose-resposta. O DZP foi administrado i.p. como controle positivo de droga de comprovado efeito ansiolítico (Fernández-Guasti & Picazo, 1997; Liebsch et al., 1998). Animais tratados com as doses de 0,5 e 1 µg de PRL apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE, assim como os animais tratados com DZP. Esse é um importante parâmetro que indica diminuição no comportamento do tipo ansioso (Ohl et al., 2008; Bourin, 2015). De modo interessante, o grupo PRL-0.05 apresentou menor número total de entradas nos braços abertos e fechados do LCE. Esse é um parâmetro que idealmente não deve ser alterado pela administração de drogas, uma vez que sua diminuição pode indicar algum comprometimento na atividade locomotora dos animais, representando um importante viés na análise (Rodgers & Dalvi, 1997). Finalmente, todas as doses de PRL utilizadas, exceto a de 0,05 µg, causaram um aumento na exploração das extremidades dos braços abertos do LCE, que representam o local mais aversivo do aparato para os roedores (Bourin, 2015).

Para prosseguir na padronização da dose ansiolítica da PRL e obter resultados mais confiáveis, consideramos importante submeter os animais a um segundo teste de

ansiedade. Para isso, eles foram submetidos a um período de jejum de 24 h e, ao final desse período, passaram pelo teste da neofagia. Neste teste, os animais se encontram em um conflito entre ingerir alimento após um longo período de jejum, e se habituar a um ambiente novo. O menor tempo de latência para início da ingestão da ração é um indicativo de menor ansiedade (Rex et al., 1998). De modo diferente do teste do LCE, a dose de 0,05 apresentou efeito ansiolítico nesse teste. Essa discrepância entre os resultados do LCE e do teste da neofagia reforçaram a importância da realização de dois testes diferentes nesse momento de padronização das doses de PRL. As doses de 0,5 e de 1 µg de PRL também diminuíram a latência para o início da alimentação no teste da neofagia, de modo que essas duas doses apresentaram efeitos ansiolíticos consistentes nos dois testes comportamentais realizados. A dose de 1 µg, no entanto, causou um efeito de aumento da quantidade de alimento ingerido. Como esse efeito não foi observado em nosso controle positivo, o DZP, a dose de 1 µg foi descartada e elegemos a dose de 0,5 µg de PRL como a dose ansiolítica e que seria utilizada como ferramenta nos experimentos seguintes. Um fato interessante que nos chamou atenção foi a ausência de efeito ansiolítico da dose de 3 µg de PRL. Existem algumas hipóteses que podem explicar essa ausência de efeito. É possível que altas doses de PRL desencadeiem um mecanismo de dessensibilização dos PRL-R no PVN, comprometendo seus efeitos ansiolíticos. Ademais, sabe-se que a PRL pode ser clivada no hipotálamo em vaso-inibinas (Clapp et al., 1994), que exercem efeitos comportamentais contrários aos da PRL, estimulando o comportamento do tipo ansioso e depressivo, possivelmente devido à suas ações vasculares (Zamorano et al., 2014). Portanto, altas doses de PRL podem aumentar a quantidade de hormônio clivada no PVN, o que pode bloquear sua ação ansiolítica e até causar aumento do comportamento

do tipo ansioso. Entretanto, não é possível determinar porque estas situações seriam específicas do PVN em comparação com as outras áreas hipotalâmicas avaliadas.

Nosso próximo passo foi, então, avaliar se a presença da testosterona é essencial para os efeitos ansiolíticos da PRL. Esta análise foi feita uma vez que se sabe que, em fêmeas, os efeitos hipotalâmicos da PRL dependem da exposição prévia ao E2 (Anderson et al., 2008). Para isso, utilizamos ratos ORX e tratados com óleo ou testosterona. A porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE foi maior nos animais que receberam tratamento com PRL, independente da presença da testosterona. No entanto, diferente de diversos trabalhos na literatura, no presente estudo a testosterona não teve efeito ansiolítico por si só. Sabe-se que baixos níveis de testosterona estão associados a maiores níveis de ansiedade e depressão em adolescentes (Granger et al., 2003). Trabalho de Frye e colaboradores mostrou que a gonadectomia aumenta o comportamento do tipo ansioso, efeito que pôde ser revertido pela administração sistêmica de testosterona (Frye & Seliga, 2001). Nesse trabalho, no entanto, foram utilizados implantes de testosterona, que resultou em doses supra-fisiológicas de anrógenos circulantes. Ainda, a administração de testosterona aumentou o comportamento exploratório no LCE em machos intactos no estudo de Britan e colaboradores (Bitran et al., 1993). No entanto, neste último estudo a dose de testosterona administrada foi de 3,5 à 5 mg/kg, portanto, maior que a dose fisiológica (aproximadamente 0,9 mg/kg) que utilizamos no presente trabalho. Além disso, os animais de Britan e colaboradores não foram castrados antes de receber a cápsula com testosterona, portanto os níveis circulantes de testosterona sistêmica foram ainda mais elevados. O trabalho de Fernandez-Guasti e colaboradores (Fernández-Guasti & Martínez-Mota, 2003) também avaliou o efeito do propionato de testosterona sobre a ansiedade. Foram utilizadas diferentes doses desse hormônio (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 e

1.0 mg por rato) em animais ORX e foi observado um efeito ansiolítico da testosterona. No entanto, esse efeito foi observado de forma robusta somente nos animais tratados com as doses de 0.5 e 1.0 mg, e não nos animais que receberam a dose equivalente a utilizada no presente estudo (0.25 mg/rato). A ausência de efeito ansiolítico da testosterona por si só no nosso estudo deve estar, portanto, associada à dose que foi utilizada, uma vez que optamos por utilizar uma dose que gerasse níveis de testosterona mais próximos aos níveis fisiológicos (Kalil et al., 2013).

Após concluirmos que o efeito da PRL sobre a ansiedade não depende da presença de esteroides sexuais, nosso próximo experimento visou investigar quais regiões cerebrais estariam associadas ao efeito ansiolítico da PRL. Para isso, utilizamos como ferramentas duas doses distintas de PRL i.c.v.: uma de efeito ansiolítico (0,5 µg) e outra sem efeito ansiolítico (3 µg). Nossa segunda ferramenta para a avaliação da ação de PRL no cérebro foi a marcação imunohistoquímica para pSTAT5, uma vez que a fosforilação de STAT5 é um confiável marcador da ação celular da PRL (Brown et al., 2010; Kirk et al., 2017). Hipocampo, amígdala, locus coeruleus, A1 e A2 não apresentaram expressão de pSTAT5 em resposta a nenhuma das duas doses de PRL utilizadas, o que indica uma ausência de ação direta da PRL nessas regiões cerebrais. A MPA e o ARC, no entanto, apresentaram aumento da expressão de pSTAT5 em resposta às duas doses de PRL. No entanto, como não houve diferença entre a dose ansiolítica e não ansiolítica de PRL, é pouco provável que esses núcleos estejam envolvidos na ação ansiolítica da PRL. A marcação de pSTAT5 na MPA e no ARC em resposta à administração de PRL já foi descrita anteriormente, e não tem sido associada a nenhum efeito ansiolítico da PRL (Brown et al., 2010; Sapsford et al., 2012; Kirk et al., 2019).

A análise do PVN nos mostrou um aumento do número de neurônios pSTAT5-ir em ambos os tratamentos com PRL. Na literatura, há discrepâncias em relação à expressão de pSTAT5 no PVN. Estudos anteriores mostraram que crescentes doses i.c.v. de PRL geraram aumento gradual de pSTAT5-ir no PVN de ratas (Sapsford et al., 2012). Entretanto, neste estudo foram utilizadas fêmeas, e diferenças no padrão de expressão dos receptores longos e curtos para PRL entre machos e fêmeas não podem ser descartadas. Ainda, é possível que oPRL de diferentes fornecedores apresentem diferenças de atividade biológica, o que pode deslocar a curva dose resposta e dificultar comparações entre estudos diferentes. Por outro lado, a ausência de resposta de pSTAT5 no PVN ao tratamento com PRL foi observada no trabalho de Brown e colaboradores (Brown et al., 2010), onde não se encontrou imunorreatividade nesse núcleo em camundongas que receberam alta dose de oPRL sistêmica. Neste trabalho, apesar da presença dos PRL-R ter sido detectada através do método de hibridização *in situ*, não foi detectada marcação para pSTAT5 por imunohistoquímica. Desda forma, é possível que a dose de PRL utilizada (5 mg/kg, i.p.) tenha sido acima da faixa ideal para indução de pSTAT5 no PVN o que resultou em não marcação. Este padrão de resposta é consistente com nossos achados. Em nosso estudo, apesar de ambas as doses de PRL terem desencadeado um aumento na expressão de pSTAT5 no PVN, a dose de 0,5 µg promoveu um aumento mais expressivo nessa imunorreatividade quando comparado à dose de 3 µg. Essa diferença indica que esse núcleo possa estar envolvido na ação da PRL sobre a ansiedade, uma vez que o experimento 1 mostrou que 0,5 µg de PRL possui efeito ansiolítico, que não foi desencadeado pela dose de 3 µg. Além disso, houve maior porcentagem de dupla marcação para OT e pSTAT5 nas ratas tratadas com a dose ansiolítica de PRL em relação aos demais grupos. Esse resultado sugere o envolvimento dos neurônios OT na mediação do efeito ansiolítico da PRL. Em 2012 foi

mostrado que a administração de PRL fosforila STAT5 em neurônios OT de ratas virgens (Sapsford et al., 2012). Além disso, o papel da OT na diminuição da ansiedade já foi extensamente examinado em roedores. A OT tem papel importante na inibição da ativação do eixo HPA e diminuição da ansiedade (McCarthy et al., 1996; Windle et al., 1997; Neumann et al., 2000b; Neumann et al., 2000a; Bale et al., 2001). Camundongos com deleções no gene para OT apresentam maior comportamento do tipo ansioso do que ratas wild type, característica que é revertida através da administração de OT i.c.v. nesses animais mutantes (Mantella et al., 2003).

Evidências publicadas na literatura sugerem que os efeitos ansiolíticos da PRL ocorram possivelmente via ações nos neurônios produtores de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), localizados no PVN e na amígdala central (Neumann, 2009). No entanto, os neurônios CRH não expressam a forma do PRL-R responsável por seus efeitos ansiolíticos (forma longa do receptor). Por esse motivo, qualquer ação da PRL sobre o eixo HPA deve ser mediada indiretamente (Gustafson et al., 2017). Este estudo realizado por Gustafson e colaboradores em 2017 mostrou que o PVN contém neurônios não-CRH que são responsivos à PRL. Por isso, a PRL deve se ligar a alguma população neuronal dentro ou aferente ao PVN para regular a atividade dos neurônios CRH. Das populações neuronais do PVN, até então, os neurônios OT são os únicos que sabidamente são alvos diretos da ação da PRL via forma longa do receptor (Kokay et al., 2006; Sapsford et al., 2012; Augustine et al., 2016). Sendo assim, esses são neurônios candidatos para a mediação das ações da PRL sobre os neurônios CRH e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Para confirmar a participação dos neurônios OT no efeito ansiolítico da PRL, nós antagonizamos os receptores de PRL e OT previamente ao tratamento com a PRL. A análise comportamental no LCE mostrou que o uso do modulador do PRL-R, o

S179D, inibiu a ação ansiolítica da PRL. Este resultado mostrou que esse modulador agiu como antagonista para PRL-R, uma vez que, quando injetado juntamente com a PRL, ele foi capaz de reverter o efeito desse hormônio. A utilização do ATO para o antagonismo dos OT-R também inibiu a ação ansiolítica da PRL observada no LCE. Esse resultado foi de suma importância para confirmar a participação da OT na mediação dos efeitos ansiolíticos da PRL. A importância da OT no comportamento do tipo ansioso já foi demonstrada anteriormente por Mantella e colaboradores (Mantella et al., 2003), que observaram que a administração i.c.v. do antagonista para OT aumentou o comportamento do tipo ansioso no LCE quando comparado aos animais controle. A ação ansiolítica da OT provavelmente também envolve sua ligação a seus receptores na amígdala, núcleo envolvido na coordenação de respostas de medo e ansiedade (Davis, 1997; Tye et al., 2011; Sah, 2017; Babaev et al., 2018). Isto porque Bale e colaboradores mostraram que a infusão de OT neste núcleo diminuiu o comportamento do tipo ansioso medido no LCE (Bale et al., 2001), enquanto a infusão no VMH não resultou em tal efeito. De modo interessante, nossos resultados mostram que a PRL estimula a atividade dos neurônios OT que, por sua vez, desencadeia seus efeitos ansiolíticos que já foram demonstrados em diversos estudos.

Nosso último passo teve como objetivo obter uma confirmação final de que o PVN está envolvido nos efeitos da PRL sobre a ansiedade. Para isso, nós submetemos animais previamente tratados com Veh, S179D e PRL ou somente PRL ao estresse por contenção e avaliamos a marcação de Fos, um marcador neuronal responsivo ao estresse (Weinberg et al., 2007). Além da avaliação do PVN, nós utilizamos o ARC como controle, por ser um núcleo sem participação na ação ansiolítica da PRL, como evidenciado nos resultados anteriores. Sabe-se que o estresse por contenção provoca um importante aumento na expressão de Fos nesses dois núcleos hipotalâmicos (Imaki et

al., 1992; Imaki et al., 1996; Briski & Gillen, 2001; Kwon et al., 2006). Como esperado, o estresse por contenção aumentou a Fos-ir no ARC, efeito que não pôde ser revertido com o tratamento com a PRL. O número de neurônios marcados com Fos também se mostrou aumentado no PVN dos animais submetidos ao estresse. No entanto, diferentemente do ARC, a PRL foi capaz de reduzir a ativação desse núcleo. De modo interessante, a administração do S179D prévio ao tratamento com PRL bloqueou parcialmente esse efeito. O bloqueio parcial do efeito da PRL pode ter sido devido à dose de S179D não ter sido alta o suficiente ou, ainda, pelo fato desta droga ser um modulador seletivo dos PRL-R, podendo agir tanto como agonista quanto como antagonista. Este é um importante resultado que mostra, pela primeira vez, que a PRL atenua a ativação do PVN ocasionada pelo estresse.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que a PRL possui efeito ansiolítico em ratos machos e que esse efeito é independente de esteroides sexuais. Além disso, conforme representado na figura 19, as evidências obtidas através das análises imunohistoquímicas e do uso dos antagonistas para PRL e para OT sugerem, pela primeira vez, que esse efeito ansiolítico seja ser mediado pela ação da PRL no PVN, com envolvimento dos neurônios OT. Esse trabalho nos permitiu atribuir importante função para a PRL em machos, e desvendar parte da via neural envolvida em seu efeito ansiolítico.

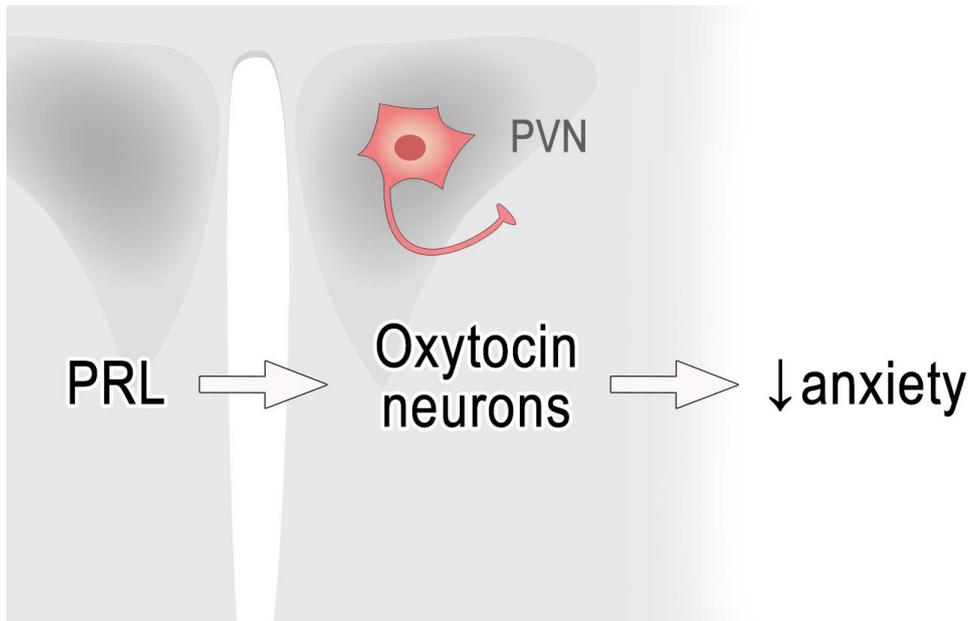


Figura 19: Proposta do mecanismo neuroendócrino da ação ansiolítica da PRL. Os experimentos realizados nesse estudo nos levaram a concluir que a PRL se liga aos seus receptores no PVN, muito provavelmente localizados nos neurônios OT, e diminuindo o comportamento do tipo ansioso em ratos, bem como a ativação desse núcleo a estímulos estressores.

Referências

1. Ajika K, Kalra SP, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM. The effect of stress and Nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1972; 90: 707-715.
2. Anderson GM, Kieser DC, Steyn FJ, Grattan DR. Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology* 2008; 149: 1562-1570.
3. Aquino NS, Araujo-Lopes R, Batista IA, Henriques PC, Poletini MO, Franci CR, Reis AM, Szawka RE. Hypothalamic Effects of Tamoxifen on Oestrogen Regulation of Luteinising Hormone and Prolactin Secretion in Female Rats. *J Neuroendocrinol* 2016; 28.
4. Aquino NSS, Araujo-Lopes R, Henriques PC, Lopes FEF, Gusmao DO, Coimbra CC, Franci CR, Reis AM, Szawka RE. alpha-Estrogen and Progesterone Receptors Modulate Kisspeptin Effects on Prolactin: Role in Estradiol-Induced Prolactin Surge in Female Rats. *Endocrinology* 2017; 158: 1812-1826.
5. Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, Franci CR, Grattan DR, Szawka RE. Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. *Endocrinology* 2014; 155: 1010-1020.
6. Arbogast LA, Voogt JL. The responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin feedback is diminished between early lactation and midlactation in the rat. *Endocrinology* 1996; 137: 47-54.
7. Arbogast LA, Hyde JF. Estradiol attenuates the forskolin-induced increase in hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. *Neuroendocrinology* 2000; 71: 219-227.
8. Arey BJ, Freeman ME. Activity of oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus mirrors the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 1992; 130: 126-132.
9. Arey BJ, Averill RL, Freeman ME. A sex-specific endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 1989; 124: 119-123.
10. Auger AP, Blaustein JD. Progesterone enhances an estradiol-induced increase in Fos immunoreactivity in localized regions of female rat forebrain. *J Neurosci* 1995; 15: 2272-2279.
11. Augustine RA, Bouwer GT, Seymour AJ, Grattan DR, Brown CH. Reproductive Regulation of Gene Expression in the Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. *J Neuroendocrinol* 2016; 28.
12. Augustine RA, Ladyman SR, Bouwer GT, Alyousif Y, Sapsford TJ, Scott V, Kokay IC, Grattan DR, Brown CH. Prolactin regulation of oxytocin neurone activity in pregnancy and lactation. *J Physiol* 2017; 595: 3591-3605.
13. Babaev O, Piletti Chatain C, Krueger-Burg D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Exp Mol Med* 2018; 50: 1-16.
14. Bakowska JC, Morrell JI. The distribution of mRNA for the short form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 116: 50-58.
15. Bale TL, Dorsa DM. Cloning, novel promoter sequence, and estrogen regulation of a rat oxytocin receptor gene. *Endocrinology* 1997; 138: 1151-1158.

16. Bale TL, Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, McCarthy MM. CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neurosci* 2001; 21: 2546-2552.
17. Bartke A. Differential requirement for prolactin during pregnancy in the mouse. *Biol Reprod* 1973; 9: 379-383.
18. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22: 724-763.
19. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 2008; 29: 1-41.
20. Benoussaidh A, Maurin Y, Rampin O. Possible neural mediation of the central effects of oxytocin on uterine motility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R798-804.
21. Bertram R, Helena CV, Gonzalez-Iglesias AE, Tabak J, Freeman ME. A tale of two rhythms: the emerging roles of oxytocin in rhythmic prolactin release. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 778-784.
22. Bethea CL, Neill JD. Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. *Endocrinology* 1979; 104: 870-876.
23. Bethea CL, Neill JD. Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat. *Endocrinology* 1980; 107: 1-5.
24. Binart N, Melaine N, Pineau C, Kercret H, Touzalin AM, Imbert-Bolloré P, Kelly PA, Jégou B. Male reproductive function is not affected in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2003; 144: 3779-3782.
25. Bitran D, Kellogg CK, Hilvers RJ. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. *Horm Behav* 1993; 27: 568-583.
26. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-268.
27. Bourin M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues Clin Neurosci* 2015; 17: 295-303.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
29. Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH. Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 1995; 136: 2928-2936.
30. Briski K, Gillen E. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Res Bull* 2001; 55: 401-408.
31. Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR. Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 2010; 518: 92-102.
32. Brown RS, Piet R, Herbison AE, Grattan DR. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2012; 153: 2375-2384.
33. Brown RS, Wyatt AK, Herbison RE, Knowles PJ, Ladyman SR, Binart N, Banks WA, Grattan DR. Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J* 2016; 30: 1002-1010.

34. Brown RSE, Aoki M, Ladyman SR, Phillipps HR, Wyatt A, Boehm U, Grattan DR. Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 10779-10784.
35. Buonfiglio DC, Ramos-Lobo AM, Silveira MA, Furigo IC, Hennighausen L, Frazão R, Donato J. Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. *Horm Behav* 2015; 71: 60-68.
36. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1974; 94: 1704-1708.
37. Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S. Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 1974; 60: 205-215.
38. Camilletti MA, Abeledo-Machado A, Ferraris J, Pérez PA, Faraoni EY, Pisera D, Gutierrez S, Díaz-Torga G. Role of GPER in the anterior pituitary gland focusing on lactotroph function. *J Endocrinol* 2019; 240: 99-110.
39. Carr LA, Voogt JL. Catecholamine synthesizing enzymes in the hypothalamus during the estrous cycle. *Brain Res* 1980; 196: 437-445.
40. Cheung LYM, George AS, McGee SR, Daly AZ, Brinkmeier ML, Ellsworth BS, Camper SA. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Novel Markers of Male Pituitary Stem Cells and Hormone-Producing Cell Types. *Endocrinology* 2018; 159: 3910-3924.
41. Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcántara E, López-Gómez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10384-10388.
42. Crocq MA. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues Clin Neurosci* 2015; 17: 319-325.
43. Davis M. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1997; 9: 382-402.
44. De Greef WJ, Neill JD. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 1979; 105: 1093-1099.
45. De Paul AL, Pons P, Aoki A, Torres AI. Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochem* 1997; 99: 277-289.
46. DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME. Characterization of the dopaminergic input to the pituitary gland throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 377-383.
47. Di Paolo T, Falardeau P. Modulation of brain and pituitary dopamine receptors by estrogens and prolactin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1985; 9: 473-480.
48. Donner N, Bredewold R, Maloumby R, Neumann ID. Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1804-1814.
49. Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 292-312.

50. Egli M, Bertram R, Sellix MT, Freeman ME. Rhythmic secretion of prolactin in rats: action of oxytocin coordinated by vasoactive intestinal polypeptide of suprachiasmatic nucleus origin. *Endocrinology* 2004; 145: 3386-3394.
51. Euker JS, Meites J, Riegler GD. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology* 1975; 96: 85-92.
52. Fernández-Guasti A, Picazo O. Anxiolytic actions of diazepam, but not of buspirone, are influenced by gender and the endocrine stage. *Behav Brain Res* 1997; 88: 213-218.
53. Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L. Orchidectomy sensitizes male rats to the action of diazepam on burying behavior latency: role of testosterone. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 473-479.
54. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80: 1523-1631.
55. Frye CA, Seliga AM. Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2001; 1: 371-381.
56. Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67: 587-596.
57. Garris PA, Ben-Jonathan N. Estradiol rapidly stimulates dopamine release from the posterior pituitary in vitro. *Neuroendocrinology* 1991; 53: 601-607.
58. Georgescu T, Ladyman SR, Brown RSE, Grattan DR. Acute effects of prolactin on hypothalamic prolactin receptor expressing neurones in the mouse. *J Neuroendocrinol* 2020; 32: e12908.
59. Gerhold LM, Horvath TL, Freeman ME. Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 2001; 919: 48-56.
60. Goffin V, Binart N, Clément-Lacroix P, Bouchard B, Bole-Feysot C, Ederly M, Lucas BK, Touraine P, Pezet A, Maaskant R, Pichard C, Helloco C, Baran N, Favre H, Bernichtein S, Allamando A, Ormandy C, Kelly PA. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genet Anal* 1999; 15: 189-201.
61. Gómora-Arrati P, Gonzalez-Flores O, Galicia-Aguas YL, Hoffman KL, Komisaruk B. Copulation-induced antinociception in female rats is blocked by atosiban, an oxytocin receptor antagonist. *Horm Behav* 2019; 107: 76-79.
62. Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 147-154.
63. Granger DA, Shirtcliff EA, Zahn-Waxler C, Usher B, Klimes-Dougan B, Hastings P. Salivary testosterone diurnal variation and psychopathology in adolescent males and females: individual differences and developmental effects. *Dev Psychopathol* 2003; 15: 431-449.
64. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 752-763.
65. Grattan DR, Xu J, McLachlan MJ, Kokay IC, Bunn SJ, Hovey RC, Davey HW. Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology* 2001; 142: 3935-3940.

66. Grimley PM, Dong F, Rui H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 131-157.
67. Groër MW. Differences between exclusive breastfeeders, formula-feeders, and controls: a study of stress, mood, and endocrine variables. *Biol Res Nurs* 2005; 7: 106-117.
68. Gustafson P, Kokay I, Sapsford T, Bunn S, Grattan D. Prolactin regulation of the HPA axis is not mediated by a direct action upon CRH neurons: evidence from the rat and mouse. *Brain Struct Funct* 2017; 222: 3191-3204.
69. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* 1974; 36: 391-392.
70. Henriques PC, Aquino NSS, Araujo-Lopes R, Silva FS, Coimbra CC, Franci CR, Szawka RE. Differential expression of estrogen receptors in the hypothalamus underlies the bimodal effects of estradiol on luteinizing hormone release. *ENDO 2021: Journal of the endocrine society* 2021: A536–A537.
71. Holzbauer M, Racke K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 1985; 63: 97-116.
72. Holzbauer M, Racké K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 1985; 63: 97-116.
73. Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H. Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology* 1992; 131: 240-246.
74. Imaki T, Shibasaki T, Chikada N, Harada S, Naruse M, Demura H. Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription. *Endocr J* 1996; 43: 629-638.
75. Johnston CA, Negro-Vilar A. Role of oxytocin on prolactin secretion during proestrus and in different physiological or pharmacological paradigms. *Endocrinology* 1988; 122: 341-350.
76. Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress* 2013; 16: 452-460.
77. Kamel F, Mock EJ, Wright WW, Frankel AI. Alterations in plasma concentrations of testosterone, LH, and prolactin associated with mating in the male rat. *Horm Behav* 1975; 6: 277-288.
78. Kamel F, Wright WW, Mock EJ, Frankel AI. The influence of mating and related stimuli on plasma levels of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin, and testosterone in the male rat. *Endocrinology* 1977; 101: 421-429.
79. Kant GJ, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Sci* 1983; 33: 2657-2663.
80. Kawano H, Daikoku S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1987; 265: 242-253.
81. Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 1997; 19: 103-113.

82. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12: 235-251.
83. Kennett JE, Poletini MO, Fitch CA, Freeman ME. Antagonism of oxytocin prevents suckling- and estradiol-induced, but not progesterone-induced, secretion of prolactin. *Endocrinology* 2009; 150: 2292-2299.
84. Kirk SE, Grattan DR, Bunn SJ. The median eminence detects and responds to circulating prolactin in the male mouse. *J Neuroendocrinol* 2019; 31: e12733.
85. Kirk SE, Xie TY, Steyn FJ, Grattan DR, Bunn SJ. Restraint stress increases prolactin-mediated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in the hypothalamus and adrenal cortex in the male mouse. *J Neuroendocrinol* 2017; 29.
86. Kokay IC, Bull PM, Davis RL, Ludwig M, Grattan DR. Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons is associated with specific prolactin regulation of oxytocin neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R1216-1225.
87. Krieg RJ, Cassidy JR. Counteraction of the haloperidol blockade of ovulation by bromocriptine, and the effect of bromocriptine on LH and prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 1984; 38: 371-375.
88. Kwon MS, Seo YJ, Shim EJ, Choi SS, Lee JY, Suh HW. The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience* 2006; 142: 1281-1292.
89. Lebesgue D, Reyna-Neyra A, Huang X, Etgen AM. GPR30 differentially regulates short latency responses of luteinising hormone and prolactin secretion to oestradiol. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 743-752.
90. Lebrun JJ, Ali S, Sofer L, Ullrich A, Kelly PA. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *J Biol Chem* 1994; 269: 14021-14026.
91. Lee Y, Arbogast LA, Voogt JL. Semicircadian rhythms of c-Fos expression in several hypothalamic areas during pregnancy in the rat: relationship to prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 83-93.
92. Lerant A, Freeman ME. Dopaminergic neurons in periventricular and arcuate nuclei of proestrous and ovariectomized rats: endogenous diurnal rhythm of Fos-related antigens expression. *Neuroendocrinology* 1997; 65: 436-445.
93. Lerant A, Kanyicska B, Freeman ME. Nuclear translocation of STAT5 and increased expression of Fos related antigens (FRAs) in hypothalamic dopaminergic neurons after prolactin administration. *Brain Res* 2001; 904: 259-269.
94. Liebsch G, Linthorst AC, Neumann ID, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R. Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19: 381-396.
95. Liu B, Arbogast LA. Phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in the stalk-median eminence is decreased by progesterone in cycling female rats. *Endocrinology* 2008; 149: 1462-1469.
96. Liu B, Arbogast LA. Progesterone decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation state and increases protein phosphatase 2A activity in the stalk-median eminence on proestrous afternoon. *J Endocrinol* 2010; 204: 209-219.
97. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 179-186.

98. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
99. Lookingland KJ, Jarry HD, Moore KE. The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. *Brain Res* 1987; 419: 303-310.
100. Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 1998; 139: 4102-4107.
101. Lyons DJ, Hellysaz A, Broberger C. Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *J Neurosci* 2012; 32: 8074-8083.
102. Mai LM, Shieh KR, Pan JT. Circadian changes of serum prolactin levels and tuberoinfundibular dopaminergic neuron activities in ovariectomized rats treated with or without estrogen: the role of the suprachiasmatic nuclei. *Neuroendocrinology* 1994; 60: 520-526.
103. Mallampati RS, Johnson DC. Serum and pituitary luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin levels in gonadectomized male, female and androgenized female rats treated with oestradiol benzoate. *J Endocrinol* 1973; 59: 209-216.
104. Mantella RC, Vollmer RR, Li X, Amico JA. Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. *Endocrinology* 2003; 144: 2291-2296.
105. Maurer RA, Gorski J. Effects of estradiol-17beta and pimozide on prolactin synthesis in male and female rats. *Endocrinology* 1977; 101: 76-84.
106. McCarthy MM, McDonald CH, Brooks PJ, Goldman D. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav* 1996; 60: 1209-1215.
107. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Civelli O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 7625-7628.
108. Meerlo P, Easton A, Bergmann BM, Turek FW. Restraint increases prolactin and REM sleep in C57BL/6J mice but not in BALB/cJ mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R846-854.
109. Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 1998; 139: 3976-3983.
110. Moghimian M, Faghihi M, Karimian SM, Imani A, Houshmand F, Azizi Y. Role of central oxytocin in stress-induced cardioprotection in ischemic-reperfused heart model. *J Cardiol* 2013; 61: 79-86.
111. Morales T, Lorensen M, Walker AM, Ramos E. Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity. *Neuroscience* 2014; 258: 211-217.
112. Morel GR, Carón RW, Cónsole GM, Soaje M, Sosa YE, Rodríguez SS, Jahn GA, Goya RG. Estrogen inhibits tuberoinfundibular dopaminergic neurons but does not cause irreversible damage. *Brain Res Bull* 2009; 80: 347-352.
113. Neill JD. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 1972; 90: 1154-1159.
114. Neill JD, Smith MS. Pituitary-ovarian interrelationships in the rat. *Curr Top Exp Endocrinol* 1974; 2: 73-106.

115. Neill JD, Freeman ME, Tillson SA. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* 1971; 89: 1448-1453.
116. Nephew BC, Amico J, Cai HM, Walker AM, Bridges RS. Intracerebroventricular administration of the prolactin (PRL) receptor antagonist, S179D PRL, disrupts parturition in rats. *Reproduction* 2007; 134: 155-160.
117. Neumann ID. The advantage of social living: brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30: 483-496.
118. Neumann ID, Torner L, Wigger A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 2000a; 95: 567-575.
119. Neumann ID, Krömer SA, Toschi N, Ebner K. Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul Pept* 2000b; 96: 31-38.
120. Nishihara M, Kimura F. Postsynaptic effects of prolactin and estrogen on arcuate neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 1989; 49: 215-218.
121. Noel GL, Suh HK, Stone JG, Frantz AG. Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35: 840-851.
122. Ohl F, Arndt SS, van der Staay FJ. Pathological anxiety in animals. *Vet J* 2008; 175: 18-26.
123. Oláh S, Cservenák M, Keller D, Fazekas EA, Renner É, Löw P, Dobolyi A. Prolactin-induced and neuronal activation in the brain of mother mice. *Brain Struct Funct* 2018; 223: 3229-3250.
124. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 1997; 11: 167-178.
125. Palkovits M. Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 161-166.
126. Pasqualini C, Lenoir V, El Abed A, Kerdelhué B. Anterior pituitary dopamine receptors during the rat estrous cycle. A detailed analysis of proestrus changes. *Neuroendocrinology* 1984; 38: 39-44.
127. Patil MJ, Henry MA, Akopian AN. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)* 2014; 8: 193-202.
128. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* San Diego, CA, 2007.
129. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149-167.
130. Pezet A, Ferrag F, Kelly PA, Edery M. Tyrosine docking sites of the rat prolactin receptor required for association and activation of stat5. *J Biol Chem* 1997; 272: 25043-25050.
131. Poletini MO, Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Role of the locus coeruleus in the prolactin secretion of female rats. *Brain Res Bull* 2004; 63: 331-338.

132. Poletini MO, Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Ovarian steroids but not the locus coeruleus regulate stress-induced prolactin secretion in female rats. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 938-948.
133. Poletini MO, Kennett JE, McKee DT, Freeman ME. Central clock regulates the cervically stimulated prolactin surges by modulation of dopamine and vasoactive intestinal polypeptide release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 2010; 91: 179-188.
134. Remes O, Brayne C, van der Linde R, Lafortune L. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain Behav* 2016; 6: e00497.
135. Rex A, Voigt JP, Voits M, Fink H. Pharmacological evaluation of a modified open-field test sensitive to anxiolytic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59: 677-683.
136. Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE. Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 2015; 27: 88-99.
137. Robinson OJ, Pike AC, Cornwell B, Grillon C. The translational neural circuitry of anxiety. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019; 90: 1353-1360.
138. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 801-810.
139. Romanò N, Yip SH, Hodson DJ, Guillou A, Parnaudeau S, Kirk S, Tronche F, Bonnefont X, Le Tissier P, Bunn SJ, Grattan DR, Mollard P, Martin AO. Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci* 2013; 33: 4424-4433.
140. Sah P. Fear, Anxiety, and the Amygdala. *Neuron* 2017; 96: 1-2.
141. Saiardi A, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 1997; 19: 115-126.
142. Salais-López H, Lanuza E, Agustín-Pavón C, Martínez-García F. Tuning the brain for motherhood: prolactin-like central signalling in virgin, pregnant, and lactating female mice. *Brain Struct Funct* 2017; 222: 895-921.
143. Samson WK, Lumpkin MD, McCann SM. Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology* 1986; 119: 554-560.
144. Sánchez-Criado JE, Martín De Las Mulas J, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A. Biological role of pituitary estrogen receptors ERalpha and ERbeta on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 247-258.
145. Sapsford TJ, Kokay IC, Ostberg L, Bridges RS, Grattan DR. Differential sensitivity of specific neuronal populations of the rat hypothalamus to prolactin action. *J Comp Neurol* 2012; 520: 1062-1077.
146. Sarkar DK. Immunoneutralization of oxytocin attenuates preovulatory prolactin secretion during proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 214-216.
147. Sarkar DK, Gibbs DM. Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats. *Neuroendocrinology* 1984; 39: 481-483.
148. Schreihöfer DA, Stoler MH, Shupnik MA. Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 2000; 141: 2174-2184.

149. Sellix MT, Freeman ME. Circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 2003; 77: 59-70.
150. Shieh KR, Pan JT. Sexual differences in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in the rat: role of cholinergic control. *Biol Reprod* 1996; 54: 987-992.
151. Shieh KR, Chu YS, Pan JT. Circadian change of dopaminergic neuron activity: effects of constant light and melatonin. *Neuroreport* 1997; 8: 2283-2287.
152. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 2003; 299: 117-120.
153. Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 1998; 63: 498-504.
154. Shull JD, Gorski J. Estrogen regulates the transcription of the rat prolactin gene in vivo through at least two independent mechanisms. *Endocrinology* 1985; 116: 2456-2462.
155. Siegel RA, Conforti N, Chowers I. Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res* 1980; 198: 43-53.
156. Silva JF, Henriques PC, Campideli-Santana AC, Araujo-Lopes R, Aquino NSS, Hipolito LTM, Lopes-Aguiar C, Reis AM, Grattan DR, Szawka RE. Estradiol Potentiates But Is Not Essential for Prolactin-Induced Suppression of Luteinizing Hormone Pulses in Female Rats. *Endocrinology* 2020a; 161.
157. Silva KSC, Aquino NSS, Gusmao DO, Henriques PC, Reis AM, Szawka RE. Reduced dopaminergic tone during lactation is permissive to the hypothalamic stimulus for suckling-induced prolactin release. *J Neuroendocrinol* 2020b; 32: e12880.
158. Sirzen-Zelenskaya A, Gonzalez-Iglesias AE, Boutet de Monvel J, Bertram R, Freeman ME, Gerber U, Egli M. Prolactin induces a hyperpolarising current in rat paraventricular oxytocinergic neurones. *J Neuroendocrinol* 2011; 23: 883-893.
159. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96: 219-226.
160. Sousa N, Almeida OF, Wotjak CT. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav* 2006; 5 Suppl 2: 5-24.
161. Steger RW, Chandrashekar V, Zhao W, Bartke A, Horseman ND. Neuroendocrine and reproductive functions in male mice with targeted disruption of the prolactin gene. *Endocrinology* 1998; 139: 3691-3695.
162. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 1983; 6: 269-324.
163. Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 374-382.
164. Szawka RE, Helena CV, Rodovalho GV, Monteiro PM, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Locus coeruleus norepinephrine regulates the surge of prolactin during oestrus. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 639-648.

165. Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Helena CV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman GE, Anselmo-Franci JA. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 3247-3257.
166. Tena-Sempere M, Navarro VM, Mayen A, Bellido C, Sánchez-Criado JE. Regulation of estrogen receptor (ER) isoform messenger RNA expression by different ER ligands in female rat pituitary. *Biol Reprod* 2004; 70: 671-678.
167. Terkel J, Blake CA, Sawyer CH. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 1972; 91: 49-53.
168. Thomas GB, Cummins JT, Cavanagh L, Clarke IJ. Transient increase in prolactin secretion following hypothalamo-pituitary disconnection in ewes during anoestrus and the breeding season. *J Endocrinol* 1986; 111: 425-431.
169. Torner L, Neumann ID. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 2002; 5: 249-257.
170. Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci* 2001; 21: 3207-3214.
171. Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1381-1389.
172. Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* 2011; 471: 358-362.
173. Uvnäs-Moberg K, Ahlenius S, Hillegaard V, Alster P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 101-106.
174. Vega C, Moreno-Carranza B, Zamorano M, Quintanar-Stephano A, Mendez I, Thebault S, Martinez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin promotes oxytocin and vasopressin release by activating neuronal nitric oxide synthase in the supraoptic and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 299: R1701-1708.
175. Waldherr M, Neumann ID. Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 16681-16684.
176. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2: 322-328.
177. Watson RE, Jr., Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides* 1986; 7: 155-159.
178. Weinberg MS, Girotti M, Spencer RL. Restraint-induced fra-2 and c-fos expression in the rat forebrain: relationship to stress duration. *Neuroscience* 2007; 150: 478-486.
179. West B, Dannies PS. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. *Endocrinology* 1980; 106: 1108-1113.
180. Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 1997; 138: 2829-2834.
181. Yamaguchi K, Akaishi T, Negoro H. Effect of estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats. *Endocrinol Jpn* 1979; 26: 197-205.

182. Yamamoto N, Seo H, Suganuma N, Matsui N, Nakane T, Kuwayama A, Kageyama N. Effect of estrogen on prolactin mRNA in the rat pituitary. Analysis by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroendocrinology* 1986; 42: 494-497.
183. Yang S, Lee Y, Voogt JL. Fos expression in the female rat brain during the proestrous prolactin surge and following mating. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 281-289.
184. Yip SH, Eguchi R, Grattan DR, Bunn SJ. Prolactin signalling in the mouse hypothalamus is primarily mediated by signal transducer and activator of transcription factor 5b but not 5a. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 1484-1491.
185. Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 435-455.
186. Zabavnik J, Wu WX, Eidne KA, McNeilly AS. Dopamine D2 receptor mRNA in the pituitary during the oestrous cycle, pregnancy and lactation in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 95: 121-128.
187. Zamorano M, Ledesma-Colunga MG, Adán N, Vera-Massieu C, Lemini M, Méndez I, Moreno-Carranza B, Neumann ID, Thebault S, Martínez de la Escalera G, Torner L, Clapp C. Prolactin-derived vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology* 2014; 44: 123-132.