

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

**Participação da Angiotensina II na Resposta da
Prolactina e no Comportamento Maternal de Ratas
Lactantes Submetidas ao Estresse Crônico e Agudo**

Dissertação de Mestrado

Marcelo Herberts

Porto Alegre, 2009

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

**Participação da Angiotensina II na Resposta da
Prolactina e no Comportamento Maternal de Ratas
Lactantes Submetidas ao Estresse Crônico e Agudo**

Dissertação de Mestrado

Marcelo Herberts

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto L. Sanvitto

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

Porto Alegre, 2009

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Gilberto L. Sanvitto por ser meu orientador e fazer parte do meu processo de amadurecimento na caminhada acadêmica, em meio a dificuldades e imprevistos.

Aos meus pais e irmãos, uma família unida, pelo constante suporte, atenção, encorajamento e sabedoria no decurso da minha vida.

À Cristiane, pelo afeto e firme compromisso de estar sempre ao meu lado, sobretudo nos momentos difíceis, pronta a colaborar com suas sábias palavras.

Ao laboratório 11, que desde o primeiro dia em que tenho feito parte da equipe, nunca se negou a me ajudar, tirando dúvidas técnicas e acadêmicas e no particular, às colegas Silvana, Patrícia e Karin, também pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia do ICBS, pela amizade e constante suporte acadêmico.

Ao laboratório de Fisiologia Cardiovascular, pela disponibilidade dos equipamentos para a realização de experimentos, bem como ao prof. Dr. Celso R. Franci, da USP-Ribeirão Preto-SP, pelo auxílio na dosagem plasmática dos hormônios.

Ao Núcleo de Assessoria Estatística (NAE) e à Luisa Diehl pela boa vontade em me auxiliarem na execução dos cálculos estatísticos dos experimentos.

E acima de tudo a DEUS, pela inestimável companhia nos maus e bons momentos de minha vida, razão de todo o meu esforço acadêmico.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 5 |
| Resumo | 6 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 2. OBJETIVO | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Animais | 24 |
| 3.2 Estresse por contenção | 24 |
| 3.3 Administração de losartan | 25 |
| 3.4 Distribuição dos grupos | 25 |
| 3.5 Registro do comportamento maternal | 26 |
| 3.6 Coleta de sangue | 28 |
| 3.7 Dosagens hormonais | 28 |
| 3.8 Expressão dos resultados | 29 |
| 3.9 Análise estatística | 29 |
| 4. RESULTADOS | 30 |
| 5. DISCUSSÃO | 44 |
| 6. CONCLUSÃO | 54 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

ABREVIATURAS

- ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico
- ARC – Núcleo arqueado
- ANG II – Angiotensina II
- AVP – Arginina-vasopressina
- CORT – Corticosterona
- CRH – Hormônio liberador de corticotropina
- HPA – Eixo hipotálamo-hipófise adrenal
- MPOA – Área pré-óptica medial
- NA – Núcleo *accumbens*
- PRL – Prolactina
- icv – Intracerebroventricular
- PHDA – Sistema periventricular hipofisário dopaminérgico
- POMC – Pró-ópio melanocortina
- PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
- THDA – Sistema tuberohipofisário dopaminérgico
- TIDA – Sistema tuberoinfundibular dopaminérgico
- TRH – Hormônio liberador de tireotropina
- SFO – Órgão subfornicial
- VP – *Pallidum* ventral
- OCT – Ocitocina
- DA – Dopamina
- VTA – Área tegmental ventral
- vBST – Porção Ventral do Núcleo do Leito da Estria Terminal

RESUMO

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico com múltiplas ações. Estudos têm revelado que além das funções mais conhecidas relacionadas ao desenvolvimento da glândula mamária e à síntese e manutenção da liberação de leite, esse hormônio parece ser decisivo no comportamento maternal. Nesse caso a PRL poderia atuar em sinergismo com outros hormônios, como a ocitocina (OCT) e a angiotensina II (ANG II), promovendo um ajuste fino da circuitaria neural do encéfalo que leva a rata de um estado de aversão e negligência à receptividade e cuidado maternal de filhotes. Junto da corticosterona (CORT), a ANG II é um hormônio marcador do estresse em ratos. Considerando a hiporresponsividade ao estresse e uma maior liberação de PRL basal, que se correlacionam na rata em fase de lactação, esta dissertação teve o objetivo de verificar a possível participação da ANG II na resposta da PRL e no comportamento maternal de ratas lactantes submetidas ao estresse crônico e agudo. O papel do sistema angiotensinérgico foi investigado por meio da administração crônica do antagonista losartan na água de beber. A aplicação de estresse crônico e agudo foi realizada segundo o modelo da contenção nos sete primeiros dias, e numa aplicação única no sétimo dia, respectivamente. O comportamento maternal nos diferentes grupos de ratas foi analisado mediante um protocolo padrão de registro comportamental. Esses estudos demonstraram que a ANG II basal possivelmente participa do comportamento maternal pró-ativo, como a presença da mãe no ninho e a construção do ninho, além da lactação, que é um comportamento parcialmente reflexo e pró-ativo. Por outro lado, a sobreposição entre a administração de losartan e estresse agudo ou crônico parece levar as ratas a um comportamento maternal similar ao grupo controle. O comportamento das lactantes junto aos filhotes não é influenciado pelo estresse crônico, ao contrário do estresse agudo, que estimula a mãe a permanecer mais tempo fora do ninho em relação ao controle, sem qualquer envolvimento com o cuidado maternal. A administração individual de losartan e de estresse crônico não interfere nos níveis de CORT; no entanto, quando esses fatores são somados há uma marcante elevação dos níveis plasmáticos do corticosteróide. Houve apenas uma tendência de redução da PRL nas ratas submetidas ao estresse crônico; porém, quando o estresse crônico é aplicado em ratas previamente tratadas com losartan, há uma significativa elevação da PRL em relação ao grupo que recebeu apenas o estresse. Isoladamente, o fármaco leva a uma tendência de redução dos altos níveis basais de PRL, típicos de lactantes. Assim, podemos concluir que a ANG II possivelmente modula, mediante os receptores AT_1 , o comportamento maternal de forma direta e indireta, interferindo nas concentrações basais de PRL e de outros hormônios, como provavelmente a OCT. Esses hormônios podem configurar as ligações sinápticas entre os neurônios hipotalâmicos responsáveis pela transdução de estímulos endógenos na mãe e nociceptivos externos dos filhotes em sinais que levam à responsividade motora e cognitiva do cuidado maternal.

Introdução

A prolactina (PRL) é um peptídeo sintetizado e secretado pelos lactotrofos adenohipofisários, exercendo múltiplas ações, com uma importante participação no início e na manutenção da lactação e também no comportamento maternal como um todo (BRIDGES *et al.*, 1985; SAKAGUCHI *et al.*, 1996; LUCAS *et al.*, 1998).

O período da lactação envolve mudanças comportamentais e fisiológicas na rata. Esse período pode representar um desafio à homeostase da mãe assim como as situações de estresse e outras desordens (ver NEUMANN *et al.*, 1998). As alterações fisiológicas decorrentes da lactação buscam uma otimização do desenvolvimento da prole.

Segundo BRIDGES e colaboradores (1990), a PRL pode agir centralmente para estimular o início do comportamento maternal. Infusões intracerebro-ventriculares (icv) do hormônio levam a um rápido início do cuidado maternal em ratas nulíparas e com reposição de esteróides, ao contrário da administração sistêmica de PRL, que não tem efeitos comportamentais. Além disso, a infusão do hormônio próximo à área pré-óptica medial (MPOA, no hipotálamo rostral) em uma dose que não afeta o comportamento maternal quando administrada icv, estimula marcadamente o cuidado maternal de filhotes adotivos. É provável que nas condições fisiológicas esses efeitos centrais resultem ao menos em parte da PRL hipofisária, já que ela pode alcançar o fluido cerebrospinal por transporte ativo pela barreira hematoencefálica (WALSH *et al.*, 1987; MANGURIAN *et al.*, 1992). Os receptores no plexo coróide que medeiam esse processo sofrem *up regulation* na lactação (AUGUSTINE *et al.*, 2003).

A sucção dos filhotes é um dos estímulos fisiológicos mais importantes para a elevação da PRL hipofisária: estudos demonstram a existência de uma correlação entre o estímulo da sucção e uma elevação significativa dos níveis basais de PRL plasmática (GROSVENOR *et al.*, 1986) e central (RUBIN & BRIDGES, 1989) em ratas lactantes nos primeiros dias do pós-parto. Essa elevação de PRL alcança o clímax no sétimo dia da lactação (TAYA & SASAMOTO, 1981).

O mecanismo da resposta da PRL ao estímulo da sucção dos filhotes inclui provavelmente uma inibição da ação do sistema dopaminérgico sobre os lactotrofos, pois o tratamento com domperidona, um bloqueador dos receptores de dopamina (DA) que não atravessa a barreira hematoencefálica, acarreta uma grande elevação da PRL plasmática (LIGHTMAN & YOUNG, 1989; CARTER & LIGHTMAN, 1987). Do mesmo modo, os níveis muito baixos da PRL em mães separadas por 4 horas de seus filhotes se tornam muito elevados após a administração de domperidona (BÁNKY *et al.*, 1994). Ao que parece, o antagonista libera o lactotrofo do tônus inibitório dopaminérgico, permitindo assim a ação de fatores de liberação de PRL, como o TRH. Haveria assim uma hiperprolactinemia por inibição do tônus inibitório do sistema dopaminérgico.

Vários estudos (GOUDREAU *et al.*, 1995, 1992; KAWANO & DAIKOKU, 1987; HOLZBAUER & RACKE, 1985) demonstraram que neurônios dopaminérgicos do núcleo arqueado (ARC) e do núcleo periventricular do hipotálamo fornecem DA à hipófise. A população de neurônios dopaminérgicos compreende três sistemas, tendo em vista a região hipofisária na qual se projetam: sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA), sistema

tuberohipofisário dopaminérgico (THDA) e sistema periventricular hipofisário dopaminérgico (PHDA) (FREEMAN *et al.*, 2000). O sistema TIDA se destaca como a via central mais importante no controle da secreção de PRL nas lactantes (LEONG *et al.*, 1983). Seus neurônios se estendem à zona externa da eminência mediana (KAWANO & DAIKOKU, 1987), liberando DA no espaço perivascular do sistema portahipofisário; após alcançar a circulação porta, o neurohormônio se liga a receptores D₂ nos lactotrofos, inibindo a sua atividade. Por outro lado, a PRL liberada pelos lactotrofos pode estimular a atividade neuroendócrina das células de DA desses três sistemas, consolidando assim uma alça de *feedback* de PRL (DEMARIA *et al.*, 1999).

Além da regulação por fatores de liberação e inibição secretados pelo hipotálamo a partir de estímulos fisiológicos (sucção dos filhotes, estresse, esteróides ovarianos), a secreção dos lactotrofos também pode ser modulada por fatores produzidos pelos próprios lactotrofos – numa regulação autócrina, ou por células hipofisárias vizinhas – numa regulação parácrina (FREEMAN *et al.*, 2000).

Numa situação de estresse, a flutuação da PRL a partir dos seus níveis basais depende da concentração do hormônio no período anterior ao estímulo (FREEMAN *et al.*, 2000; CALIGARIS & TALESNIK, 1983; STERN & VOOGT, 1974), havendo influência do sexo, dos hormônios ovarianos, da hora do dia e do modelo de estresse. Assim, enquanto ratas virgens na manhã do diestro e do proestro submetidas ao estresse agudo por contenção apresentam elevação significativa das concentrações plasmáticas de PRL, nas lactantes a resposta do hormônio é muito diferente: a contenção única não produz qualquer elevação significativa dos níveis de PRL em relação ao controle (KEHOE *et al.*, 1991;

HIGUCHI *et al.*, 1989). Em alguns casos a PRL pode até mesmo sofrer uma redução significativa, inclusive levando-se em conta diferentes paradigmas de estresse (BÁNKY *et al.*, 1994; DONADIO *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 1992).

Em ratas lactantes isoladas por 4 horas, os níveis de PRL se tornam muito baixos em consequência da remoção dos filhotes. Nessa condição, a aplicação de estresse por formalina ou por contenção não causa qualquer aumento da PRL nas mães. No entanto, se ratas – que na presença de seus filhotes, tiveram redução da PRL quando receberam formalina – são separadas por 48 horas da ninhada, esse tempo é suficiente para ocorrer nelas uma grande elevação da PRL induzida pela formalina, uma resposta típica das não lactantes. No que tange à resposta do eixo HPA das ratas separadas por 4 horas de seus filhotes, tanto a formalina como a contenção elevam a corticosterona plasmática (CORT), a exemplo do que ocorre nas ratas não lactantes (BÁNKY *et al.*, 1994). No conjunto, esses dados sugerem que a resposta da PRL e da CORT ao estresse é diferente nas lactantes, e sinalizam uma possível participação da sucção dos filhotes nas alterações fisiológicas do eixo HPA das mães.

No estudo comparativo de LOOKINGLAND e colaboradores (1990) acerca dos efeitos do estresse por éter e por contenção sobre a atividade dos neurônios TIDA, a aplicação de estresse por contenção em ratas sem qualquer exposição prévia ao éter produziu uma elevação na PRL circulante que não foi mediada por uma inibição dos efeitos dos neurônios TIDA; por outro lado, a combinação de éter e contenção intensificou o efeito inibitório dos neurônios TIDA. Do mesmo modo, um trabalho mais recente (KEHOE *et al.*, 1991) demonstrou que no estresse por contenção a resposta da PRL não requer inibição desses neurônios,

e lactantes com níveis elevados de PRL mediante a administração de domperidona têm uma redução significativa do hormônio sob esse tipo de estresse (BÁNKY *et al.*, 1994). Assim, o modelo de estresse pode determinar quais vias neurais e fatores estarão envolvidos no mecanismo das respostas da PRL ao estresse.

O ARC possui receptores AT₁ para a angiotensina II (ANG II) (LENKEI *et al.*, 1997), e a redução dos níveis plasmáticos de PRL de ratas lactantes submetidas ao estresse agudo por éter é mediada pela ação da ANG II sobre receptores AT₁ desse núcleo, já que a redução pode ser prevenida pela administração local de um antagonista do receptor (DONADIO *et al.*, 2004). Esse bloqueio é realizado pelo antagonista não peptídico losartan, que possui alta afinidade e especificidade: através da administração oral o fármaco tem ação dose-dependente sobre os efeitos centrais da ANG II (CULMAN *et al.*, 1999), penetrando na barreira hematoencefálica *in vivo* (SONG *et al.*, 1991).

Além dos efeitos clássicos da ANG II sobre a pressão sanguínea e no mecanismo da sede, demonstrou-se que ela tem um efeito psicoativo, facilitando o aprendizado e melhorando a memória de ratos (KUŁAKOWSKA *et al.*, 1996). Segundo YANG e colaboradores (1993), tanto o estresse agudo como o crônico elevam a síntese periférica e central de ANG II. Também o estresse repetitivo aumenta a densidade de sítios de ligação para ANG II no núcleo paraventricular (PVN) (CASTRÉN & SAAVEDRA, 1988). Os receptores AT₁, responsáveis pelas principais ações da ANG II, encontram-se distribuídos em áreas hipotalâmicas centrais para o controle do estresse, como o PVN, e em estruturas circunventriculares, como o órgão subfornicial (SFO) (CASTRÉN & SAAVEDRA,

1988; AGUILERA *et al.*, 1995). O SFO é uma das estruturas extrahipotalâmicas responsáveis pela transdução do estímulo da ANG II periférica em uma sinalização central; a ANG II periférica e a central podem estimular o ARC, que então atua sobre populações de neurônios dopaminérgicos envolvidos na modulação da PRL basal.

A ação da ANG II na porção parvocelular do PVN durante o estresse estimula a síntese e a liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) (SUMITOMO *et al.*, 1991). Na forma de um sinergismo, a arginina-vasopressina (AVP) coopera com o CRH, que é o principal modulador do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na adenohipófise (LIGHTMAN & YOUNG, 1988; PLOTSKY, 1991). LIGHTMAN (2008) aponta que se por um lado há no estresse agudo uma discreta elevação de AVP e significativa elevação de CRH, no estresse crônico a resposta hipotalâmica é muito diferente: há uma liberação reduzida de CRH e significativo aumento na liberação de AVP.

A CORT apresenta uma variação circadiana, mas em situações de estresse, como na contenção, ocorre uma perturbação da homeostase com alterações no eixo HPA (MUNCK *et al.*, 1984), o que resulta numa elevação sustentada dos níveis plasmáticos desse corticosteróide (HAUGER *et al.*, 1988; LIGHTMAN & YOUNG, 1988), assim como de ACTH (HAUGER *et al.*, 1988; WALKER *et al.*, 1992).

Na comparação com ratas virgens, em ratas no final da gestação e nas lactantes o estresse por contenção causa uma redução significativa da atividade neuronal na porção parvocelular do PVN e em estruturas extrahipotalâmicas

envolvidas na ativação do eixo HPA, sugerindo-se a possibilidade do envolvimento de áreas límbicas (córtex cingulado, septo lateral ventral e amígdala medial) no processo que leva à baixa responsividade do eixo (DA COSTA *et al.*, 1996). Em um estudo mais recente (DA COSTA *et al.*, 2001), lactantes submetidas ao estresse por contenção apresentaram uma atenuação da elevação do RNAm da AVP e do receptor tipo 1 de CRH, e também do RNAm da porção parvocelular do PVN – elevação que ocorre em ratas virgens quando submetidas ao estresse. Além disso, DOUGLAS e colaboradores (2005) verificaram que na fase final da gestação ocorre uma redução significativa da atividade das aferências noradrenérgicas ao PVN, resultante ao menos em parte de uma possível inibição endógena por opióides. Porém, não ocorrem alterações na sensibilidade adrenocortical ao ACTH (STERN *et al.*, 1974) nem na expressão do RNAm da POMC dos corticotrofos das lactantes (FISCHER *et al.* 1995; KIM *et al.*, 1997). Assim, as alterações da resposta da prenha e da lactante ao desafio do estresse decorrem provavelmente da ação orquestrada entre sinalizadores químicos e diferentes vias nervosas centrais.

Já a partir da fase final da gestação, a hiporresponsividade das lactantes a diferentes situações de estresse físico e psicológico acaba se refletindo numa menor liberação de CORT (NEUMANN *et al.*, 1998; STERN *et al.*, 1974; LIGHTMAN & YOUNG, 1989; STERN & LEVINE, 1974; NEUMANN *et al.*, 1998), o que representa provavelmente um mecanismo de proteção da mãe e da prole contra os efeitos nocivos dos níveis excessivamente altos de glicocorticóides (WEINSTOCK, 1997). O trabalho de NEUMANN e colaboradores (1998) sugere que essa resposta diminuída do eixo HPA seja ao menos em parte decorrente de

uma menor reatividade dos corticotrofos ao CRH, pois uma autoradiografia de receptores mostrou uma redução significativa na densidade de sítios de ligação de CRH na adenohipófise de prenhas, na comparação com ratas virgens.

Conforme os primeiros estudos sobre o tema (STERN & VOOGT, 1974; SCHLEIN *et al.*, 1974; MYERS *et al.*, 1975), há uma sobreposição entre as alterações na resposta do eixo HPA da lactante ao estresse e uma maior liberação basal de PRL na lactação. O contato dos filhotes participa das alterações neuroendócrinas na mãe que vai amamentar, pois a sucção representa um potente estímulo para a liberação de ocitocina (OCT), dos hormônios do estresse ACTH e CORT, e como vimos anteriormente, de PRL. Com a retirada dos filhotes do ninho, tem início uma redução gradativa dos níveis plasmáticos de ACTH e de CORT da mãe, e essa redução é revertida assim que os filhotes, novamente na presença da mãe, retornam à sucção (WALKER *et al.*, 1992).

A OCT é um hormônio que apresenta diversas funções, porém as mais bem caracterizadas são a regulação do parto e a indução da ejeção de leite em resposta à sucção (LINCOLN & PAISLEY, 1982; WAKERLEY *et al.*, 1988). A secreção do peptídeo ocorre primariamente na circulação periférica, através da neurohipófise; essa estrutura compreende projeções axonais de neurônios magnocelulares do PVN e do Núcleo Supra-Óptico do hipotálamo. A OCT é também liberada centralmente (medula espinhal e porção caudal do tronco encefálico) em pequenas quantidades por neurônios parvocelulares do PVN e, conforme descobertas recentes, em grandes quantidades pelos dendritos de neurônios magnocelulares, independentemente da OCT liberada pelas

terminações desses mesmos neurônios na neurohipófise (SABATIER *et al.*, 2003).

Em ratas prenhas e lactantes verifica-se uma alteração nos níveis de OCT e na densidade dos seus receptores em diferentes regiões do encéfalo, como o PVN (CALDWELL *et al.*, 1987). É possível que uma maior expressão da OCT e dos seus receptores facilite o início e a manutenção do comportamento maternal, já que o hormônio tem forte participação na modulação desse comportamento numa ação dose-dependente (PEDERSEN *et al.*, 1982; LENG *et al.*, 2008). O controle de certos aspectos do comportamento maternal pode envolver provavelmente uma interação entre a OCT e o sistema dopaminérgico e o serotoninérgico (JOHNS *et al.*, 2005).

Os efeitos comportamentais da OCT são variados, mas de modo geral ainda não está claro se é o sistema magnocelular ou o parvocelular que medeia tais efeitos (LENG *et al.*, 2008). Não obstante a alta densidade de receptores de OCT na amígdala, no núcleo ventromedial e no bulbo olfatório, há uma clara ausência de fibras nervosas ocitocinérgicas nas regiões encefálicas que participam do comportamento maternal; assim, foi proposto que a OCT poderia alcançar seus alvos não por transmissão sináptica, mas por fluxo de massa pelo espaço extracelular encefálico (LUDWIG & LENG, 2006; LANDGRAF & NEUMANN, 2004).

Tendo em vista que alterações no cuidado maternal são críticas para o desenvolvimento da prole, e que o comportamento da mãe pode ser influenciado direta ou indiretamente pelas condições do meio, foram desenvolvidos modelos

de estudo a partir de princípios metodológicos que levam em conta a frequência e a dinâmica da relação mãe-prole (CHAMPAGNE *et al.*, 2003). Esses modelos são importantes quando se busca investigar um paralelo entre o comportamento maternal e as possíveis alterações neuroendócrinas sob estímulos estressores. Entre todos os comportamentos maternos em ratas, NUMAN & INSEL (2003) distinguiram quatro principais: (1) recolhimento de filhotes, (2) construção de ninho, (3) amamentação e (4) lambida de filhotes. Essa distinção tem em vista uma participação regulatória potencial de diferentes vias neurais na rata lactante. Nesse sentido seria possível classificar os comportamentos tendo em vista os que dependem ou não da postura pró-ativa da mãe. Assim, NUMAN & STOLZENBERG (2009) classificaram, por exemplo, o comportamento de recolhida de filhotes como pró-ativo (dependente da atividade neural prosencefálica), e a amamentação primariamente um comportamento automático ou reflexo na lactante, desencadeado pelo estímulo de sucção dos filhotes na região mamária (mecanismo dependente em grande parte de neurônios tronco encefálico—medulares).

Após o parto, a rata primípara inicia a série de comportamentos maternos junto à ninhada. Ao contrário das ratas virgens que entram pela primeira vez em contato com filhotes, as lactantes não rejeitam os filhotes, e isso resulta provavelmente da ação seletiva dos hormônios associados à gestação e ao seu término (como lactógenos placentários, PRL, estradiol e progesterona) sobre circuitos neurais do encéfalo, que por um lado programam o comportamento de aversão aos filhotes, ou por outro, desencadeiam o cuidado maternal (NUMAN & INSEL, 2003).

Diversas regiões encefálicas estão envolvidas no comportamento da mãe com os filhotes. O sistema dopaminérgico mesolímbico tem um importante papel, compreendendo corpos celulares liberadores de DA que partem da área tegmental ventral (VTA, no mesencéfalo). Várias estruturas encefálicas recebem projeções dopaminérgicas, como MPOA, NA (núcleo *accumbens*) e VP (*pallidum ventral*). Alguns estudos demonstram que a MPOA tem uma importância crítica (NUMAN, 1974; NUMAN *et al.*, 1977), e que a sua ligação com a porção ventral do núcleo do leito da estria terminal (vBST) compreende neurônios necessários para o início e a manutenção do comportamento maternal: lesões pontuais na MPOA, bem como secções que separam as conexões laterais ou anteriores da MPOA, interrompem o comportamento maternal, enquanto que, por outro lado, a administração de estrógeno diretamente nessa área estimula o comportamento (NUMAN, 1974; NUMAN *et al.*, 1977; BRIDGES, 1990; MICELI *et al.*, 1983; NUMAN & CALLAHAN, 1980; NUMAN & CORODIMAS, 1985; NUMAN *et al.*, 1988). A integridade da ligação entre a MPOA e a vBST é importante para a ocorrência de respostas voluntárias ou pró-ativas da lactante. Lesões nessas estruturas não afetam o metabolismo, o comportamento sexual e as funções motoras que possibilitam a execução do comportamento maternal pró-ativo (NUMAN & STOLZENBERG, 2009).

Além da MPOA, o NA também possui um papel no comportamento maternal, em vista de uma maior atividade *c-fos* no NA de ratas predispostas ao cuidado dos filhotes (STACK *et al.*, 2002; LONSTEIN *et al.*, 1998), devido à existência de uma relação entre a interação mãe-prole e a liberação e ligação de DA em receptores presentes no NA (CHAMPAGNE *et al.*, 2004), e também pelo

fato da microinjeção de antagonistas de receptores de DA no NA de ratas interromper seu comportamento maternal (SILVA *et al.*, 2003). Entre as duas classes de receptores dopaminérgicos, D₁ e D₂, presentes no NA (LU *et al.*, 1998), NUMAN e colaboradores (2005) indicam uma relação entre comportamentos pró-ativos da mãe e o estímulo dos receptores D₁ no NA; a administração de baixas doses do antagonista desses receptores interrompeu o recolhimento de filhotes, mas não teve o mesmo efeito sobre o tempo total da amamentação, que é um comportamento em parte reflexo, dependente dos estímulos dos filhotes na mãe.

Um modelo neural para o comportamento da mãe lactante propõe que quando adequadamente suprida por hormônios, a MPOA responde ao estímulo externo (como dos filhotes) com eferências que estimulam a VTA, possivelmente ativando a liberação de DA para agir em receptores D₁ presentes no NA. Com isso, a VTA faria uma inibição do NA, havendo então uma redução do seu tônus inibitório sobre o VP (NUMAN *et al.*, 2005; 2009). O VP é uma estrutura que converge ao prosencéfalo e a regiões de controle motor do tronco encefálico, mediando a ação comportamental (MOGENSON, 1987).

Algumas linhas de evidência demonstram que a modulação do padrão de respostas da MPOA para o início do comportamento maternal pode envolver a ação hormonal, pois os neurônios da MPOA contêm uma grande quantidade de receptores de PRL (BAKOWSKA & MORRELL, 1997), de estrógenos (SHUGHRUE *et al.*, 1997), de ANG II (SIRETT *et al.*, 1977), entre outros. Contudo, ainda que a iniciação do comportamento maternal em ratas parturientes primíparas esteja sob o controle hormonal, sua manutenção não depende de

hormônios: ratas que sofreram hipofisectomia assim que o comportamento maternal tenha se estabilizado, continuam a mostrá-lo no período pós-parto, mesmo não estando mais aptas à lactação dos filhotes (NUMAN, 2003).

Além do seu importante papel na modulação do eixo HPA, o PVN parece participar do comportamento maternal, pois ratas que sofreram lesão eletrolítica nesse núcleo na fase gestacional mostraram mais tarde um profundo déficit no cuidado dos filhotes (INSEL & HARBAUGH, 1989). Sabe-se também que tanto a VTA como a MPOA recebem projeções do PVN. A porção parvocelular do núcleo emite neurônios ocitocinérgicos para a região central, e não para a neurohipófise (SWANSON & SAWCHENKO, 1983) — o que ocorre com a porção magnocelular. Nesse sentido é oportuno lembrar que até mesmo neurônios magnocelulares liberam OCT à região central, e que esta OCT provavelmente também participa da modulação do circuito neural por trás do comportamento da mãe.

Dentro desse quadro, se por um lado a manutenção do comportamento da rata junto à ninhada ao longo dos primeiros dias resultaria de processos neurais centrais operando parcialmente de modo reflexo a partir de estímulos externos dos filhotes, os hormônios são importantes porque poderiam facilitar a configuração das ligações sinápticas entre esses neurônios, preparando o encéfalo da rata gestante para o parto e posteriormente à lactação e ao cuidado maternal. Com isso, é provável que interferências sobre a ação hormonal na fase crítica do pós-parto possam trazer um déficit no cuidado maternal.

Objetivo

Verificar o efeito do bloqueio dos receptores AT₁ de angiotensina II sobre o comportamento maternal e a concentração plasmática de PRL em ratas lactantes submetidas a estresse crônico ou agudo.

Material e Métodos

3.1 Animais

Ratas prenhas da variedade *Wistar* (220~300 g) obtidas junto ao Biotério Central do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram mantidas em ambiente de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de claro-escuro de 12 em 12 horas (luzes acesas: 06:00h~18:00h), em caixas individuais para observação, ração e água *ad libitum*. A maravalha foi mantida do dia 0 até o final do experimento. No dia 1 do pós-parto foi feita uma padronização dos filhotes (8), devido a uma relação entre a quantidade de PRL liberada e a intensidade do estímulo da sucção de acordo com o número de filhotes (MENA & GROSVENOR, 1968). Além disso, o ambiente foi mantido com sonoridade adequada. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (*National Institutes of Health*, NIH) e com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do ICBS/UFRGS.

3.2 Estresse por Contenção

Esse estresse se constitui na colocação das ratas individualmente em tubos transparentes e ventilados. Em todos os casos, as ratas foram removidas de suas caixas-residência e colocadas nos tubos de contenção em uma sala adjacente em condições de baixa luminosidade. A contenção foi aplicada em dois grupos: crônico e agudo (GAMMIE & STEVENSON, 2006). O tempo de duração do estresse foi de 30 minutos, sempre entre 08:45h~09:15h.

3.3 Administração de losartan

A administração oral de losartan foi feita através de uma solução de losartan 10mg/kg/dia em água de beber (CULMAN *et al.*, 1999), trocada a cada 24 horas. Definiu-se previamente uma curva de ingestão hídrica diária (dia 0 ao dia 7) com 10 ratas lactantes; estas foram pesadas a cada 48 horas para correção das doses do antagonista (em mL de solução/dia). A solução foi administrada nos grupos 2, 4, 6 e 8, após padronização dos filhotes, do dia 0 ao dia 7.

3.4 Distribuição dos grupos

3.4.1 Experimento de Estresse Crônico

As ratas dos grupos de estresse foram submetidas a 30 minutos de estresse por contenção no período da manhã por sete dias consecutivos (dia 1 ao dia 7). Grupos:

- ▶ (Grupo 1) Sem losartan – Sem estresse: n = 15
- ▶ (Grupo 2) Com losartan – Sem estresse: n = 8
- ▶ (Grupo 3) Sem losartan – Estresse crônico: n = 11
- ▶ (Grupo 4) Com losartan – Estresse crônico: n = 9

3.4.2 Experimento de Estresse Agudo

No dia 7 pós-parto as ratas dos grupos de estresse receberam estresse por 30 minutos no período da manhã. Grupos:

- ▶ (Grupo 5) Sem losartan – Sem estresse
 - ▶ (Grupo 6) Com losartan – Sem estresse
 - ▶ (Grupo 7) Sem losartan – Estresse agudo: n = 18
 - ▶ (Grupo 8) Com losartan – Estresse agudo: n = 10
- } Grupos controles do experimento anterior

3.5 Registro do Comportamento Maternal

Estando as ratas dentro de suas caixas individuais, o registro do comportamento maternal foi realizado do dia 1 ao 7 pós-parto.

3.5.1 Procedimento

As observações foram divididas em quatro seções de 75 minutos cada, com três seções na fase clara (11:15h, 13:15h e 15:15h) e uma seção na fase escura (18:00h). Em cada seção foi analisado e registrado o comportamento da lactante a cada 3 minutos (25 observações por seção x 4 seções diárias = 100 observações/mãe/dia).

3.5.2 Parâmetros comportamentais analisados (CHAMPAGNE *et al.*, 2003)

- ◆ HG – mãe amamentando com dorso bem arqueado;
- ◆ LW – mãe amamentando com dorso pouco arqueado;
- ◆ SUP – postura passiva de amamentação (supino);
- ◆ MN – mãe no ninho com os filhotes, sem amamentá-los;

- ◆ L – mãe lambendo os filhotes (superfície do corpo e região anogenital);
- ◆ CN – construção do ninho;
- ◆ HG/L – mãe com dorso bem arqueado e lambendo os filhotes;
- ◆ A – ingestão de água;
- ◆ RA – ingestão de ração;
- ◆ OFF – mãe fora do ninho;
- ◆ R – recolhimento de filhotes pela mãe.

Os comportamentos HG, LW e SUP foram agrupados para representar o comportamento 'amamentação'. Os comportamentos A e RA também foram agrupados.

Todos os dados foram registrados em uma planilha padrão.

RATA: _____ HG - High crouch (amamentando o dorso bem arqueado) CN - Construção do ninho
 Data do parto: _____ LW - Low crouch (amamentando o dorso pouco arqueado) OFF - Mãe fora do ninho/caixa
 Grupo: _____ SUP - Supine post. (amamentando de lado ou de costas) R - Recolhida de filhotes
 Ninho: _____ L - Lambendo filhotes FFN - Filhotes fora do ninho
 DATA: _____ DIAS PP: _____ HG/L - Amamentando com o dorso bem arqueado e lambendo MN - No ninho sem posição de amamentação

| | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 | 33 | 36 | 39 | 42 | 45 | 48 | 51 | 54 | 57 | 100 | 103 | 106 | 109 | 112 |
|----------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CLARO 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLARO 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLARO 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ESCURO 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

DATA: _____ DIAS PP: _____

| | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 | 33 | 36 | 39 | 42 | 45 | 48 | 51 | 54 | 57 | 100 | 103 | 106 | 109 | 112 |
|----------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CLARO 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLARO 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLARO 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ESCURO 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

HG
 LW
 SUP
 L
 CN
 OFF
 R
 FFN
 HG/L
 MN

3.6 Coleta do Sangue

Após a decapitação dos animais, tendo o sangue troncular sido coletado e centrifugado (3000 rpm/15 min) em tubos heparinizados (heparina 5.000 I.U.), o plasma sanguíneo foi separado e estocado a -70 °C para posterior dosagem de PRL e CORT. A coleta do sangue foi realizada sempre a partir das 19:30h do dia 7 pós-parto, com a carcaça dos animais sendo posteriormente encaminhada ao Biotério Central, segundo o protocolo de descarte.

3.7 Dosagens Hormonais

As concentrações plasmáticas de PRL e de CORT foram dosadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo, com sensibilidade de 0,2 ng/ml em

amostras com duplicata. O procedimento foi realizado na Universidade Federal de Ribeirão Preto, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Celso R. Franci.

3.8 *Expressão dos Resultados*

A quantificação das informações do registro comportamental foi representada levando-se em conta o número de vezes que ocorreu um dado comportamento da rata sobre o total de 100 observações diárias. De posse do registro de cada rata, foi obtida uma média e erro padrão (\pm EPM) por grupo de ratas.

Na dosagem hormonal os valores estão expressos em ng/ml.

3.9 *Análise Estatística*

Foram considerados apenas os níveis hormonais no dia 7 do pós-parto. Quanto ao registro do comportamento maternal, a análise estatística levou em conta também apenas o dia 7, já que no contexto do desenho experimental este foi o último dia de estresse crônico e também o dia do estresse agudo.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de 2 vias e teste *t* de Student e de Dunnett, quando necessário. Ao verificar-se diferença entre grupos foi realizada análise *post hoc* pelo teste de comparações múltiplas *Student Newman-Keuls*.

Para todos os cálculos foi usado o programa estatístico SPSS®, e para a representação em gráficos, o programa Excel-Microsoft®.

Resultados

O efeito do estresse crônico e agudo sobre o comportamento maternal foi considerado apenas no dia 7 da lactação, quando também foram coletadas amostras de sangue para dosagem da PRL e da CORT. Os resultados com ou sem o antagonista foram os seguintes:

Concentração de Prolactina Plasmática

Na comparação entre os dois tipos de estresse e o grupo controle, o teste de *Dunnnett* verificou uma redução significativa dos níveis plasmáticos de PRL no grupo de estresse crônico em relação ao controle ($P < 0,05$; fig. 1). No experimento com estresse crônico (fig. 2), pelo teste ANOVA 2 vias, verificou-se que as ratas que receberam estresse mostraram apenas uma tendência de redução da PRL em relação ao grupo controle [$F(1,39) = 0.113$, $P = 0,74$]; nas ratas estressadas que foram previamente tratadas com losartan, houve uma interação entre os dois tratamentos [$F(1,39) = 7.134$, $P < 0,05$]; esta interação levou a uma diferença significativa entre o grupo em questão e o que recebeu apenas o estresse. Assim, além de prevenir a tendência de redução estresse-induzida da PRL, o losartan, em sua interação com o estresse, tornou o grupo significativamente diferente do grupo estresse, mas igual ao grupo controle.

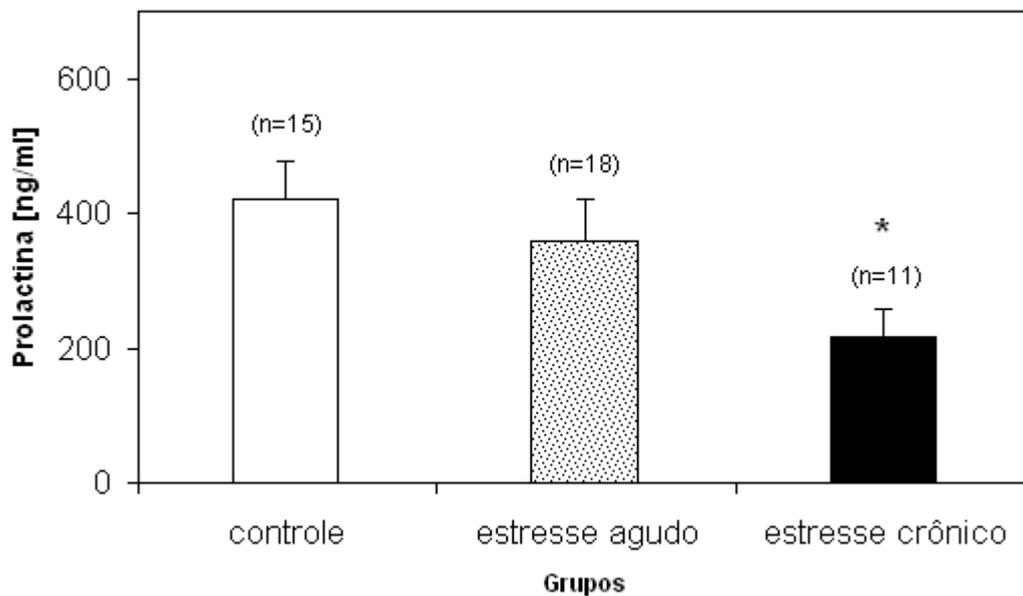


Fig. 1. Comparação dos efeitos do estresse agudo e crônico sobre os níveis plasmáticos de PRL de lactantes. Os valores são expressos como média \pm EPM. O teste de comparações múltiplas de *Dunnnett* mostrou uma diferença significativa entre os grupos controle e estresse crônico ($P < 0,05$).

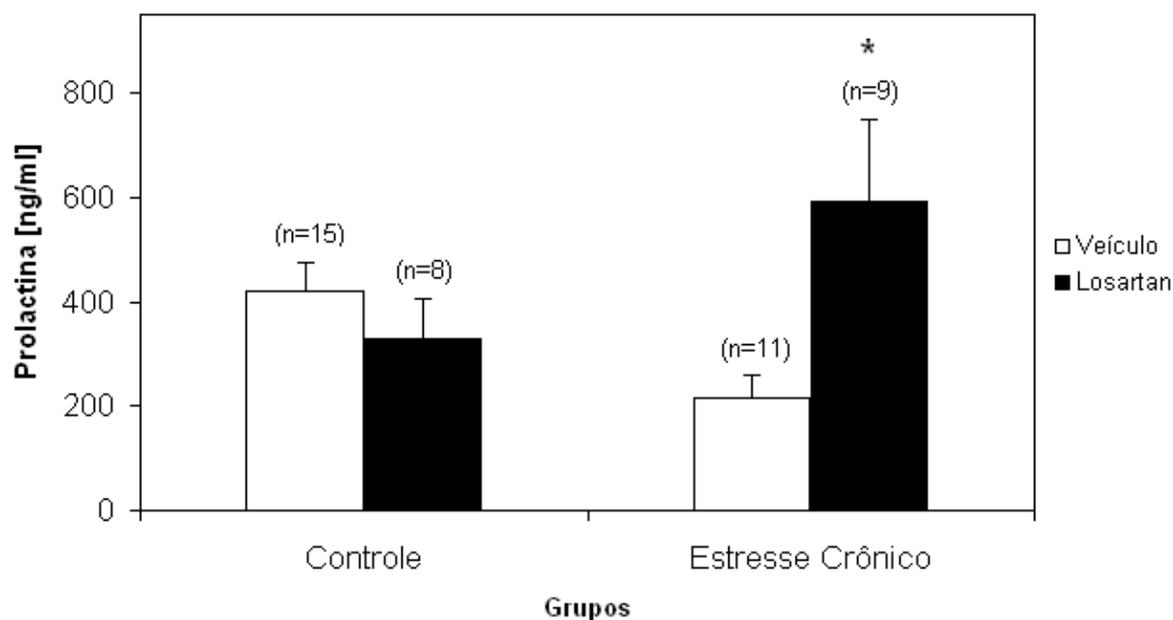


Fig. 2. Efeitos da administração de losartan e estresse crônico sobre a PRL plasmática de ratas lactantes. Os valores são expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, sendo verificada uma interação entre losartan e estresse [$F(1,39) = 7.134, P < 0,05$], com o teste *post hoc* revelando uma diferença significativa entre os grupos Estresse e Estresse+losartan. A tendência de redução da PRL decorrente do estresse crônico [$F(1,39) = 0.113, P = 0,739$] é prevenida nas ratas que receberam previamente losartan.

Concentração de Corticosterona Plasmática

A ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos do losartan [$F(1,42)= 16.576$, $P<0,001$], do estresse crônico [$F(1,42)= 28.148$, $P<0,001$] e uma interação entre estresse crônico e losartan [$F(1,42)= 13.848$, $P<0,01$]. A análise *post hoc* indicou que o grupo Estresse crônico + losartan é diferente dos demais. Os dados são expressos na figura 3.

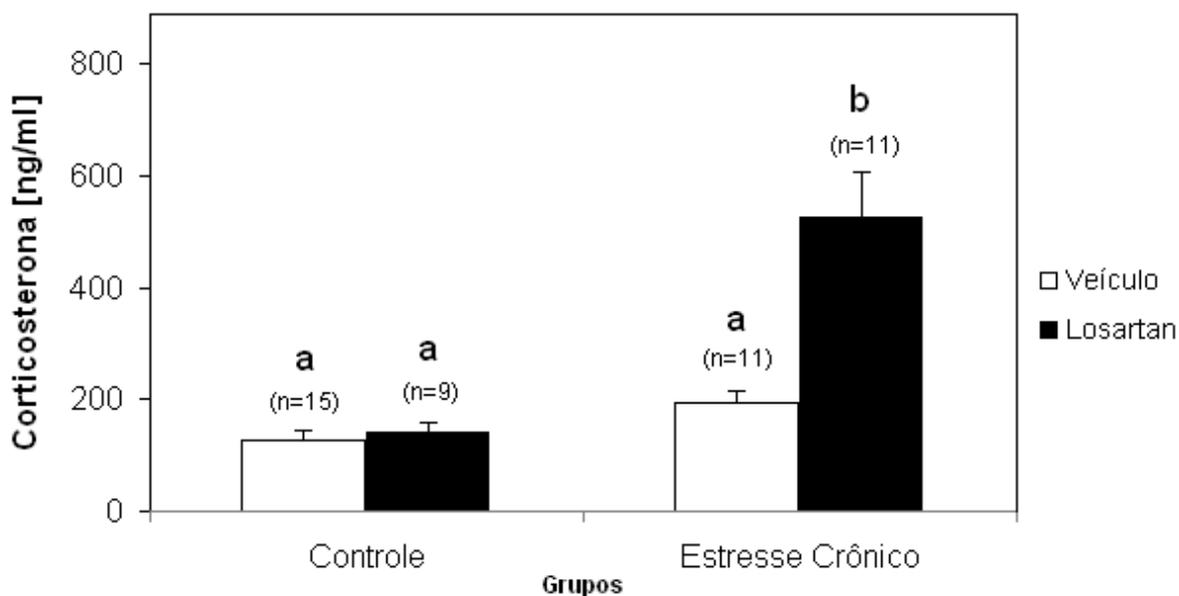


Fig. 3. Efeitos da administração de losartan e estresse crônico sobre a Corticosterona plasmática de ratos lactantes. Os valores são expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, sendo verificado um efeito do losartan [$F(1,42)= 16.576$, $P<0,001$], do estresse crônico [$F(1,42)= 28.148$, $P<0,001$] e uma interação entre losartan e estresse crônico [$F(1,42)= 13.848$, $P<0,01$]. A análise *post hoc* revelou uma diferença significativa entre o grupo Estresse+losartan e todos os demais. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos.

Comportamento maternal

No experimento de estresse **crônico** o registro do comportamento maternal no dia 7 pós-parto:

◇ não mostrou diferenças significativas entre grupos para os comportamentos:

A+RA (fig. 4; ingestão de água e ração),

L (fig. 5; lambida de filhotes),

R (fig. 6; recolhimento de filhotes),

MN (fig. 7; mãe no ninho, sem postura de amamentação), e

HG/L (fig. 8; dorso muito arqueado e lambida de filhotes).

◇ mostrou diferença significativa entre grupos para os comportamentos:

OFF (fig. 9; mãe fora do ninho; *efeito do losartan aumentando a frequência do comportamento* [$F(1,38)= 10.0970, P<0,01$]),

CN (fig. 10; construção do ninho; *efeito do losartan diminuindo a frequência do comportamento* [$F(1,38)= 5.7736, P<0,05$]), e,

amamentação, o losartan reduziu a frequência do comportamento (fig. 11; $P<0,01$). O estresse crônico não afetou a amamentação dos filhotes.

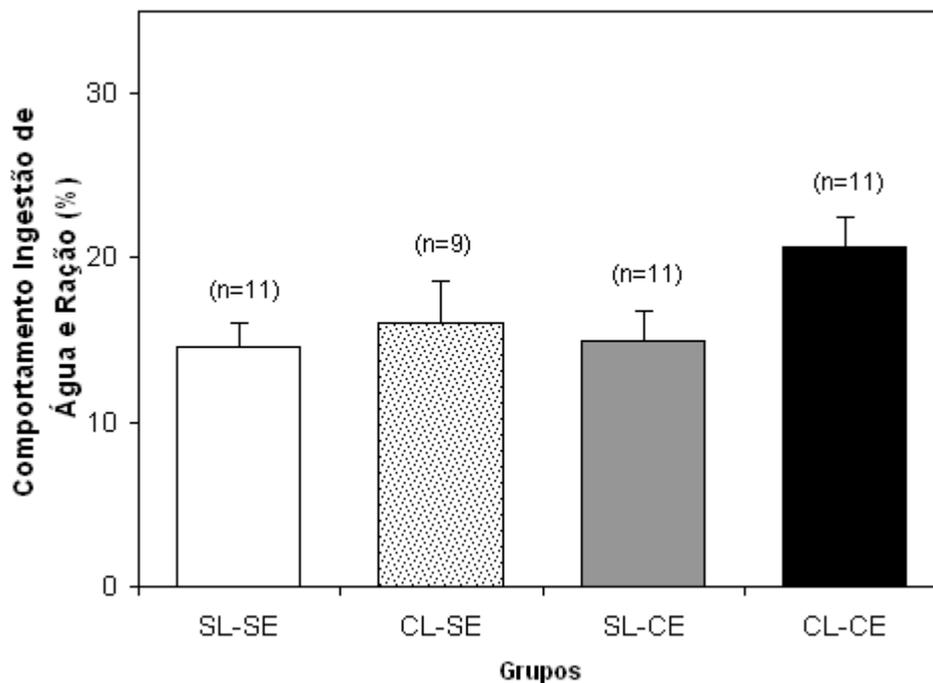


Fig. 4. Frequência do comportamento ingestão de água e ração (ARA) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

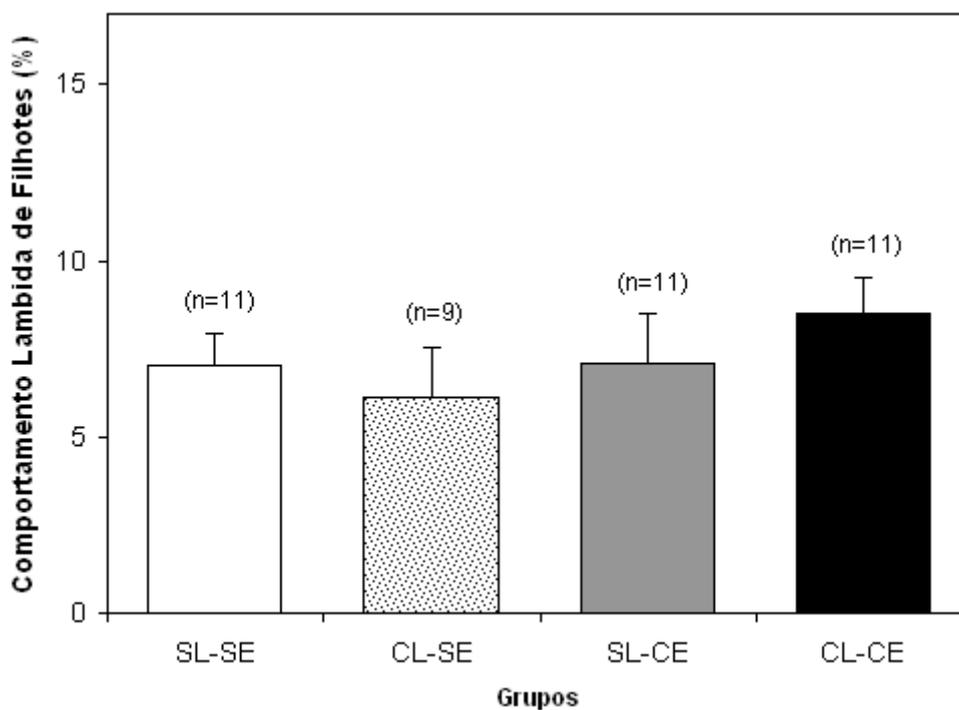


Fig. 5. Frequência do comportamento lambida de filhotes (L) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

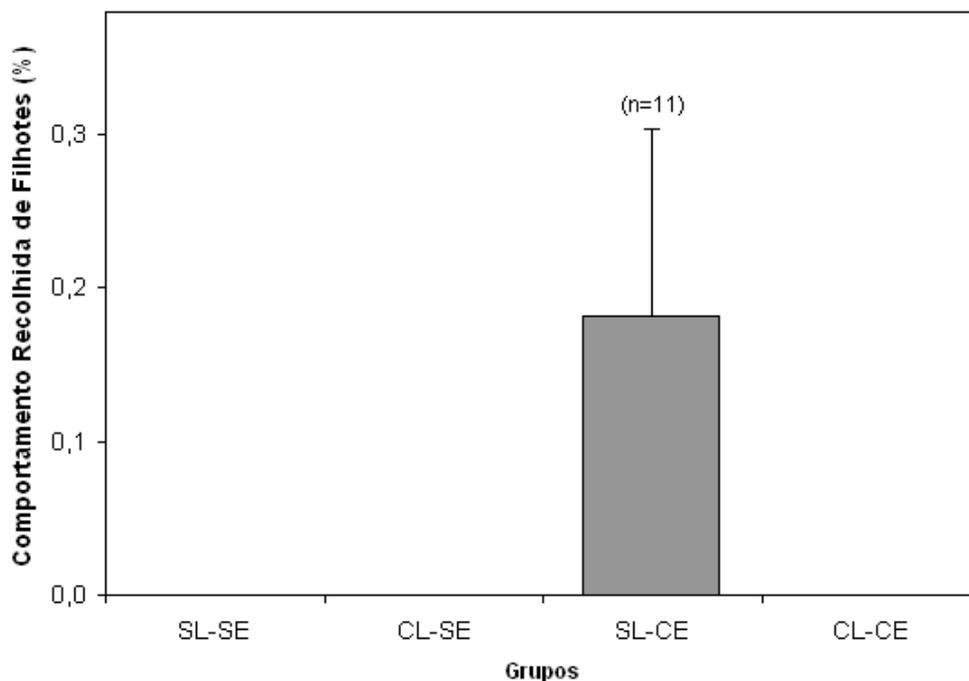


Fig. 6. Frequência do comportamento recolhida de filhotes (R) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. Nos grupos em que não aparece barra, não houve o comportamento. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

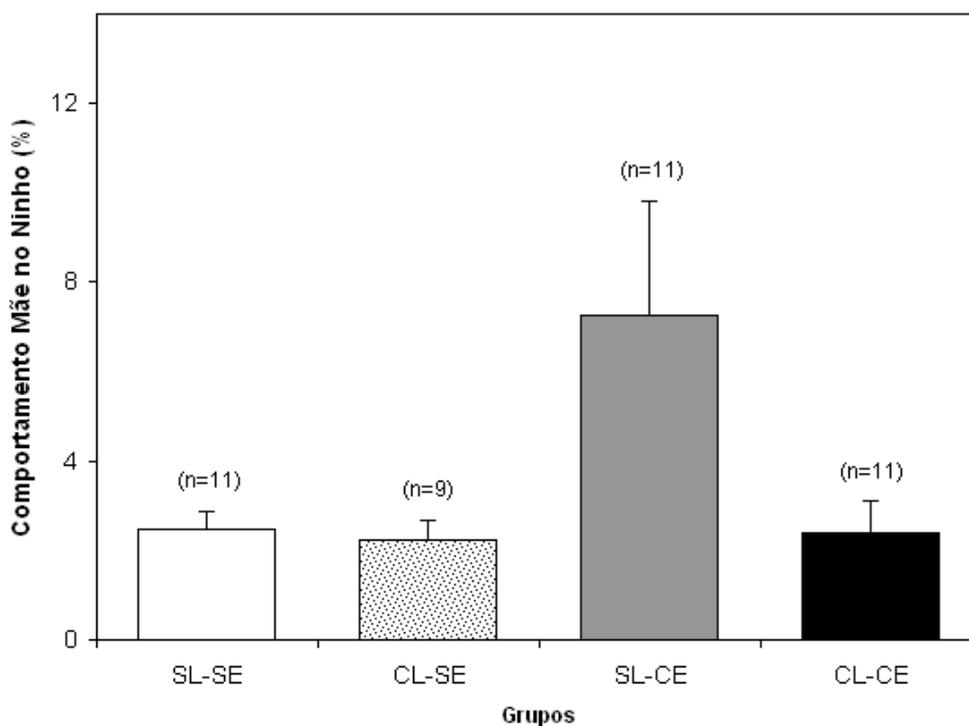


Fig. 7. Frequência do comportamento mãe no ninho (MN) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

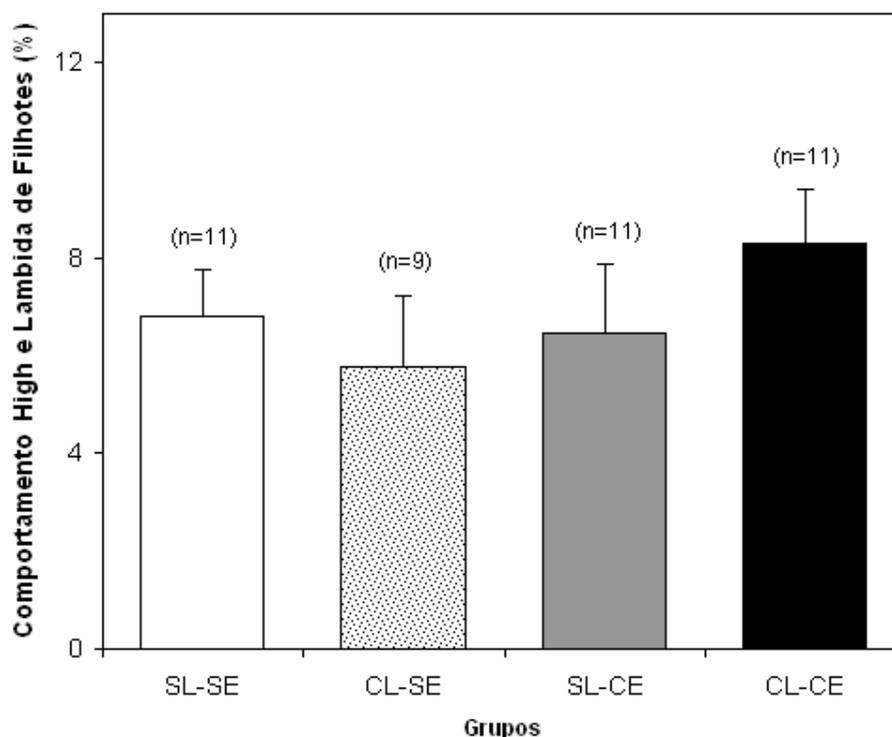


Fig. 8. Frequência do comportamento High (amamentação com dorso bem arqueado) e lambida de filhotes (HG/L) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

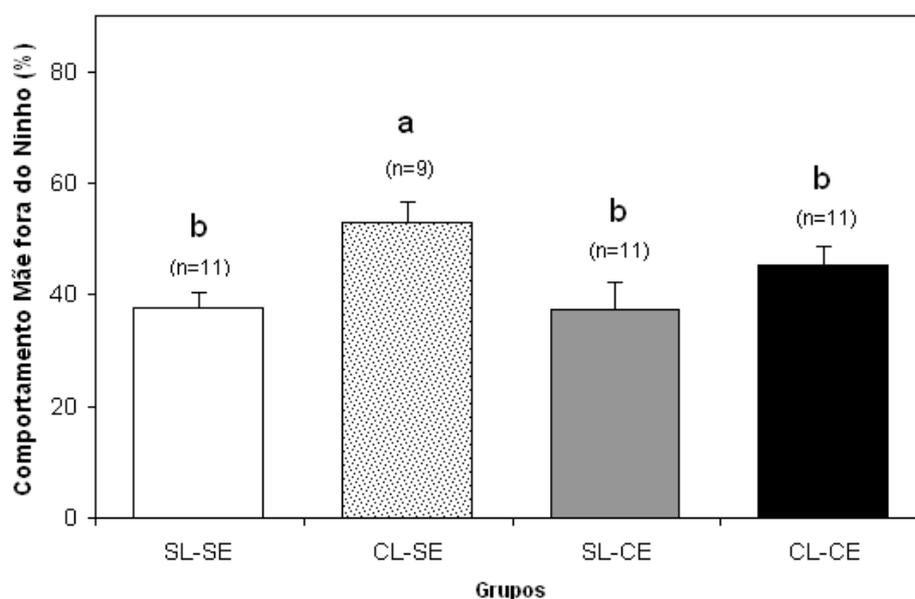


Fig. 9. Frequência do comportamento de mãe fora do ninho (OFF) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Entre os fatores considerados, a administração individual de losartan [$F(1,38)=10.0970$, $P<0,01$] levou a uma maior frequência do comportamento OFF nas lactantes. Não houve efeito do estresse crônico alterando o comportamento. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos.

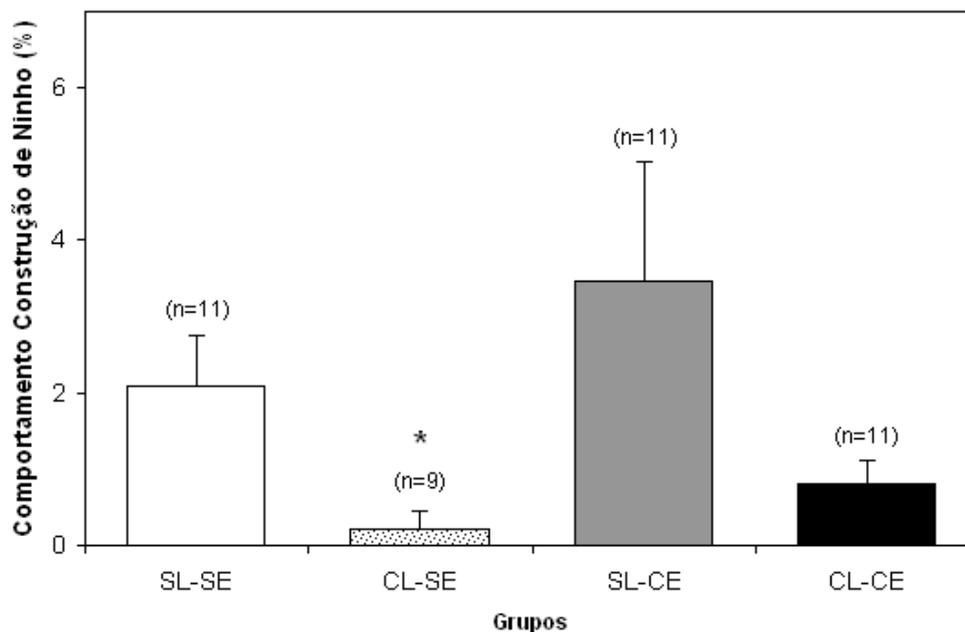


Fig. 10. Frequência do comportamento de construção de ninho (CN) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Entre os fatores considerados, a administração individual de losartan [$F(1,38)=5.7736$, $P<0,05$] levou a uma diminuição da frequência do comportamento CN nas ratas. O estresse crônico não alterou o comportamento. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

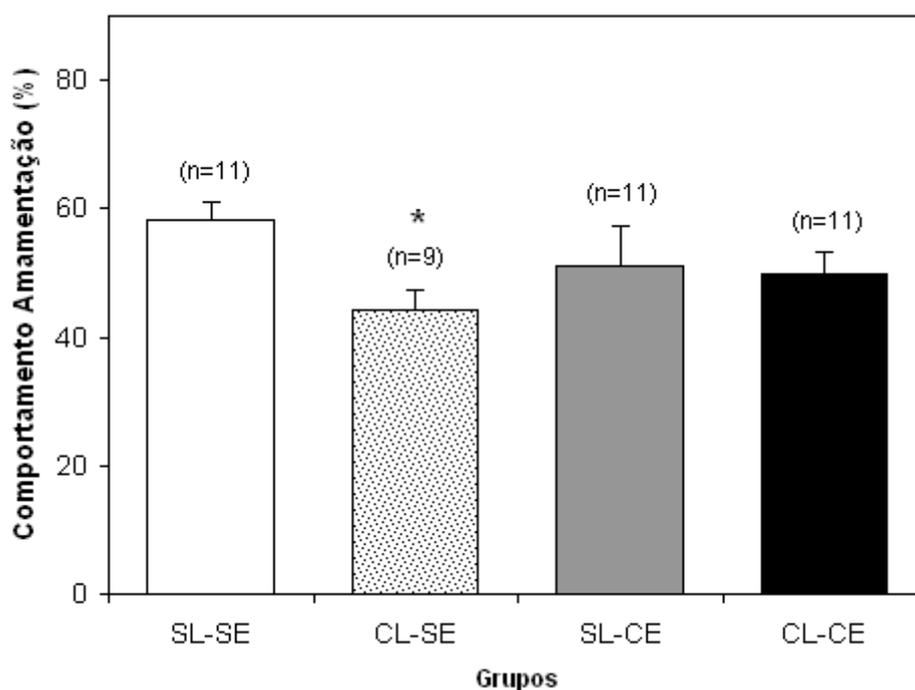


Fig. 11. Frequência da amamentação de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. A administração de losartan levou a uma redução da amamentação ($P<0,01$) de lactantes em relação ao grupo controle. O estresse crônico não afetou o comportamento. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Crônico; CE= Com Estresse Crônico.

Quando o estresse aplicado foi **agudo** (somente no dia 7 pós-parto):

◇ não houve diferenças significativas entre grupos para os comportamentos:

A+RA (fig. 12; ingestão de água e ração),

L (fig. 13; lambida de filhotes),

R (fig. 14; recolhimento de filhotes),

MN (fig. 15; mãe no ninho, sem postura de amamentação), e

HG/L (fig. 16; dorso muito arqueado e lambida de filhotes).

◇ houve diferença significativa entre grupos para os comportamentos:

OFF (fig. 17; houve uma interação entre losartan e estresse [$F(1,37)= 20.9856$, $P<0,001$], e esse grupo é significativamente diferente do grupo com estresse, comportando-se como o controle; o estresse agudo aumentou a frequência deste comportamento ($P<0,05$), assim como o losartan ($P<0,01$), tornando esses dois últimos grupos significativamente diferentes do grupo controle),

CN (fig. 18; *houve efeito do losartan diminuindo a frequência do comportamento* [$F(1,37)= 4.7603$, $P<0,05$]) em relação ao controle; não houve efeito do estresse agudo no comportamento [$F(1,37)= 0.9854$, $P>0,05$]), e,

amamentação (fig. 19; houve uma interação entre losartan e estresse: *quando essas variáveis são somadas, o grupo em questão se comporta de modo semelhante ao controle*). O estresse agudo interfere na amamentação ($P<0,05$), assim como o losartan ($P<0,01$).

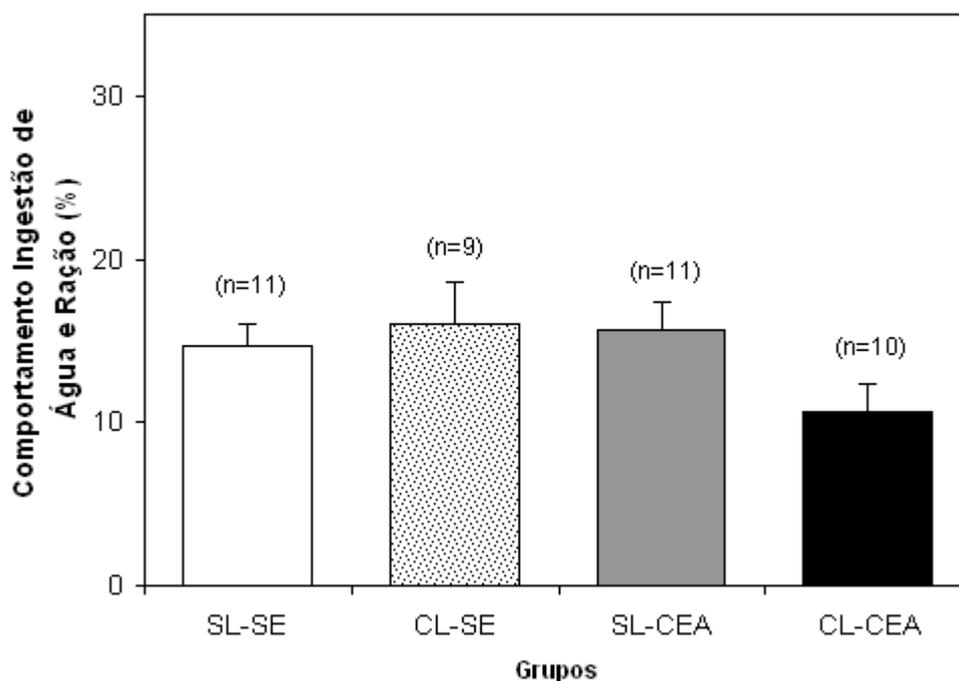


Fig. 12. Frequência do comportamento ingestão de água e ração (ARA) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Agudo; CEA= Com Estresse Agudo.

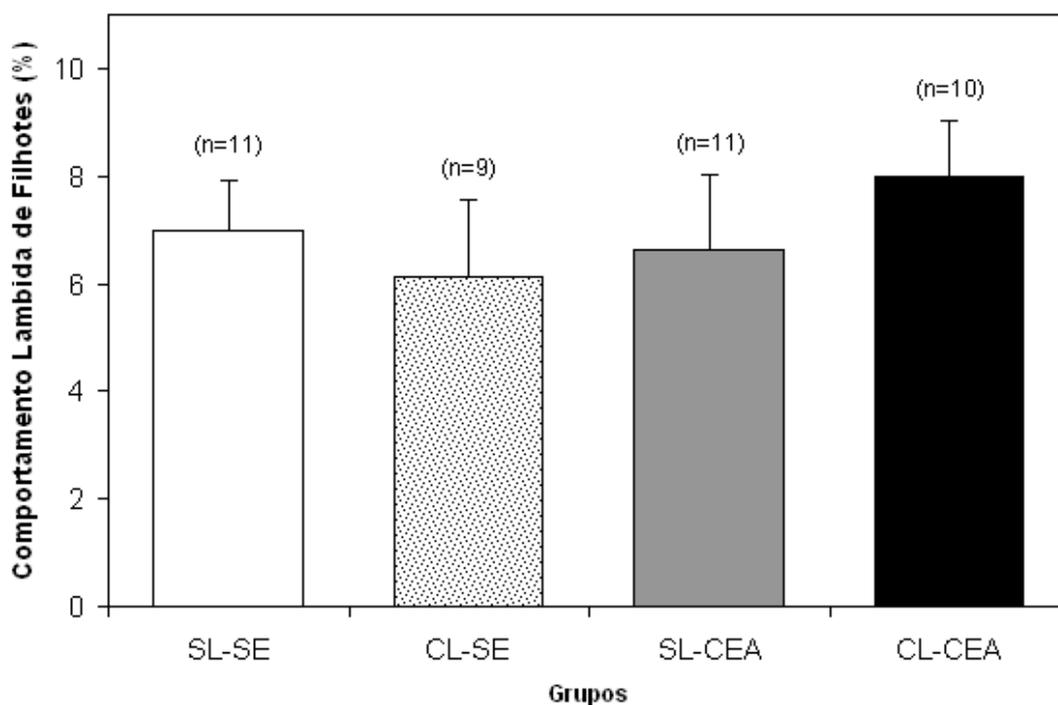


Fig. 13. Frequência do comportamento lambida de filhotes (L) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem Estresse Agudo; CEA= Com Estresse Agudo.

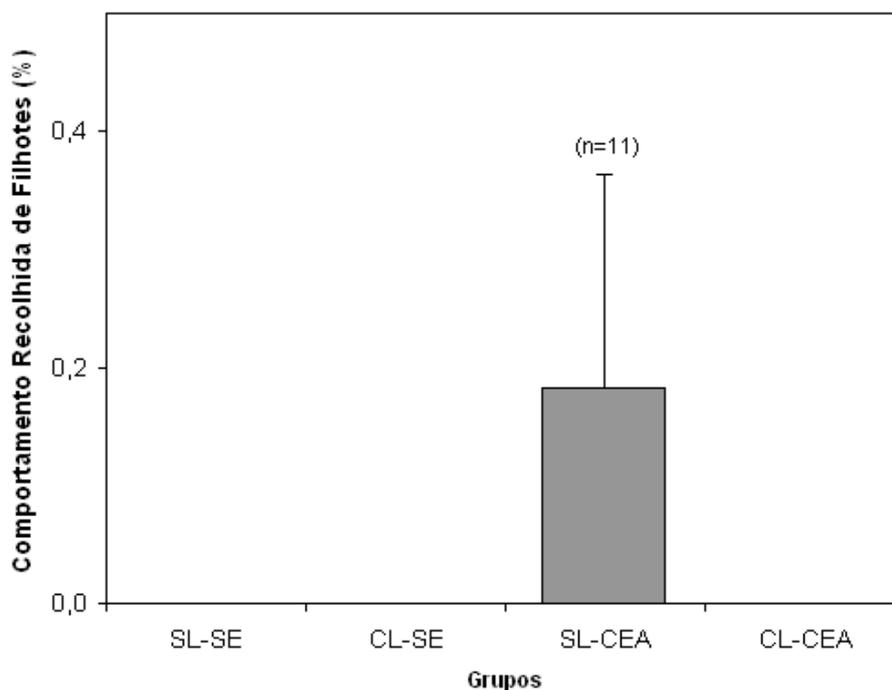


Fig. 14. Frequência do comportamento recolhida de filhotes (R) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. Nos grupos em que não aparece barra, não houve o comportamento. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem estresse agudo; CEA= Com estresse Agudo.

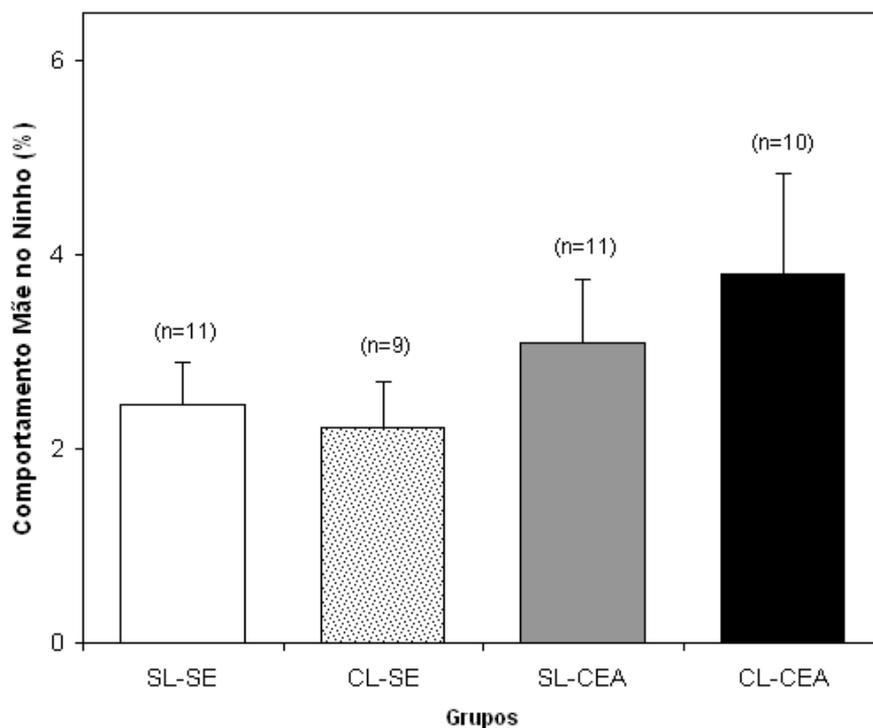


Fig. 15. Frequência do comportamento mãe no ninho (MN) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem estresse agudo; CEA= Com estresse agudo.

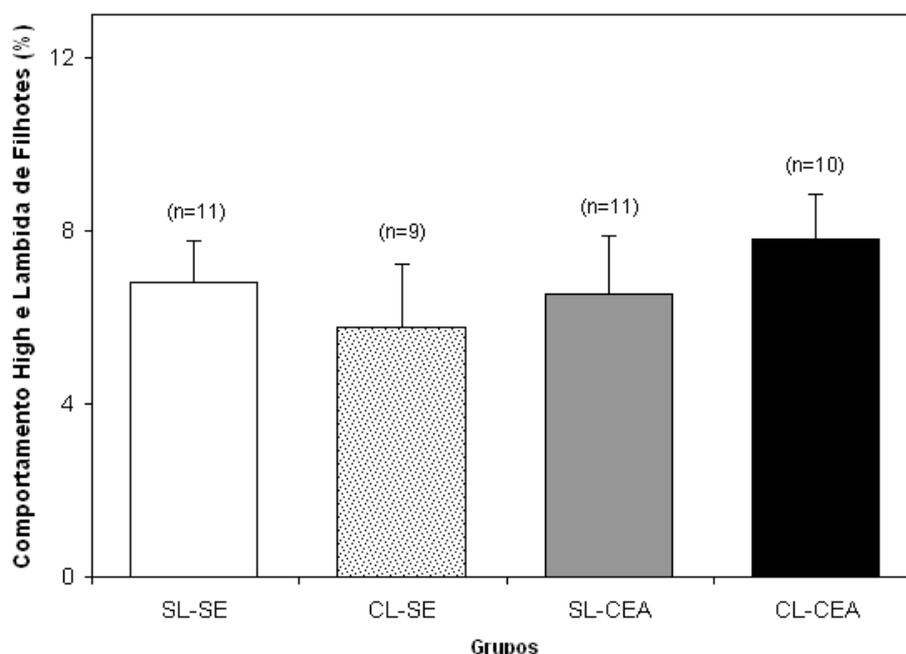


Fig. 16. Frequência do comportamento High (amamentação com dorso bem arqueado) e lambida de filhotes (HG/L) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, não sendo verificado efeito significativo dos tratamentos. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem estresse agudo; CEA= Com estresse agudo.

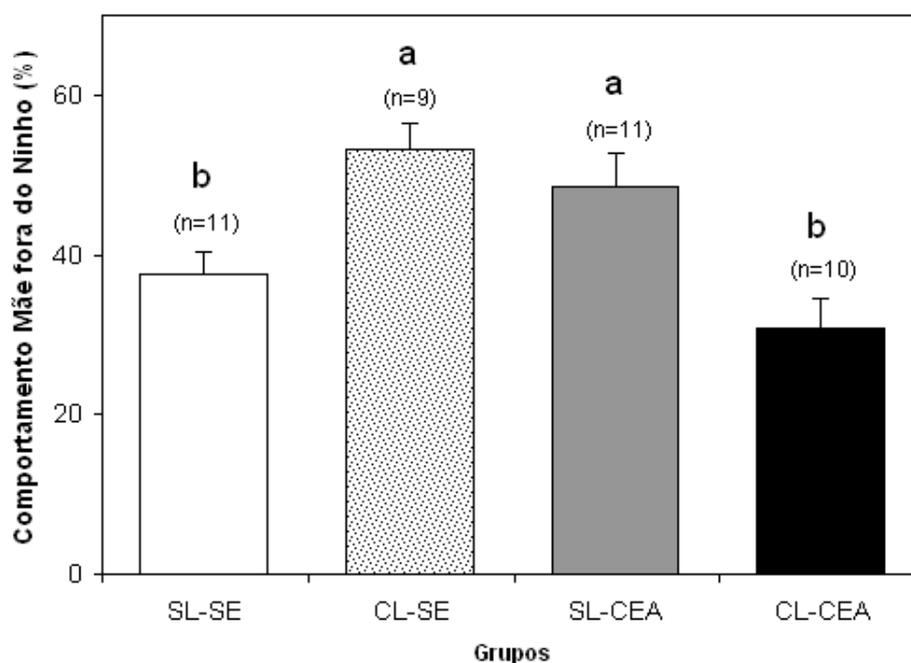


Fig. 17. Frequência do comportamento de mãe fora do ninho (OFF) de ratas lactantes; média \pm EPM. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Houve uma interação significativa entre losartan e estresse agudo [$F(1,37) = 20.9856$, $P < 0,001$]. Em relação ao controle, o estresse agudo afetou o comportamento ($P < 0,05$), assim como o losartan ($P < 0,01$). SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem estresse; CEA= Com estresse agudo. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos.

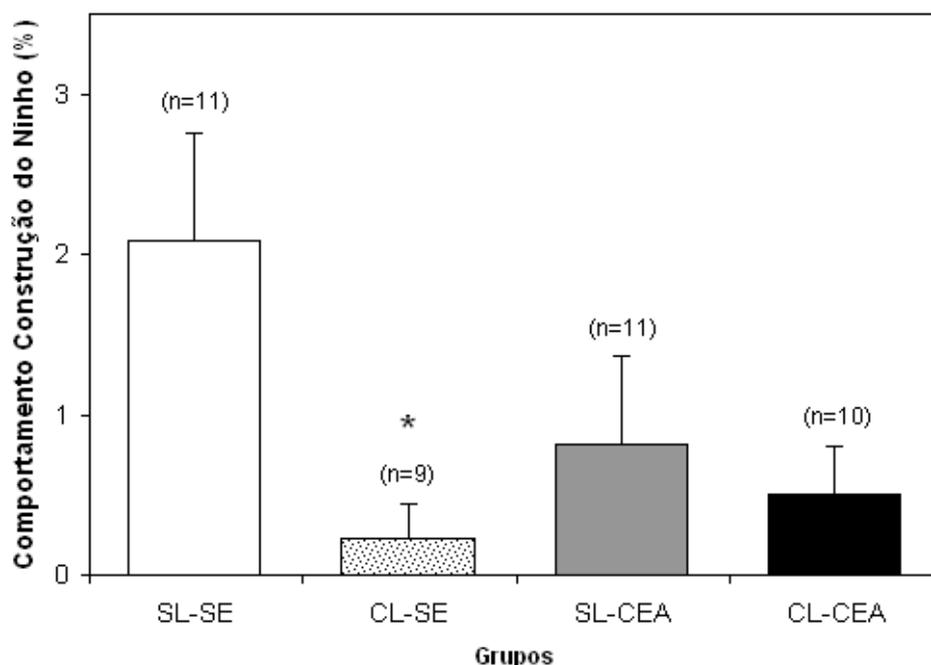


Fig. 18. Frequência do comportamento de construção do ninho (CN) de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Houve somente um efeito do losartan reduzindo a frequência do comportamento [$F(1,37) = 4.7603$, $P < 0,05$], em relação ao controle. SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem estresse agudo; CEA= Com estresse agudo.

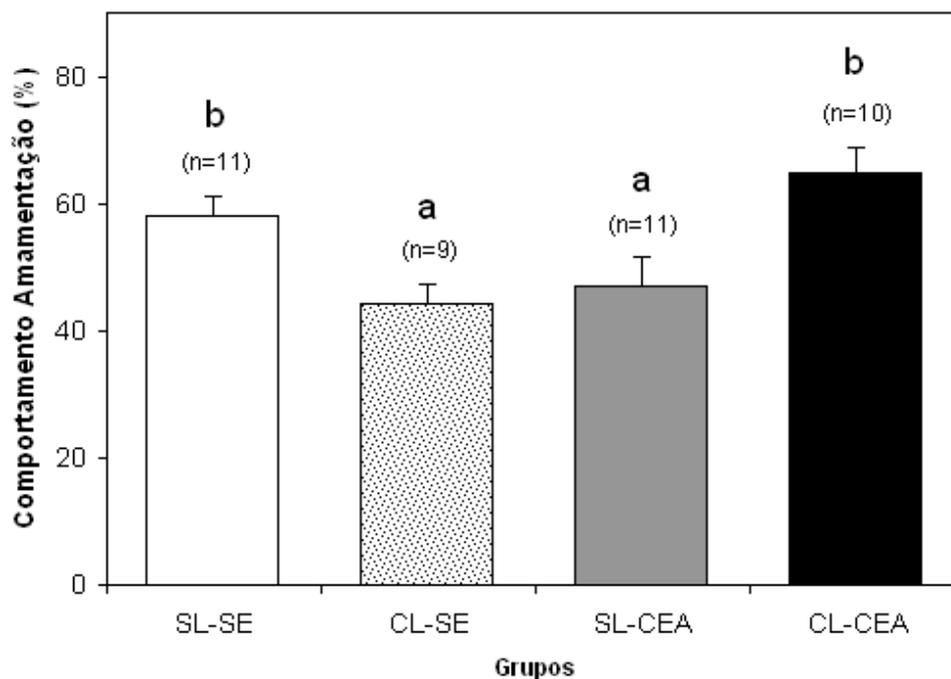


Fig. 19. Frequência da amamentação de ratas lactantes. Os valores são expressos como percentual do total de 100 observações diárias; média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Houve uma interação entre estresse agudo e losartan: quando os dois fatores são somados, o grupo em questão se comporta de modo semelhante ao controle. O estresse agudo interfere na amamentação ($P < 0,05$) em relação ao controle, assim como o losartan ($P < 0,01$). SL= Sem losartan; CL= Com losartan; SE= Sem estresse agudo; CEA= Com estresse agudo. Letras diferentes indicam diferenças entre grupos.

Discussão

No estudo com ratas tem se considerado a participação de diversos hormônios nos modelos neurais propostos para esclarecer as vias envolvidas na motivação maternal. Os hormônios seriam importantes no processo de modulação e configuração da circuitaria encefálica, levando a rata de um estado de negligência e aversão aos filhotes — um comportamento típico de não lactantes — a uma condição de receptividade e cuidado maternal no decurso dos primeiros dias do pós-parto. No seu conjunto, os hormônios não seriam importantes apenas para deflagrar o comportamento maternal, mas também para efetuar seu ajuste fino ao longo dos dias.

Verificamos a partir dos nossos experimentos que se por um lado o estresse crônico por contenção em lactantes não interferiu em quaisquer dos parâmetros comportamentais considerados, o mesmo não ocorreu após a administração crônica de losartan; isto é, o antagonista alterou significativamente alguns dos comportamentos de cuidado maternal, mesmo nos animais do grupo controle. Além disso, isoladamente, o estresse crônico não interferiu na PRL e na CORT plasmáticas a ponto de tornar os respectivos grupos significativamente diferentes dos seus controles. Porém ao realizar-se uma análise estatística complementar envolvendo ratas que receberam estresse agudo, houve uma diferença significativa na PRL plasmática do grupo de estresse crônico em relação aos grupos estresse agudo e controle.

A ANG II basal parece influenciar o comportamento de amamentação da lactante e alguns comportamentos pró-ativos, já que o bloqueio sistêmico e central dos efeitos do hormônio pela administração crônica de Losartan aumentou

significativamente o tempo de permanência da mãe fora do ninho (fig. 9), reduziu a frequência da construção do ninho (fig. 10) e da amamentação (fig. 11) nos animais do grupo controle, sem estresse.

A MPOA, um dos componentes centrais do comportamento pró-ativo, é sensível a ANG II (SIRETT *et al.*, 1977), provavelmente a ANG II originada no Sistema Renina-Angiotensina central. Assim, o bloqueio desses receptores poderia interferir diretamente na ação do hormônio sobre a responsividade maternal. Em adição, a MPOA, o VP e o NA são estruturas envolvidas no comportamento maternal (NUMAN *et al.*, 2005) que recebem projeções dopaminérgicas; a ação da DA sobre receptores D₁ no NA ou na MPOA está implicada no início e na manutenção do comportamento maternal (MILLER & LONSTEIN, 2005; SERVICE & WOODSIDE, 2007; STOLZENBERG *et al.*, 2007; SERVICE & WOODSIDE, 2006). Ao contrário do VP e do NA, estruturas que recebem DA do sistema mesolímbico, a MPOA é sensível à DA liberada por neurônios do diencéfalo (WAGNER *et al.*, 1995); as projeções dopaminérgicas à MPOA têm diferentes origens, incluindo células liberadoras de DA no hipotálamo ou próximo a ele (MILLER & LONSTEIN, 2009).

Por outro lado, a ANG II pode aumentar através dos receptores AT₁ a liberação de DA nigro-estriatal (BROWN *et al.*, 1996). Intimamente relacionada à síntese de DA (KUMER & VRANA, 1996), a enzima tirosina hidroxilase presente em neurônios hipotalâmicos pode ser modulada pela ANG II (MA *et al.*, 2004). Como existem projeções do sistema dopaminérgico mesolímbico sobre o NA, que é uma região que participa da interação mãe-filhote (SILVA *et al.*, 2003), a ANG II

poderia também atuar sobre os comportamentos ativos da mãe regulando o estímulo dopaminérgico. Considerando todas essas evidências, o déficit no cuidado maternal das ratas em nosso experimento que receberam apenas losartan pode ter resultado parcialmente de uma atenuação do estímulo dopaminérgico sobre as estruturas neurais envolvidas com a responsividade da mãe. Um menor estímulo dopaminérgico poderia ser decorrente da supressão da ação da ANG II mediante o bloqueio crônico dos receptores AT₁. Além do sistema dopaminérgico mesolímbico, projeções dopaminérgicas do ARC, que possui receptores AT₁ (LENKEI *et al.*, 1997), poderiam também fornecer DA ao encéfalo, sendo com isso da mesma forma influenciadas pelo bloqueio do losartan.

A OCT também pode ter um importante papel no mecanismo central do comportamento maternal, pois a administração de um antagonista de receptores de OCT presentes na VTA atenua o cuidado da mãe com os filhotes (PEDERSEN *et al.*, 1994). Além do trato neurohipofisário, que libera OCT na circulação, o PVN emite projeções ocitocinérgicas de neurônios parvocelulares para a região central, além de OCT ser liberada centralmente em grandes quantidades por neurônios magnocelulares (SABATIER *et al.*, 2003). A ANG II exerce uma modulação sobre a OCT a partir do PVN e do núcleo supra-óptico (SON), havendo uma co-localização de receptores AT₁ de ANG II e de receptores de OCT em neurônios parvocelulares no PVN (THOMAS & LEMMER, 2006). Como há uma grande densidade de receptores AT₁ no PVN, e a administração central e periférica de ANG II estimula a liberação de OCT (FERGUSON & KASTING, 1988; LANG *et al.*, 1981), na condição basal a OCT poderia atuar centralmente sobre o comportamento maternal mediando o estímulo angiotensinérgico sobre o PVN.

É provável que a tendência, ainda que não significativa, de redução da PRL do grupo que recebeu apenas losartan (fig. 2), tenha interferido centralmente na circuitaria do cuidado maternal, tendo em vista a presença de receptores para PRL na MPOA (BAKOWSKA & MORRELL, 1997). Assim, o bloqueio crônico dos receptores AT_1 a partir das primeiras horas do pós-parto parece ter atenuado indiretamente os efeitos da OCT, da DA e também da PRL sobre as regiões implicadas no relacionamento da mãe com os seus filhotes.

O trabalho de GAMMIE & STEVENSON (2006) com camundongos mostrou que o estresse crônico não altera quaisquer dos parâmetros de comportamento maternal, ao contrário do estresse agudo, em que ao menos alguns parâmetros são afetados. Os resultados do presente estudo com ratas apontam na mesma direção, já que o estresse crônico não afetou nenhum dos comportamentos passivos e pró-ativos de cuidado dos filhotes pela mãe. Houve possivelmente uma habituação da mãe ao estresse crônico, tendo em vista que foi aplicado apenas um paradigma de estresse, obedecendo sempre o mesmo protocolo de horário. Posto que, na comparação com ratas virgens estressadas, os níveis atenuados da CORT de lactantes submetidas ao estresse por contenção se correlacionam com uma reduzida atividade c-fos de RNAm na divisão parvocelular do PVN e em outras regiões encefálicas (DA COSTA *et al.*, 1996), a habituação da mãe ao estresse crônico pode envolver neuropeptídeos hipotalâmicos.

Se por um lado o grupo de ratas que recebeu apenas losartan se manteve mais tempo fora do ninho, com redução do seu comportamento maternal, por outro, as ratas que receberam losartan e foram em seguida estressadas cronicamente não diferiram em seu comportamento nem do grupo controle nem do grupo que recebeu apenas o estresse. No estresse ocorre uma maior liberação de ANG II periférica e central (YANG *et al.*, 1993); com isso, o bloqueio dos receptores AT₁ pelo losartan pode ter sido suficiente para impedir tão-somente os efeitos basais da ANG II sobre o comportamento maternal. As concentrações de ANG II mais elevadas nas ratas estressadas poderiam talvez compensar a ausência de efeitos da Ang II basal, explicando por que as ratas do grupo Losartan + estresse crônico se comportaram como o grupo controle e como o grupo estressado sem losartan.

No experimento de ratas lactantes submetidas ao estresse agudo, o efeito do estresse em levar a uma redução significativa da frequência da amamentação (fig. 19) e a uma maior permanência da mãe fora do ninho (fig. 17) mostrou-se parecido com a alteração comportamental no grupo de ratas que recebeu apenas losartan. Em vista disso, pode-se lançar a hipótese de que no grupo com estresse agudo houve uma redução da atividade basal da Ang II sobre o comportamento maternal. Em relação ao controle, ratas estressadas agudamente não teriam sofrido habituação, tal como poderia ter ocorrido nas ratas que receberam o estresse crônico.

Ratas que receberam apenas losartan tiveram uma tendência de redução da PRL plasmática em relação ao grupo controle (fig. 2). Isso se deve

provavelmente ao bloqueio crônico dos receptores AT₁ presentes nos lactotrofos adenohipofisários. Conforme TSUTSUMI & SAAVEDRA (1991), todos os receptores de ANG II na adenohipófise são do subtipo AT₁. Além disso, a ANG II estimula paracrinamente a secreção de PRL (AGUILERA *et al.*, 1982). Portanto a administração crônica do antagonista poderia levar a uma perda da modulação basal desempenhada pela ANG II sobre os lactotrofos (DENEFF *et al.*, 1986), com o consequente declínio na secreção de PRL.

A ANG II liberada no estresse é um potente estimulador da PRL, tanto para a sua secreção (SCHRAMME & DENEFF, 1983) como para a sua regulação no nível hipotalâmico e hipofisário (SAAVEDRA, 1992; STEELE, 1992; AGUILERA *et al.*, 1982; SCHRAMME & DENEFF, 1983). A resposta da PRL mediante a aplicação de estresse em ratas lactantes é diferente daquela em ratas não lactantes, pois o período da lactação envolve mudanças fisiológicas no eixo HPA da rata, isto é, o estresse não eleva a PRL plasmática nas lactantes (HIGUCHI *et al.*, 1989; KEHOE *et al.*, 1991), podendo mesmo levar à sua redução (DONADIO *et al.*, 2004). No presente estudo, verificamos que em lactantes submetidas ao estresse agudo os níveis plasmáticos de PRL não foram significativamente diferentes do grupo controle (fig. 1). Como o protocolo experimental impunha o registro comportamental entre a aplicação do estresse e a coleta de sangue para dosagem hormonal, é provável que a PRL plasmática das mães tenha retornado ao seu nível basal quando a rata esteve na caixa junto de seus filhotes no decurso das cerca de 10 horas entre o término do estresse e a decapitação. Nos trabalhos referidos acima, a coleta de sangue era realizada durante ou imediatamente após o estresse. Além disso, na comparação com a resposta da

CORT, que é tardia e prolongada, a PRL apresenta pico de concentração plasmática entre 2 e 5 minutos após o estresse por éter, havendo no espaço de 5 minutos um retorno às suas concentrações basais (WAKABAYASHI *et al.*, 1971).

Em nossos experimentos houve uma interação significativa entre losartan e estresse crônico, levando a PRL a altos níveis plasmáticos no grupo em questão (fig. 2). Esse grupo recebeu losartan a partir da primeira noite do pós-parto, ao passo que o estresse crônico foi inicialmente aplicado na manhã do dia seguinte (dia 1 pós-parto). Não obstante o bloqueio central e sistêmico dos receptores AT₁ pelo losartan levar a uma tendência de redução da PRL, conforme o grupo que recebeu apenas losartan, a elevação marcante da PRL no grupo Losartan + estresse crônico teve como possível estímulo os altos níveis de ANG II plasmática decorrentes do estresse, mediando a ação de fatores de liberação de PRL. Podemos propor a hipótese de que os altos níveis de PRL desse grupo decorrem da perda de modulação por *feedback* desempenhada pela DA sobre a PRL. A elevação sérica de PRL aumenta a síntese de DA (DEMAREST *et al.*, 1981) e sua concentração na circulação do sistema portahipofisário (GUDELSKY & PORTER, 1980), porém com o bloqueio dos receptores AT₁, poderia haver uma perda da regulação basal da ANG II do efeito inibitório tônico do sistema dopaminérgico sobre a PRL.

A maior parte dos estudos que investigam os efeitos do estresse sobre os níveis de PRL de lactantes trabalha com o modelo de estresse agudo. No presente experimento, o estresse crônico levou a uma aparente redução da PRL plasmática (fig. 2) — o teste de ANOVA não detectou diferença significativa na

PRL desse grupo em relação ao controle. Porém uma comparação entre o grupo de estresse crônico e os grupos estresse agudo e controle (fig. 1) apontou um efeito diferenciado do estresse crônico, com a PRL plasmática deste grupo se mostrando significativamente reduzida em relação ao controle. Como nos dois grupos tratamentos (estresse agudo e crônico) o horário do estresse e da coleta de sangue era o mesmo (isto é, mesmo intervalo de tempo da mãe junto dos filhotes após o estresse e antes da coleta de sangue para dosagem plasmática), é possível que nas ratas cronicamente estressadas tenha havido uma adaptação do sistema HPA. Tendo em vista que até o presente os estudos dos efeitos da contenção sobre o sistema TIDA de lactantes têm considerado apenas o estresse agudo, precisa ser ainda esclarecido se no estresse crônico a tendência de redução da PRL também poderia envolver esse sistema.

Ratas lactantes apresentam níveis de CORT basal mais elevados do que não lactantes. Ao menos em parte, isso pode ser atribuído ao estímulo dos filhotes na mãe; a sucção é um estímulo persistente sobre o sistema adrenocortical das ratas, promovendo um rápido aumento na secreção de ACTH e de CORT (Walker *et al.*, 1992). No presente trabalho, não houve diferença significativa na CORT plasmática de ratas que receberam estresse crônico por contenção em relação ao controle (fig. 3), o que condiz com os resultados de outros trabalhos (LIGHTMANN & YOUNG, 1989; STERN *et al.*, 1973; THOMAN *et al.*, 1970), isto é, que o eixo HPA das ratas lactantes apresenta baixa responsividade a diferentes modelos de estresse, além de uma menor liberação de CORT. No grupo que recebeu apenas losartan, a administração crônica do antagonista não elevou significativamente a CORT plasmática. Por outro lado, no

grupo que recebeu losartan e foi então a partir do dia seguinte submetido ao estresse crônico, houve uma interação significativa entre os dois fatores, o que fez com que o hormônio alcançasse níveis muito altos.

Conclusão

Podemos concluir a partir dos experimentos realizados que a ANG II basal possivelmente modula, mediante os receptores AT₁, o comportamento maternal de forma direta e indireta. Os resultados sugerem que esses receptores podem estar envolvidos na complexa modulação do comportamento pró-ativo da mãe na amamentação dos filhotes. Além disso, a ANG II basal parece interferir nas concentrações basais de PRL e de outros hormônios, como provavelmente a OCT. Esses hormônios podem configurar as ligações sinápticas entre os neurônios hipotalâmicos responsáveis pela transdução de estímulos endógenos na mãe e nociceptivos externos dos filhotes em sinais que levam à responsividade motora e cognitiva do cuidado maternal. Por fim, os resultados inéditos do presente experimento dos efeitos da administração de losartan sobre o comportamento da rata lactante podem estimular o desenvolvimento de novas pesquisas que busquem esclarecer melhor o uso do losartan, pelo seu efeito antihipertensivo, tendo em vista suas interferências sobre o cuidado maternal.

Referências Bibliográficas

AGUILERA, G.; HYDE, C.L. & CATT, K.J. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology* 111(4): 1045–50, 1982.

AGUILERA, G.; KISS, A. & LUO, X. Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *Journal of Neuroendocrinology* 7(10): 775–783, 1995.

AUGUSTINE, R.A.; KOKAY, I.C.; ANDREWS, Z.B.; LADYMAN, S.R. & GRATTAN, D.R. Quantitation of prolactin receptor mRNA in the maternal rat brain during pregnancy and lactation. *Journal of Molecular Endocrinology* 31(1): 221–32, 2003.

BAKOWSKA, J.C. & MORRELL, J.I. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *The Journal of Comparative Neurology* 386(2): 161–77, 1997

BÁNKY, Z.; NAGY, G.M. & HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology* 59(1): 63–71, 1994.

BRIDGES, R.S. Endocrine regulation of parental behavior in rodents. In: N.A. KRASNEGOR e R.S. BRIDGES, Editores, *Mammalian parenting*, Oxford University Press, Oxford 93–117, 1990.

BRIDGES, R.S.; DIBIASE, R.; LOUNDES, D.D. & DOHERTY, P.C. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science (New York, N.Y.)* 227(4688): 782–4, 1985.

- BRIDGES, R.S.; NUMAN, M.; RONSHEIM, P.M.; MANN, P.E. & LUPINI, C.E. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated nulliparous female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(80): 8003–7, 1990.
- BROWN, D.C.; STEWARD, L.J.; GE, J. & BARNES, N.M. Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology* 118(2): 414-20, 1996.
- CALDWELL, J.D.; GREER, E.R.; JOHNSON, M.F.; PRANGE JR., A.J. & PEDERSEN, C.A. Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic sites in late pregnant and postpartum rats, *Neuroendocrinology* 46(1): 39–47, 1987.
- CALIGARIS, L. & TALEISNIK, S. Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatments, sex and daily rhythm. *Acta Endocrinologica (Copenh.)* 102(4): 505–10, 1983.
- CARTER, D.A. & LIGHTMAN, S.L. Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinaemic rats. *Neuroendocrinology* 46(6): 532–7, 1987.
- CASTRÉN E. & SAAVEDRA J.M. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in the rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology* 122(1): 370–2, 1988.

CHAMPAGNE, F.A.; CHRETIEN, P.; STEVENSON, C.W.; ZHANG, T.Y.; GRATTON, A. & MEANEY, M.J. Variations in nucleus accumbens dopamine is associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society of Neuroscience* 24(17): 4113–23, 2004.

CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A. & MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior* 79(3): 359–71, 2003.

CULMAN, J.; VON HEYER, C.; PIEPENBURG, B.; RASCHER, W. & UNGER, T. Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. *European Journal of Pharmacology* 367(2-3): 255–65, 1999.

DA COSTA, A.P.; MA, X.; INGRAM, C.D.; LIGHTMAN, S.L. & AGUILERA, G. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Research. Molecular Brain Research* 91(1-2): 119–30, 2001.

DA COSTA, A.P.; WOOD, S.; INGRAM, C.D. & LIGHTMAN, S.L. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Research*. 742(1-2): 177–184, 1996.

DEMAREST KT, MCKAY DW, RIEGLE GD, AND MOORE KE. Sexual differences in tuberoinfundibular dopamine nerve activity induced by neonatal androgen exposure. *Neuroendocrinology* 32: 108–113, 1981.

- DEMARIA, J.E.; LERANT, A.A. & FREEMAN, M.E. Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Research* 837(1-2): 236–41, 1999.
- DENEFF, C.; BAES, M. & SCHRAMME, C. Paracrine interactions in the anterior pituitary: role in the regulation of prolactin and growth hormone secretion. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* 9: 115–48, 1986.
- DONADIO, M.V.; SAGAE, S.C.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B. & SANVITTO, G.L. Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. *Brain Research* 1006(1): 59–65, 2004.
- DOUGLAS, A.J.; MEDDLE, S.L.; TOSCHI, N.; BOSCH, O.J. & NEUMANN, I.D. Reduced activity of the noradrenergic system in the paraventricular nucleus at the end of pregnancy: implications for stress hyporesponsiveness. *Journal of Neuroendocrinology* 17(1): 40–8, 2005.
- FERGUSON, A.V. & KASTING, N.W. Angiotensin acts at the subfornical organ to increase plasma oxytocin concentrations in the rat. *Regul Pept* 23: 343–352, 1988.
- FISCHER, D.; PATCHEV, V.K.; HELLBACH, S.; HASSAN, A.H. & ALMEIDA, O.F. Lactation as a model for naturally reversible hypercortisolism plasticity in the mechanisms governing hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in rats. *The Journal of Clinical Investigation* 96(3): 1208–15, 1995.

- FREEMAN, M.E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A. & NAGY, G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80(4): 1523–631, 2000.
- GAMMIE, S.C. & STEVENSON, S.A. Effects of daily and acute restraint stress during lactation on maternal aggression and behavior in mice. *Stress* 9(3): 171–80, 2006.
- GOUDREAU, J.L.; FALLS, W.M.; LOOKINGLAND, K.J. & MOORE, K.E. Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 62(2): 147–54, 1995.
- GOUDREAU, J.L.; LINDLEY, S.E.; LOOKINGLAND, K.J. & MOORE, K.E. Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 56(1): 100–5, 1992.
- GROSVENOR, C.E.; SHYR, S.W.; GOODMAN, G.T. & MENA, F. Comparison of plasma profiles of oxytocin and Prolactin following suckling in the rat. *Neuroendocrinology* 43(6): 679–85, 1986.
- GUDELSKY, G.A. & PORTER, J.C. Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. *Endocrinology* 106: 526–529, 1980.
- HAUGER, R.L.; MILLAN, M.A.; LORANG, M.; HARWOOD, J.P. & AGUILERA, G. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology*, 123(1): 396–405, 1988.

- HIGUCHI, T.; NEGORO, H. & ARITA, J. Reduced responses of prolactin and catecholamine to stress in the lactating rat. *The Journal of Endocrinology* 122(2):495–8, 1989.
- HOLZBAUER, M. & RACKÉ, K. The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Medical Biology* 63(3): 97–116, 1985.
- INSEL, T.R. & HARBAUGH, C.R. Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. *Physiology & Behavior* 45(5): 1033–41, 1989.
- JOHNS, J.M.; JOYNER, P.W.; MCMURRAY, M.S.; ELLIOTT, D.L.; HOFER, V.E.; MIDDLETON, C.L.; KNUPP, K.; GREENHILL, K.W.; LOMAS, L.M. & WALKER, C.H. The effects of dopaminergic/serotonergic reuptake inhibition on maternal behavior, maternal aggression, and oxytocin in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81(4): 769–85, 2005.
- KAWANO, H. & DAIKOKU, S. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology* 265(2): 242–53, 1987.
- KEHOE, L.; JANIK, J. & CALLAHAN, P. Effects of immobilization stress on tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) neuronal activity and prolactin levels in lactating and non-lactating female rats. *Life Sciences* 50(1): 55–63, 1991.

KIM, E.M.; KOTZ, C.M.; WELCH, C.C.; GRACE, M.K.; BILLINGTON, C.J. & LEVINE, A.S.

Lactation decreases mRNA levels of opioid peptides in the arcuate nucleus of the rat. *Brain Research* 769(2): 303–8, 1997.

KUŁAKOWSKA, A.; KARWOWSKA, W.; WIŚNIEWSKI, K. & BRASZKO J.J. Losartan

influences behavioural effects of angiotensin II in rats. *Pharmacological Research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 34(3-4): 109–15, 1996.

KUMER, S. C. & VRANA, K. E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and

gene expression. *Journal of Neurochemistry* 67: 443–462, 1996.

LANDGRAF, R. & NEUMANN, I.D. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a

dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication.

Frontiers in Neuroendocrinology 25(3-4): 150–76, 2004.

LANG, R.E.; RASCHER, W.; HEIL, J.; UNGER, T.; WIEDEMANN, G. & GANTEN, D.

Angiotensin stimulates oxytocin release. *Life Sciences* 29: 1425–1428, 1981.

LENG, G.; MEDDLE, S.L. & DOUGLAS, A.J. Oxytocin and the maternal brain. *Current*

Opinion in Pharmacology 8(6): 731–4, 2008.

LEONG, D.A.; FRAWLEY, L.S. & NEILL, J.D. Neuroendocrine control of prolactin

secretion. *Annual Review of Physiology* 45: 109–27, 1983.

LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P. & LLORENS-CORTÈS, C. Expression of

Angiotensin Type-1 (AT1) and Type-2 (AT2) Receptor mRNAs in the Adult Rat Brain:

A Functional Neuroanatomical Review. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18(4): 383–439, 1997.

LIGHTMAN, S.L. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of Neuroendocrinology* 20(6): 880–4, 2008.

LIGHTMAN, S.L. & YOUNG, W.S. 3rd. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 124(5): 2358–64, 1989.

LIGHTMAN, S.L. & YOUNG, W.S. 3rd. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *The Journal of Physiology* 403: 511–23, 1988.

LINCOLN, D.W. & PAISLEY, A.C. Neuroendocrine control of milk ejection. *Journal of Reproduction and Fertility* 65(2): 571–86, 1982.

LOOKINGLAND, K.J.; GUNNET, J.W.; TONEY, T.W. & MOORE, K.E. Comparison of the Effects of Ether and Restraint Stress on the Activity of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons in Female and Male Rats. *Neuroendocrinology* 52(1): 99–105, 1990.

LONSTEIN, J.S.; SIMMONS, D.A.; SWANN, J.M. & STERN, J.M. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience* 82(1): 267–81, 1998.

- LU, X.Y.; GHASEMZADEH, M.B. & KALIVAS, P.W. Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82(3): 767–80, 1998.
- LUCAS, B.K.; ORMANDY, C.J.; BINART, N.; BRIDGES, R.S. & KELLY, P.A. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 139(10): 4102–7, 1998.
- LUDWIG, M. & LENG, G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviors. *Nature Reviews. Neuroscience* 7(2): 126–36, 2006.
- MA, F.Y.; GRATTAN, D.R.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P.R. & BUNN, S.J. Angiotensin II regulates tyrosine hydroxylase activity and mRNA expression in rat mediobasal hypothalamic cultures: the role of specific protein kinases. *Journal of Neurochemistry* 90(2): 431–41, 2004.
- MANGURIAN, L.P.; WALSH, R.J. & POSNER, B.I. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 131(2): 698–702, 1992.
- MENA, F. & GROSVENOR, C.E. Effect of number of pups upon suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration and milk ejection in the rat. *Endocrinology* 82(3): 623–6, 1968.
- MICELI, M.O.; FLEMING, A.S. & MALSBURY, C.W. Disruption of maternal behaviour in virgin and postparturient rats following sagittal plane knife cuts in the preoptic area-hypothalamus. *Behavioural Brain Research* 9(3): 337–60, 1983.

- MILLER, S.M. & LONSTEIN, J.S. Dopaminergic projections to the medial preoptic area of postpartum rats. *Neuroscience* 159(4): 1384-96, 2009.
- MILLER, S.M. & LONSTEIN, J.S. Dopamine D1 and D2 receptor antagonism in the preoptic area produces different effects on maternal behavior in lactating rats. *Behavioral Neuroscience* 119(4): 1072–1083, 2005.
- MOGENSON, G.J. Limbic-motor integration. *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology* 12: 117–67, 1987.
- MUNCK, A.; GUYRE, P.M. & HOLBROOK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* 5(1): 25–44, 1984.
- MYERS, M.M.; DENENBERG, V.H.; THOMAN, E.; HOLLOWAY, W.R. & BOWERMAN, D.R. The effects of litter size on plasma corticosterone and prolactin response to ether stress in the lactating rat. *Neuroendocrinology* 19(1): 54–8, 1975.
- NEUMANN, I.D.; JOHNSTONE, H.A.; HATZINGER, M.; LIEBSCH G.; SHIPSTON M.; RUSSELL J.A.; LANDGRAF, R. & DOUGLAS, A.J. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *The Journal of Physiology* 508(Pt 1): 289–300, 1998.
- NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 87(4): 746–59, 1974.

NUMAN, M. & CALLAHAN, E.C. The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. *Physiology & Behavior* 25(5): 653–65, 1980.

NUMAN, M. & CORODIMAS, K.P. The effects of paraventricular hypothalamic lesions on maternal behavior in rats. *Physiology & Behavior* 35(3): 417–25, 1985.

NUMAN, M.; CORODIMAS, K.P.; NUMAN, M.J.; FACTOR, E.M. & PIERS, W.D. Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behavioural Neuroscience* 102(3): 381–96, 1988.

NUMAN, M.; NUMAN, M.J.; SCHWARZ, J. M.; NEUNER, C. M.; FLOOD, T. F. & SMITH, C. D. Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens–ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. *Behavioural Brain Research* 158: 53–68, 2005.

NUMAN, M.; NUMAN, M.J.; PLIAKOU, N.; STOLZENBERG, D.S.; MULLINS, O.J.; MURPHY, J.M. & SMITH, C.D. The effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience* 119(6): 1588–604, 2005.

NUMAN, M. & INSEL, T.R. *The Neurobiology of Parental Behavior*. Springer, NY, 2003.

NUMAN, M.; ROSENBLATT, J. S. & KOMISARUK, B.R. Medial preoptic area and onset of maternal behaviour in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 91(1): 146–64, 1977.

- NUMAN, M. & STOLZENBERG, D.S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in Neuroendocrinology* Epub 2008 Nov. 5. 30(1): 46–64, 2009.
- PEDERSEN, C.A.; ASCHER, J.A.; MONROE, Y.L.; & PRANGE JR., A.J. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science* 216(4546): 648–50, 1982.
- PEDERSEN, C.A.; CALDWELL, J.D.; WALKER, C.; AYERS, G. & MASON, G.A. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behavioral Neuroscience* 108(6): 1163–71, 1994.
- PLOTSKY, P.M. Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal. *Journal of Neuroendocrinology* 3(1): 1–9, 1991.
- RUBIN, B. S. & BRIDGES, R. S. Immunoreactive Prolactin in the Cerebrospinal Fluid of Estrogen-Treated and Lactating Rats as Determined by Push-pull Perfusion of the Lateral Ventricles. *Journal of Neuroendocrinology* 1(5): 345–9, 1989.
- SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews* 13(2): 329–80, 1992.
- SABATIER, N.; CAQUINEAU, C.; DAYANITHI, G.; BULL, P.; DOUGLAS, A.J.; GUAN, X.M.; JIANG, M.; VAN DER PLOEG, L. & LENG, G. Alpha-melanocytostimulating hormone stimulates oxytocin release from the dendrites of hypothalamic neurons while inhibiting oxytocin release from their terminals in the neurohypophysis. *The Journal of Neuroscience* 23(32):10351–8, 2003.

- SCHRAMME, C. & DENEFF, C. Stimulation of prolactin release by angiotensin II in superfused rat anterior pituitary cell aggregates. *Neuroendocrinology* 36(6): 483–5, 1983.
- SAKAGUCHI, K.; TANAKA, M.; OHKUBO, T.; DOH-URA, K.; FUJIKAWA, T.; SUDO, S. & NAKASHIMA, K. Induction of brain prolactin receptor long-form mRNA expression and maternal behavior in pup-contacted male rats: promotion by prolactin administration and suppression by female contact. *Neuroendocrinology* 63(6): 559–68, 1996.
- SCHLEIN, P.A.; ZARROW, M.X. & DENENBERG, V.H. The role of prolactin in the depressed or 'buffered' adrenocorticosteroid response of the rat. *Journal of Endocrinology* 62: 93–99, 1974.
- SERVICE, G. & WOODSIDE, B. Inhibition of nitric oxide synthase within the medial preoptic area impairs pup retrieval in lactating rats. *Behavioral Neuroscience* 121: 140–147, 2007.
- SERVICE, G. & WOODSIDE, B. The effects of bilateral infusions of L-NAME into the medial preoptic area on pup retrieval is reversed by simultaneous administration of SKF 38393 in postpartum rats. *Program* 577: 9, 2006.
- SHUGHRUE, P.J.; LANE, M.V. & MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-a and -b mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 388(4): 507–25, 1997.

- SILVA, M.R.; BERNARDI, M.M.; CRUZ-CASALLAS, P.E. & FELICIO, L.F. Pimozide injections into nucleus accumbens disrupt maternal behaviour in lactating rats. *Pharmacology & Toxicology* 93(1): 42–7, 2003.
- SIRETT, N.E.; MCLEAN, A.S.; BRAY, J.J. & HUBBARD, J.I. Distribution of angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Research* 122(2): 299–312, 1977.
- SONG, K.F.; ZHUO, J.L. & MENDELSON, F.A. Access of peripherally administered DuP 753 to rat brain angiotensin II receptors. *British Journal of Pharmacology* 104(4): 771–2, 1991.
- STACK, E.C.; BALAKRISHNAN, R.; NUMAN, M.J. & NUMAN, M. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. *Behavioural Brain Research* 131(1-2): 17–36, 2002.
- STEELE, M.K. The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 3(8): 295–301, 1992.
- STERN, J.M. & LEVINE, S. Psychobiological aspects of lactation in rats. *Progress in Brain Research* 41: 433–44, 1974.
- STERN, J.M. & VOOGT, J.L. Comparison of plasma corticosterone and prolactin levels in cycling and lactating rats. *Neuroendocrinology* 13(3): 173–81, 1974.
- STOLZENBERG, D.S.; MCKENNA, J.B.; KEOUGH, S.; HANCOCK, R.; NUMAN, M.J. & NUMAN, M. Dopamine D1 receptor stimulation of the nucleus accumbens or the

medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior in pregnancy-terminated rats. *Behavioral Neuroscience* 121: 907–919, 2007.

SUMITOMO, T.; SUDA, T.; NAKANO, Y.; TOZAWA, F.; YAMADA, M. & DEMURA, H. Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 128(5): 2248–52, 1991.

SWANSON, L.W. & SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience* 6: 269–324, 1983.

TAYA, K. & SASAMOTO, S. Changes in FSH, LH and prolactin secretion and ovarian follicular development during lactation in the rat. *Endocrinologia Japonica* 28(2): 187–96, 1981.

THOMAN, E.B.; CONNER, R.L. & LEVINE, S. Lactation suppresses adrenal corticosteroid activity and aggressiveness in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 70(3): 364–9, 1970.

THOMAS, M.A. & LEMMER, B. The use of heat-induced hydrolysis in immunohistochemistry on angiotensin II (AT1) receptors enhances the immunoreactivity in paraformaldehyde-fixed brain tissue of normotensive Sprague–Dawley rats. *Brain Research* 1119(1): 150–64, 2006.

TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J.M. Angiotensin-II receptor subtypes in median eminence and basal forebrain areas involved in regulation of pituitary function. *Endocrinology* 129(6): 3001–8, 1991.

YANG, G.; XI, Z.X.; WAN, Y.; WANG, H. & BI, G. Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biological Signals* 2(3): 166–72, 1993.

WAGNER, C. K.; EATON, M. J.; MOORE, K. E. & LOOKINGLAND, K. J. Efferent projections from the region of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: A PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. *Brain Research* 677: 229–237, 1995.

WAKABAYASHI, I.; ARIMURA, A. & SCHALLY, A.V. Effect of pentobarbital and ether stress on serum prolactin levels in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 137(4): 1189–93, 1971.

WAKERLEY, J.B.; CLARKE, G. & SUMMERLEE, A.J.S. Milk ejection and its control. In: Knobil, E. & Neill, J., editores. *The Physiology of Reproduction*. New York: *Raven Press*; 1988.

WALKER, CD.; LIGHTMAN, S.L.; STEELE, M. K. & DALLMAN, M.F. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 130(1): 115– 25, 1992.

WALSH, R.J.; SLABY, F.J. & POSNER, B.I. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120(5): 1846–50, 1987.

WEINSTOCK, M. Does Prenatal Stress Impair Coping and Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21(1): 1–10, 1997.