

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

INFLUENCIA DE DIFERENTES DOSES DE CIPIONATO
DE ESTRADIOL NAS ALTERAÇÕES
HIDROELETROLÍTICAS DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS

VERONICA CRISTINA LOPES MENEZES

Seropédica, RJ

2015

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DOSES DE CIPIONATO DE
ESTRADIOL NAS ALTERAÇÕES HIDROELETROLÍTICAS DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS

VERONICA CRISTINA LOPES MENEZES

Sob orientação do Professor

Luis Carlos Reis

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Fisiológicas**. Área de concentração: Fisiologia.

Seropédica, RJ

Julho de 2015

573.44

M543i

T

Menezes, Verônica Cristina Lopes, 1989-
Influência de diferentes doses de
cipionato estradiol nas alterações
hidroeletrólíticas de ratas
ovariectomizadas / Verônica Cristina Lopes
Menezes. - 2015.
83 f.: il.

Orientador: Luis Carlos Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 67-82.

1. Hormônios - Teses. 2. Hormônios
sexuais - Teses. 3. Estrógenos - Teses. 4.
Equilíbrio hidro - eletrólítico
(Fisiologia) - Teses. I. Reis, Luis Carlos,
1952- II. Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas. III. Título.

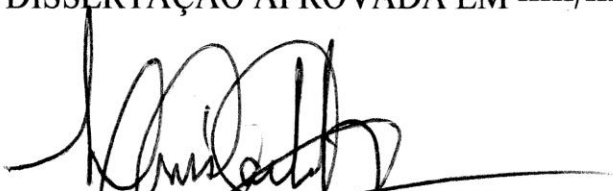
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VERONICA CRISTINA LOPES MENEZES

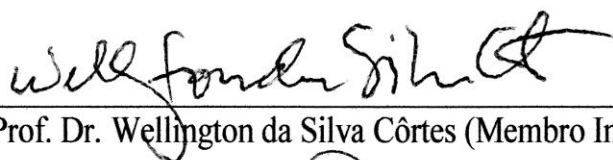
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração em Fisiologia.

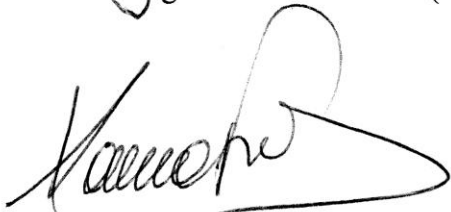
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/07/2015



Prof. Dr. Luis Carlos Reis. (Membro Interno - UFRRJ)
(Orientador)



Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)



Profª Drª Laura Vivas (Membro Externo - Universidade Nacional de Córdoba)

Dedicatória

À minha família

Agradecimentos

Neste momento em que estou a caminho de concluir mais uma etapa da minha formação aproveito para agradecer primeiramente a minha família, especialmente meus pais Angela e Jorge por terem me apoiado em tudo desde sempre e por acreditarem junto comigo no meu sonho de me formar e seguir na vida acadêmica. Foram diversas vezes em que minha família me trouxe até à Rural nos fins de semana e feriados e sempre me apoiaram em todos os momentos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Luis Carlos Reis, por ser um orientador sempre presente, com que podemos contar e que se preocupa muito com seus alunos. Gostaria de agradecer também, Mestre, pelo senhor ter acreditado no meu potencial desde a Iniciação Científica e ter passado muito de sua experiência para nós, além de se empenhar tanto para que nós tivéssemos um bom começo na vida acadêmica e especialmente poder começar da forma certa. Sempre vou lembrar com carinho de todos os momentos e das reuniões em sua casa, sempre regadas com boa conversa e boa companhia e também do respeito pelos alunos.

Agradeço também ao Prof. André Mecawi pelas idéias e discussões no decorrer do trabalho, pelas sugestões que surgiram, pelo suporte quando nos ajudou na bancada na coleta do material, por trazer animais de Ribeirão Preto quando precisávamos, pelas importantes considerações na discussão dos dados e pelos momentos divertidos durante os experimentos!

É muito legal olhar para os últimos cinco anos de DCF e ver o quanto meus amigos também ajudaram na minha formação. Lembro que cheguei ao laboratório muito tímida e logo fui bem recebida por todos os colegas e professores e hoje vejo o quanto que isso me chamou atenção e me fez querer continuar no laboratório.

Gostaria de agradecer ao Prof. Wellington pela amizade e pela ajuda nos cálculos de doses e também pela ajuda na padronização do fotômetro de chama. Agradeço também aos Professores Fábio, Emerson, Frederico, Magda e Michele com quem tive aulas durante a graduação e pude aprender muito com seus conhecimentos. Agradeço também à Profa. Alba, chefe do Departamento, pelo apoio no dia-a-dia e pela amizade.

Aproveito também para agradecer aos colegas de laboratório Bruno Paes Leme, Livia Monteiro, Raoni dos Santos, Silvana do Nascimento e Evandro Valentim por toda ajuda durante o trabalho, por serem ótimos colegas e mais ainda serem amigos em que posso confiar. Obrigada a vocês pelos vários bons momentos divertidos no laboratório, pela companhia durante os experimentos. Agradeço também aos colegas por me ajudarem a ver os meus defeitos com carinho e a melhorar na minha forma de ser. Vocês sempre terão um lugar especial nas minhas lembranças.

Gostaria de agradecer também à Fabrícia por ter me ensinado a ser mais sagaz com os experimentos...lembro muito dela falando “Agilidade, Verônica” (risos), também pela orientação durante a Iniciação Científica e pelo aprendizado dos protocolos de gaiola metabólica, por vários momentos engraçados e pela deliciosa culinária mineira nas reuniões na casa do Mestre.

Gostaria de agradecer a Iracema Araújo pela amizade, ajuda em diversos momentos no laboratório desde a Iniciação Científica, pelas discussões nos seminários e momentos divertidos.

Gostaria de agradecer ao Danilo Lustrino pela confiança, e por me apresentar no laboratório e me passar o seu projeto de Iniciação Científica para que desse continuidade. Você não imagina como foi legal o experimento do pCPA!

Gostaria de agradecer também a Marissa, Claudinho, Phelipe Fontanezi e gostaria de agradecer muito ao Roberto Laureano pelo apoio desde a Iniciação Científica. Lembro que o Roberto me apoiou e ajudou muito quando estava começando no laboratório e com quem pude aprender os experimentos de labirinto em cruz elevado e campo aberto e que além disso, diversas

vezes foi me buscar no laboratório após às 23 horas quando estava fazendo o experimento do pCPA .

Gostaria de agradecer à Nayana por ter me recebido na sua casa em Vargem Grande para que pudesse frequentar a disciplina de Fisiopatologia da Tireóide. Foi muito bom fazer a disciplina com você e agradeço pela ajuda na discussão do artigos.

Agradeço também a Güinever Eustaquio pela colaboração nos seminários na disciplina de Receptores Nucleares da Profa. Carmem na UFRJ. Adorei a semana em que fiquei como agregada no LEM e conhecendo outros colegas.

Agradeço também aos demais colegas Fernanda Kohn, Poliana, Raquel Teixeira, Carla Franzini, Carla Myrra, Julia Vilas Boas e Bruna Sbanco por todos os momentos divertidos , pelo apoio e conversas no corredor.

Também agradeço aos técnicos Maria Rita, Vicente, Raquel Nascimento, Ipojucan e aos secretários Dione e Franklin pelo apoio no dia-a-dia e pela amizade.

Gostaria de agradecer aos órgãos de fomento CNPq no período de 2011 a 2013 em que fui bolsista de Iniciação Científica por dois anos e à CAPES no período de 2013 a 2015 em que fui bolsista de Mestrado , respectivamente.

RESUMO

MENEZES, Veronica Cristina Lopes – **Influência de diferentes doses de cipionato de estradiol nas alterações hidroeletrólíticas de ratas ovariectomizadas.** - Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas, Fisiologia). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Palavras-chave: estrógeno, ovariectomia, apetite ao sódio, ingestão alimentar, sistema serotoninérgico

A distribuição de receptores estrogênicos em estruturas centrais envolvidas na regulação da homeostase hidroeletrólítica como o órgão vascular da lâmina terminal, núcleo subfornicial, núcleo dorsal da rafe indica que o estradiol pode atuar nessas estruturas em resposta a alterações nos fluidos corporais. Nosso objetivo foi verificar se a reposição hormonal pode influenciar de maneira concentração-dependente o status hidroeletrólítico e neuroendócrino de ratas castradas com reposição hormonal em diferentes doses de forma comparativa. Ratas Wistar (~230 g) foram previamente adaptadas, por 5 dias, em gaiolas metabólicas, com acesso *ad libitum* aos bebedouros volumétricos de água e salina hipertônica e ao alimento, sendo mantidas sob ciclo claro-escuro de 12 horas em sala com temperatura controlada em $22^{\circ}\pm 2$ °C. Ao final da adaptação, as ratas previamente anestesiadas com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral. Os animais foram divididos em 4 grupos: OVX, reposição com óleo de milho), repostos com óleo de milho cipionato de estradiol (E2) 2,5 µg/kg (E2 2,5), 10,0 µg/kg (E2 10,0) e 40 µg/kg (E2 40,0). O tratamento de reposição foi feito pela via subcutânea, diariamente durante 7 dias tendo sido iniciado no dia seguinte à cirurgia. Foram realizados três protocolos experimentais: avaliação sob condições basais, depleção de íons sódio e rerepresentação de fluidos. Neste estudo o estradiol apresentou efeito dose dependente nos seguintes parâmetros sob condições basais: peso corporal diário, volume urinário diário, ingestão de alimento diário. Após depleção de sódio não houve diferença em relação ao volume urinário de 2 e de 24 horas após o experimento. No entanto após a rerepresentação dos fluidos houve efeito dose-dependente no comportamento ingestivo de água e de salina hipertônica tanto nos animais depletados de sódio quanto nos animais controles. Os dados suportam que o estradiol modula o comportamento ingestivo dos animais sob condições basais e após a depleção de sódio.

ABSTRACT

MENEZES, Veronica Cristina Lopes – **Influence of different doses of estradiol cypionate on the hidroelectrolytic challenges of female ovariectomized rats.** - Dissertation (Master in Physiological Sciences, Physiology). Institute of Biology, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Key-words: estrogen, ovariectomy, sodium appetite, food intake, serotonergic system.

The distribution of estrogen receptors in brain structures that are involved in the hidroelectrolyte balance such as the *lamina terminalis* (LT), subfornical organ (SFO) and dorsal raphe nucleus (DRN) demonstrated that estradiol can modulate important responses in body fluids. In the literature experimental data support that estrogen can increase the triptofan-hydroxylase type 2, the main enzyme for the serotonin synthesis. The primary question here is whether or not differences in the baseline or stimulated intake are a function of different levels of circulating gonadal hormones in female ovariectomized rats. Female Wistar intact rats (~230 g) were previously acclimated in metabolic cages during 5 days and *ad libitum* access to water and hypertonic saline (1.8%) bottles and food. Room temperature was maintained at 22 ± 2 °C with 12:12 h light-dark cycle (lights off at 19:00). Rats were anesthetized with intraperitoneal injections of a mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and then bilaterally ovariectomized. There were four experimental groups: OVX (replaced with corn oil), 2,5 µg/kg (E2 2,5), 10,0 µg/kg (E2 10,0) and 40,0 µg/kg (E2 40,0), daily during seven days, s.c. After 24 h of the surgery the hormonal replacement initiated (estradiol cypionate, EC, Pfizer, Animal Health). We did three experimental protocols: baseline evaluations, sodium depletion and fluid replacement. The estrogen replacement exhibited a dose dependent effect in the following parameters under basal conditions: daily body weight, daily urinary volume and daily food intake. After sodium depletion there were no difference in the urinary volume after 2 and 24 hours of the experiment. But after fluid reposition we observed a dose dependent effect in the ingestive behaviour of water and hypertonic saline intake in sodium depleted and control animals. Our data support that estradiol can alter the natriorexigenic and dipsogenic responses especially after sodium depletion depending of the estrogenic status.

Lista de abreviaturas

Ace- amígdala central
ADH- hormônio antidiurético
AEs- amígdala estendida
ANP – peptídeo natriurético atrial
ANG 1- angiotensina tipo 1
ANG 2 – angiotensina tipo 2
AP- área postrema
ADN- ácido desóxi-ribonucléico
ARNm - ácido-ribonucleico mensageiro
AVP- arginina-vasopressina
AV3V- região antero-ventral do terceiro ventrículo
BNP- peptídeo natriurético cerebral
CRH- hormônio liberador de corticotrofina
ENaC- canais para sódio epiteliais
ER α – receptor estrogênico tipo alfa
ER β – receptor estrogênico tipo beta
ER's- receptores estrogênicos
E2- 17 β -estradiol, estradiol
ECA- enzima conversora de angiotensina
HVM- hipotálamo ventro-medial
LCR- líquido céfalo-raquidiano
LEC- líquido extracelular
LT- *lamina terminalis*
NLET- núcleo leito da estria terminal
NPOM – núcleo mediano pré-óptico
NaCl- cloreto de sódio
NPV- núcleo paraventricular
NPB- núcleo parabraquial
NOS- núcleo supra-óptico
NDR- núcleo dorsal da rafe
NPY- neuropeptídeo Y
NTS- núcleo do trato solitário
OCV's – órgãos circunventriculares
OSF-órgão subfornicial
OT- ocitocina
OVX – rata ovariectomizada tratada com veículo
OVX-EC– rata ovariectomizada tratada com estrógeno
OVLT- órgão vasculoso da lâmina terminal
OTr- receptor para ocitocina
POMC- pró-ópiomelanocortina
SNC- sistema nervoso central
SRAA- sistema renina-angiotensina-aldosterona
5-HT 1Ar – receptor serotoninérgico tipo 1 A
TPH 2 – triptofano-hidroxilase tipo 2
T3- tri-iodo-tironina; T4- tetra-iodo-tironina

SUMÁRIO

1. Introdução	página 12
1.1 Revisão de Literatura	página 12
1.2 Justificativa	página 27
2. Objetivos	página 29
2.1 Objetivos gerais	página 29
2.2 Objetivos específicos	página 29
3.0 Material e métodos	página 29
3.0.1 Animais e Manutenção	página 29
3.0.2 Procedimentos cirúrgicos	página 30
3.0.2.1 Ovariectomia e seu aspecto translacional	página 30
3.0.3 Protocolo de reposição hormonal	página 31
3.0.4 Tratamentos hormonais e doses	página 31
3.0.5 Tratamento com cipionato de estradiol	página 32
3.0.5.1 Preparação das alíquotas de estrógeno	página 32
3.0.6 Avaliação das ingestões de água e salina hipertônica (NaCl 1,8%)	página 33
3.0.7 Avaliação do volume urinário e osmolalidade urinária e plasmática	página 34
3.0.8 Avaliação do sódio plasmático	página 34
3.1 Avaliação do índice uterino e hipofisário	página 35
4.0 Protocolo experimental	página 35
4.1 Experimento 1- Efeito do tratamento com estradiol sobre o apetite ao sódio, sede em ratas OVX controle e sob reposição hormonal	página 35
4.1.2 Desenho experimental	página 36
5.0 Análise estatística	página 36
6.0 Resultados e discussão	página 37
7.0 Conclusões	página 66
7.1 Conclusão geral	página 66
7.2 Conclusões específicas	página 66
8.0 Considerações finais e perspectivas	página 67
9.0 Referências bibliográficas	página 67
10.0 Anexo	página 83

1. Introdução

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 Regulação do equilíbrio hidroeletrolítico

A ingestão de água e salina hipertônica são comportamentos motivados importantes para a homeostase dos indivíduos. A ingestão de água ocorre em situações em que há desidratação celular, perda de volume sanguíneo e hiperosmolalidade plasmática. Hoje sabemos por evidências da literatura que em condições de hiperosmolalidade, não estão ativados apenas os mecanismos de sede e de redução da excreção urinária de água mediada pela vasopressina, mas também mecanismos que inibem o consumo adicional de soluto e que induzem a excreção de sódio mediada pela ocitocina e pelo peptídeo natriurético atrial (ANTUNES-RODRIGUES, et al. 1997; JOHNSON & THUNHORST, 1997).

Os estudos de Verney (1947) apresentaram o conceito de osmolalidade e propuseram a existência de um mecanismo osmorreceptor relacionado à liberação de vasopressina em resposta ao aumento de osmolalidade. Posteriormente, Anderson & Mccann (1955), postularam a existência de um osmorreceptor que seria um sensor para sódio localizado em regiões cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica, que poderiam estar envolvidas na regulação do apetite ao sódio e sua excreção em resposta a variações da concentração desse soluto no líquido cefalorraquidiano (LCR). Atualmente é bem conhecido que os osmorreceptores são neurônios especializados capazes de traduzir variações da pressão osmótica no líquido extracelular (LEC) em sinais elétricos que ativam áreas do sistema nervoso central envolvidas no controle da ingestão e excreção de sal e água pela liberação de acetilcolina ou angiotensina.

Essas células sensíveis às variações de osmolalidade ou concentração de sódio do LEC estão localizadas nos órgãos circunventriculares (OCV's) localizadas principalmente no terceiro ventrículo. Além de sua localização no sistema nervoso central (SNC), receptores para sódio também estão localizados periféricamente nas terminações nervosas aferentes e adjacentes aos vasos hepáticos, renais e intestinais. Por exemplo, os receptores para sódio localizados em vasos hepáticos são estimulados pelo aumento na concentração de sódio na veia porta e que por aferências vagais ativam neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) que é um importante centro

de integração os quais, então, estimulam estruturas neurais do bulbo, que induzem o aumento da natriurese e inibição da absorção intestinal de sódio.

E recentemente, o estudo de Noda (2007) verificou que canais para sódio sensíveis às concentrações de sódio são localizados em células endimárias e que esses canais atuam como sensores dos níveis de sódio dos fluidos corporais.

Quando estudamos as vias de entrada para o sistema nervoso central temos que considerar que fatores humorais (osmolalidade, concentração de sódio, hormônios) e mecânicos (volemia) agem como sinais-chave para o aparecimento da sede e do apetite ao sódio. (SCHULKIN, 1991; OLDFIELD & MCKINLEY, 1995); JONHSON & THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al. 2001). Uma via envolve fatores humorais, que pelo plasma ou LCR, sinalizam aos OCV's prosencefálicos como órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e órgão subfornicial (OSF) e romboencefálicos como a área postrema (AP). A outra via é constituída de aferências vagais e glossofaríngeas provenientes de receptores viscerais (osmossodiorreceptores hepáticos ou renais, barorreceptores renais ou cardiovasculares) que se dirigem para núcleos integradores do tronco encefálico, como o núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo parabraquial (NPB).

Na literatura há o modelo hodológico da sede extracelular que foi proposto por JONHSON & THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al. 2001. De acordo com este modelo os sinais que chegam ao OSF e ao OVLT são, em seguida integrados primeiramente no núcleo mediano pré-óptico (NPOM) por meio de conexões mediadas por angiotensina II. Do NPOM partem sinais ativando neurônios dos núcleos paraventricular e supra-óptico hipotalâmicos que controlam a secreção de vasopressina e ocitocina, e a ele chegam projeções do tronco encefálico (AP, NTS, NPB e núcleos bulbares noradrenérgicos) com os quais o NPOM apresenta conexões recíprocas (OLDFIELD & MCKINLEY, 1995; JONHSON & THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al. 2001).

O NTS, por sua vez, não apenas se conecta ao NPB, mas também a estruturas telencefálicas subcorticais chaves para o processamento da informação envolvida com o controle da sede e do apetite ao sódio, tais como a amígdala estendida (AEs)-que forma um contínuo envolvendo o núcleo leito da estria terminal (NLET). Essas áreas telencefálicas corticais, a área insular agranular (córtex gustatório primário) e o córtex límbico pré-frontal estariam envolvidas na integração e coordenação das informações endócrinas e autonômicas (viscerossensorial e

somatossensorial) com o comportamento motivado requerido para a sede e apetite ao sódio (ALBEID et al. 1995).

O controle exercido pelo núcleo parabraquial, particularmente pela sua porção lateral envolve serotonina e peptídeos (colecistocinina) e pode ser importante para evitar ingestão excessiva de sódio quando o apetite ao sódio é ativado durante a desidratação. O NTS e o NPB possuem conexões diretas com o córtex gustatório, além de projeções para o tálamo gustatório de onde partem colaterais para amígdala central (Ace) e ao BNST (NOGREN, 1995).

O controle da homeostase hidroeletrólítica conta ainda com um importante sistema de controle homeostático do volume e da tonicidade dos fluidos corporais. Os sistemas renina angiotensina aldosterona (SRAA), o sistema ocitocinérgico, juntamente com o peptídeo atrial natriurético (ANP) e a inervação simpática renal representam mecanismos reguladores da reabsorção renal de sódio que atuam de modo integrado. A renina é uma enzima secretada pelas células justaglomerulares presentes na arteríola aferente e participa dessa reação em resposta à hiponatremia, alteração no volume de fluidos extracelular e hipotensão. A renina converte o angiotensinogênio em angiotensina I (ANG I) que, posteriormente, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) é a responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II (ANG II). A ANG II possui efeito vasoconstritor, promotor da reabsorção renal de sódio e indutor do comportamento dipsogênico. A angiotensina II, por sua vez poderá atuar na região cortical da glândula adrenal, estimulando a síntese e liberação de mineralocorticóides, principalmente a aldosterona, um hormônio que auxilia na retenção corpórea de íons sódio.

A ingestão de água e de sódio é ativada por ação da ANG II nos núcleos da lâmina terminal OSF, OVLT e NPOM e se reduz quando há lesão nesses núcleos (THUNHORST et al. 1990). É na lâmina terminal (LT), particularmente nas estruturas pré-óptico-periventriculares da parte anterior e ventral do terceiro ventrículo (AV3V), que reside o sinergismo entre a angiotensina e a aldosterona para produzir apetite ao sódio. Lesões na região do AV3V, que inclui o OVLT e NPOM inibem a ingestão de sódio induzida pela ANG II, mas não aquela induzida por ação mineralo-corticoide (FITTS et al. 1990; DE LUCA JR. et al. 1992). O órgão subfornicial (OSF) por sua vez, possui conexões bidirecionais com outros dois núcleos da lâmina terminal e envia projeções diretas ao NTS, ao complexo da amígdala estendida e ao córtex pré-frontal, que por sua vez, estabelece fortes conexões com o córtex gustatório primário (OLDFIELD & MCKINLEY, 1995).

Com relação ao controle neuroendócrino em situações de hipernatremia há um aumento na atividade do SRAA, aumento na secreção de ANP e na pressão arterial. Há também o estiramento dos cardiomiócitos e aumento na secreção da ocitocina que possui efeito natriurético, e desse modo reforça os estímulos para a excreção renal de sódio (FITZSIMONS, 1998) e parece que a ocitocina influencia também a inibição do apetite ao sódio, mas essa questão ainda está em estudo. A ocitocina plasmática aumenta em resposta a uma sobrecarga osmótica, e esse aumento é revertido em resposta à diluição do líquido extracelular durante a ingestão de água que precede o apetite ao sódio em animais hipovolêmicos (BLACKBURN et al. 1995, VERBALIS et al. 1995). Considerando que a injeção central, e não periférica, de ocitocina inibe a ingestão de sódio, foi sugerido que a ocitocina plasmática é um marcador da ocitocina produzida e liberada no cérebro. A ocitocina central agiria então inibindo os circuitos cerebrais que induzem apetite ao sódio. Isso aconteceria concomitantemente à ativação de mecanismos facilitadores do apetite ao sódio (angiotensina II, aldosterona, desativação dos receptores de volume) nas fases iniciais de hipovolemia, quando esse apetite está inibido. A ocitocina cerebral elevada inibiria a ingestão de sódio enquanto a sede é produzida. A água ingerida dilui os líquidos corporais, o que inibiria a liberação cerebral de ocitocina. A ação dos sinais facilitadores estaria então liberada para produzir o apetite ao sódio. Assim surgiu uma explicação para o apetite ao sódio ocorrer atrasado em relação à sede em animais hipovolêmicos, atraso que evita o acréscimo de uma desidratação intracelular à hipovolemia já instalada: a ocitocina participaria de mecanismos inibidores da ingestão de sódio, que seriam desativados durante a redução da osmolaridade extracelular liberando, então, a ação dos mecanismos facilitadores (BLACKBURN et al. 1995; VERBALIS et al. 1995).

O hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina (AVP) também é importante nesse mecanismo de regulação. Em condição de hipovolemia ou desidratação e hiperosmolalidade plasmática os sistemas de controle homeostáticos reconhecem esse erro e sinalizam para a neurohipófise promover a liberação da vasopressina, que estimula a reabsorção renal de sódio nos túbulos renais e reabsorção de água pela inserção de canais de aquaporina tipo 2 na membrana basolateral dos túbulos coletores renais. A vasopressina possui ainda um efeito vasoconstritor levando ao aumento da pressão arterial. Todos esses mecanismos podem de algum modo ser influenciados pela reposição hormonal com estrógeno.

Outro mecanismo de regulação ocorre pela atividade dos canais de sódio epiteliais (ENaC) encontrados nos túbulos renais em sua porção cortical e são também responsáveis pela reabsorção de sódio. Nesse contexto, a serotonina poderia atuar como um inibidor endógeno dos canais ENaC, e desse modo podemos dizer que em condições de déficit serotoninérgico de algum modo a redução ou mesmo ausência da serotonina poderá estimular a reabsorção renal de sódio e com isso estaria diminuindo a sua excreção. Frindt & Palmer (2012) evidenciaram que a aldosterona é capaz de aumentar os níveis protéicos da subunidade alfa dos canais para sódio epiteliais (ENaC α), presentes nos canais de sódio epiteliais renais, modulando positivamente esses canais. Assim um outro possível mecanismo seria a modulação do canal pela aldosterona, que aumenta a permeabilidade da barreira apical dos epitélios, aumentando assim a absorção de Na^+ no intestino grosso e a reabsorção do íon no ducto coletor, o que reduz sua excreção urinária.

1.1.2 Efeitos da modulação estrogênica na homeostase hidromineral

Os primeiros estudos que demonstraram que os hormônios gonadais estão envolvidos no controle da homeostase hidroeletrólítica observaram que fêmeas bebiam menos água que os machos sob as mesmas condições (RICHTER & BRAILEY, 1929). O estudo mais antigo que diretamente demonstrou que a ingestão de água se alterava como consequência de flutuações no ciclo ovulatório foi realizado na espécie *Macaca nemestrina* em que foi encontrado que a ingestão diária de água diminuía durante a fase periovulatória ou durante o momento em que os autores chamavam de “odor sexual na pele” que foi observado durante dois ou três ciclos menstruais (KROHN & ZUCKERMAN, 1937). Posteriormente, estudos realizados em ratas por Antunes-Rodrigues & Covian (1963) demonstram primeiramente que há uma diminuição na ingestão de sódio durante o estro e elevada ingestão de sódio durante o diestro quando baixos níveis plasmáticos de estrogênio são encontrados. Danielsen & Buggy (1980) também encontraram dados similares em ratas intactas durante a fase do estro.

Um estudo de Vijande et al. (1978) avaliou o efeito dipsogênico da angiotensina II que foi administrada pela via subcutânea a ratos machos e fêmeas. Foi evidenciado que as fêmeas adultas beberam mais água do que os machos e também demonstrou que as fêmeas demonstravam maior sensibilidade a ANG II durante o proestro. Os machos e as fêmeas castradas aos nascimentos e fêmeas androgenizadas ao nascimento bebiam volumes similares de água após a injeção de ANG

II. O padrão de ingestão induzida por estímulo é diferente em ambos os sexos, mas parece depender do estágio de desenvolvimento dos animais.

Estudos de reposição hormonal nas décadas seguintes demonstraram que o estradiol é suficiente para diminuir a ingestão de fluidos em roedores ovariectomizados (STRICKER et al. 1991). Neste estudo os autores evidenciaram que machos e fêmeas gonadectomizados ingeriram menor volume de salina assim como os machos intactos, mas o consumo era muito menor quando as fêmeas eram tratadas com estrógeno. Esses resultados indicam que um robusto apetite por sódio pode ser produzido em ratos por prolongada privação de sódio e que o estrógeno pode diminuir esse comportamento. Enquanto que o tratamento com progesterona não exerce efeito na ingestão de água sozinho ou em combinação com E2 (THRASHER & FREGLY, 1977).

Recentemente, Antunes-Rodrigues et al. (2013) em um estudo de revisão reportou que o estradiol participa do controle do balanço hidroeletrolítico pelos seguintes mecanismos: aumentando a responsividade de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos em neurônios do núcleo paraventricular (NPV) e do núcleo supra-óptico (NOS) bem como a secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT); aumentando a liberação de fatores natriuréticos como peptídeo natriurético atrial (ANP) e OT em resposta à estimulação osmótica e outras alterações sistêmicas; diminuindo a responsividade à ANG II central, mediada por receptores angiotensinérgicos tipo 1 (AT1), e aumentando a atividade serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe (NDR) que conseqüentemente inibe o apetite ao sódio. Santollo & Daniels (2015) também revisitaram o tema do papel do estrógeno na regulação da homeostase hidroeletrolítica.

Por outro lado, o sistema serotoninérgico também desempenha um papel importante e parece influenciar em muitas vias de integração cerebral (Azmitia & Segal, 1978), sendo que o estrógeno exerce uma influência direta neste sistema. Tal suposição foi confirmada recentemente por Susuki et al. (2013) que evidenciou que o receptor estrogênico tipo beta ($ER\beta$) é predominantemente expresso no NDR e sugeriram que agonistas de $ER\beta$ poderiam ser utilizados como tratamento para a depressão ao invés da terapia com estradiol.

Foi evidenciado também que o mesmo sistema participa ativamente do controle da homeostase hidroeletrolítica - em especial o núcleo dorsal da rafe mesencefálica, rico em populações de neurônios serotoninérgicos e que foi descrito por Reis (2007) é uma das principais estruturas responsáveis pelo controle do apetite ao sódio.

Além disso, diversos estudos apontaram que os níveis serotoninérgicos bem como a atividade neural desse sistema podem ser alterados durante o ciclo estral em função das flutuações hormonais (KUENG et al. 1976; BIEGON et al. 1980; DESAN et al. 1988).

Na literatura estudos suportam a idéia de que os distúrbios decorrentes do déficit da atividade serotoninérgica em ratas ovariectomizadas (OVX) seriam resultantes de uma supra-regulação dos autorreceptores serotoninérgicos subtipo 1A (5-HT_{1A}) somatodendríticos do (NDR) da rafe mesencefálica ou aumento da expressão dos autorreceptores serotoninérgicos subtipo 1B (5-HT_{1B}) em sua sub-região ventromedial, ambas são revertidas pela reposição estrogênica (LU & BETHEA, 2002). No núcleo hipotalâmico ventromedial os receptores 5-HT_{1A} parecem estar supra-regulados durante o estro, ou seja, a expressão desse receptor parece estar aumentada quando os níveis estrogênicos estão elevados. Esse seria mais um dos mecanismos que contribuem para a inibição do apetite ao sódio durante o estro. Ainda neste contexto um estudo de Creech et al. (2012) demonstrou que o estrógeno é capaz de levar a dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV). Sabemos por evidências da literatura que os inibidores de recaptção de serotonina (SSRIs) podem induzir a dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} no NPV. Neste experimento o estrógeno foi capaz de produzir uma dessensibilização mais rápida. Os autores verificaram que a dose de 10 µg/kg de benzoato de estradiol, duas vezes ao dia durante dois dias foi o mínimo necessário para ocorrer uma dessensibilização parcial de aproximadamente 40%.

Somponpun (2007) descreveu possíveis mecanismos pelos quais o estrógeno atua na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, com especial atenção para os hormônios AVP e OT. ER α está expresso em áreas osmosensitivas da lâmina terminal enquanto que em neurônios magnocelulares hipotalâmicos do núcleo supra-óptico (NOS) e paraventricular (NPV) o receptor ER β está predominantemente expresso (SLADEK & SOMPONPUN 2007, 2003; SHUGHRUE & MERCHENTHALER, 2001). Cada subtipo de receptor é diferentemente regulado em resposta a alterações na osmolalidade plasmática, sugerindo uma importância funcional para esses receptores. Essa heterogeneidade no padrão de expressão dos receptores estrogênicos permite que o estrógeno possa desempenhar funções específicas em diferentes tipos celulares e dessa forma desempenhar seu papel na osmorregulação. Kisley e colaboradores (2000) realizando estudo imunoistoquímico com ratas ovariectomizadas (OVX) após reposição com E2 evidenciaram aumentada expressão de proteína c-Fos em neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular.

A retenção de líquidos corporais é comumente observada em mulheres que possuem níveis plasmáticos elevados de estrógeno como no momento da ovulação ou pela administração de estrógeno exógeno. Os níveis plasmáticos de vasopressina são encontrados elevados em mulheres jovens durante a fase folicular do ciclo menstrual em paralelo com elevadas concentrações de E2 (SOMPONPUN, 2007). Adicionalmente, a liberação de vasopressina basal ou por estímulos está também elevada em mulheres na pós-menopausa, que recebem a terapia estrogênica. Num estudo realizado por MAFFEI e colaboradores (2001) mulheres na pós-menopausa e que utilizam a reposição hormonal apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de ANP e peptídeo natriurético cerebral (BNP).

O estrógeno pode ainda alterar o balanço entre inputs inibitórios ou estimulatórios para os neurônios magnocelulares. Isso pode trazer efeitos genômicos indiretos que podem interferir ao nível do núcleo da célula, alterando a expressão gênica e efeitos não – genômicos diretos através dos quais o estrógeno pode se ligar aos receptores alfa e beta (Hartley et al. 2004) e produzir diversos efeitos biológicos.

Dalmasso et al. (2011) realizaram um estudo com ratas intactas no estro e no diestro e ovariectomizadas com ou sem reposição estrogênica e submetidas à depleção de sódio. Sua equipe demonstrou o papel modulatório do estrógeno na inibição do apetite por sódio que pode envolver a participação de neurônios excitatórios do OVLT e neurônios serotoninérgicos no NDR inibindo a resposta natriorexigênica. A atividade de neurônios do OVLT em ratas ovariectomizadas com reposição estrogênica é praticamente ausente após depleção de sódio, enquanto que a atividade dos neurônios do NDR aumenta ou permanece inalterada.

Assim como na ingestão de água o estrógeno reduz a ingestão de salina hipertônica na maioria dos experimentos. Essas observações diferem da ingestão de água porque a resposta não parece ter dimorfismo. Ao observarem os efeitos do E2 na ingestão de água que só ocorre em fêmeas, parece que tanto machos quanto fêmeas diminuem a sua ingestão de salina quando tratados com E2 (STRICKER et al. 1991). Neste estudo os autores argumentaram que não há dimorfismo sexual quanto ao efeito organizacional do E2. Por exemplo, a combinação do déficit de sódio e do diurético furosemida estimula o apetite ao sódio em machos e fêmeas. Essa ingestão é resultado do aumento nos níveis plasmáticos de angiotensina II (ANG II) e da perda de sódio causada pelo diurético. Apesar do efeito ser encontrado em ambos os sexos, a ingestão de salina é duas vezes maior em fêmeas do que machos (WOLF, 1982). Como após a depleção de

sódio a ingestão de salina hipertônica é muito maior em fêmeas do que em machos isso nos leva a pensar que em fêmeas, de algum modo o estrógeno sensibiliza mais os neurônios osmossensitivos aos efeitos dipsogênicos e da angiotensina II e natriorexigêncos da aldosterona.

1.1.3- Efeitos da ação estrogênica na secreção, na regulação osmótica e na expressão gênica vasopressina e ocitocina

De acordo com os estudos de Verney (1947) e de Sladeck & Somponpun (2008) o principal estímulo para a liberação de vasopressina e ocitocina é o aumento da osmolalidade plasmática.

Sabemos por evidências da literatura que elevados níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona podem levar à retenção de fluidos (Davidson et al. 1984; Stachenfeld, et al. 1998), hipertensão (Oelkers, 1996) e edema (Oian et al. 1997, Tollan et al.1993).

O aumento do risco de hipertensão no período pré-menopausa em mulheres e sua prevenção pela terapia estrogênica envolvem mecanismos que ainda não foram completamente elucidados e a redução abrupta dos níveis estrogênicos, como ocorre na menopausa em situações fisiológicas ou experimentalmente, como na cirurgia de ovariectomia é capaz de alterar muitos sistemas biológicos. Mais especificamente, o estrógeno influencia processos fisiológicos relativos ao balanço dos fluidos corporais, como a regulação da pressão arterial, os níveis basais de vasopressina (AVP), bem como a liberação de vasopressina estimulada pelo aumento da pressão osmótica. Desse modo, a elevação dos níveis de AVP e o aumento da reabsorção renal de sódio contribuem para a retenção de água encontrada em altos status estrogênicos. No entanto, o mecanismo central pelo qual o estrógeno induz o aumento na secreção de vasopressina ainda não está completamente elucidado(STACHENFELD, et al. 1998).

A participação do estrógeno na regulação osmótica de liberação de vasopressina pode ocorrer provavelmente via sistema nervoso central. O estrógeno atua diretamente em neurônios vasopressinérgicos no hipotálamo (Akaishi et al. 1990; Barron et al. 1986; Sar & Stumpf, 1980). Adicionalmente, receptores estrogênicos são encontrados na neurohipófise e em neurônios produtores de vasopressina no núcleo supraóptico do hipotálamo (SAR & STUMPF, 1980). Há evidências de que a inervação vasopressinérgica nos núcleos paraventricular e supra-óptico seja

influenciada pelo estrógeno (STONE et al. 1982). Além disso, o estrógeno pode afetar a liberação de vasopressina indiretamente via catecolaminas (CROWLEY et al. 1978).

Estudos que utilizaram o modelo de infusão de salina hipertônica demonstraram que um baixo limiar osmótico para liberação de vasopressina é encontrado quando os níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona estão elevados como na fase luteal do ciclo menstrual (Vokers et al. 1998) e na gravidez (DAVIDSON, et al. 1984).

Um outro hormônio gonadal que não exerce efeito sobre a regulação osmótica induzida pela vasopressina é a progesterona (CALZONE, et al. 2001). Neste estudo mulheres receberam uma infusão de salina 3% e dois tipos de anticoncepcionais por via oral: um que apresentava somente estrógeno e outro que apresentava estrógeno mais progesterona. O objetivo foi comparar esses anticoncepcionais e avaliar se somente o estrógeno ou o estrógeno mais a progesterona poderiam alterar o limiar osmótico para secreção de vasopressina. Os autores verificaram que a progesterona não alterou a osmolalidade plasmática basal, e provavelmente o estrógeno sozinho seria capaz de alterar esse parâmetro.

1.1.4 – Modulação estrogênica sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, função renal e cardiovascular

O risco de doença cardiovascular tende a ser elevado nas mulheres na pré-menopausa ou nas mulheres submetidas à menopausa induzida cirurgicamente. Nesta fase da vida são frequentes os casos de hipertensão pós-menopausa, bem como de osteoporose em decorrência da perda de densidade óssea, que pode ser influenciada também pelo déficit estrogênico.

Sabemos por evidências da literatura que os hormônios estrogênicos desempenham um papel protetor no sistema cardiovascular e acredita-se que esse efeito seja mediado pelo receptor de estrógeno tipo alfa ($ER\alpha$). Esquerda et al. (2007) reportou que a ativação do $ER\alpha$ tem sido considerada na mediação do relaxamento vascular e pode desempenhar um papel protetor enquanto o $ER\beta$ é demonstrado como importante nas respostas inflamatórias à injúria vascular.

Com relação à pressão arterial um estudo de Laragh (1976) mencionou que as pílulas anticoncepcionais que contém estrógeno podem produzir alterações no sistema renina-angiotensina aldosterona, principalmente por aumentar a atividade de renina plasmática e excreção de aldosterona e também retenção de sódio, o que pode predispor à hipertensão.

Os hormônios gonadais também parecem exercer uma influência sobre a função renal, inclusive com dimorfismo sexual em seus efeitos. Enquanto que os androgênios aumentam a reabsorção tubular proximal de sódio e a pressão intraglomerular, os estrogênios levam à vasodilatação renal e diminuição da fração de filtração (PECHERE-BERTSCHI et al. 2007).

Gracelli et al. 2013 avaliaram os efeitos dos hormônios gonadais na função renal em modelo de desnervação renal em ratas ovariectomizadas com reposição de estrógeno ou progesterona. Os autores verificaram se haveria algum efeito desses hormônios na reabsorção renal de sódio e cloreto, bem como na liberação de catecolaminas pelo rim. Foi relatado que o estrógeno aumenta a liberação de catecolaminas pelo rim, ou seja exerce uma influência positiva sobre o sistema nervoso autônomo simpático, que é um dos fatores que contribuem para a retenção de sódio.

Um outro mecanismo de regulação ocorre pela influência do estrógeno na expressão de subunidades dos canais ENaC (Gambling et al. 2004), que são canais de sódio epiteliais encontrados nos túbulos renais proximais e distais (VERLANDER et al. 1998; BRUNETTE et al. 2001).

Além disso, estrógeno e progesterona atuam em tecidos renais modulando a NA-K-ATPase (principalmente no córtex renal) por mecanismos genômicos e esses efeitos poderiam ser importantes para balanço de Na^+ , Cl^- e água (GRACELLI et al. 2012). Além disso, o estrógeno, in vitro, aumenta a expressão do co-transportador Na-K-ATPase nas células renais dos túbulos distais em cultura por mecanismos não genômicos (VERLANDER, et al. 1998). Investigações mostraram que o rim controla a expressão de receptores estrogênicos nucleares ($\text{Er}\alpha$, $\text{ER}\beta$) e transmembranares como o GPR30 (GAVA et al. 2011; LEMALE, et al. 2008). Esse efeito nos túbulos proximais poderiam ser mediados diretamente via seus receptores ou poderiam também atuar indiretamente via sistema renina angiotensina-aldosterona (NASCIMENTO, et al. 2008).

1.1.5 – Influência estrogênica sobre o peso corporal e sobre o comportamento alimentar

Sinchak & Wagner (2012) reportaram em um estudo de revisão alguns mecanismos genômicos pelos quais o estrógeno regula o metabolismo energético.

É também bastante conhecido na literatura que o estrógeno diminui o apetite em roedores e primatas (BUTERA et al. 1984, CZAJA, et al. 1974). Em ratos o agonista ER α (PPT) diminui a ingestão de alimento e o tamanho da refeição, enquanto que o agonista ER β diarilpropionitrila (DPN) não teve efeito (SANTOLLO et al. 2007). Em camundongos o silenciamento do ER α no hipotálamo ventro-medial (HVM) leva a hiperfagia, obesidade e intolerância à glicose (MUSATOV, et al. 2007). Em porquinho da guiné o estradiol também diminuiu a ingestão de alimento e a frequência das refeições (ROEPKE, et al. 2010). Assim, as propriedades do estradiol em reduzir o apetite podem ser mediadas através de uma sinalização rápida iniciada via mER envolvendo ER α e mER-G α q mas não o ER β . Em humanos a ingestão energética de mulheres é mais baixa durante a fase periovulatória, quando os níveis estrogênicos estão no seu pico máximo, já a ingestão mais alta ocorre durante a fase luteal em que predominam os níveis de progesterona (JOHNSON, et al. 1994). Essas alterações cíclicas na ingestão energética são associadas com diminuição no consumo de carboidratos próximo ao período da ovulação, e aumento no consumo de gordura durante a fase luteal (JOHNSON, et al. 1994).

De acordo com Geary & Asarian (1999, 2002) a dose de 2 μ g/rata foi capaz de reduzir o peso dos animais e o tamanho da refeição em ratas ovariectomizadas, sendo que as ratas tratadas com essa dose apresentaram maior frequência na ingestão.

Silva et al. (2010) evidenciaram que ratas ovariectomizadas e tratadas com 10 μ g/kg de cipionato de estradiol por 8 dias apresentavam hipofagia. Neste trabalho foi demonstrado que tal efeito poderia ser mediado por neuropeptídeos orexigênicos como neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo agouti relativo (AgRP) e orexina A, cuja expressão estava reduzida e pela expressão aumentada de mediadores anorexigênicos como melanocortina tipo 4 (MC4), leptina e hormônio liberador de corticotrofina (CRH).

Em muitos aspectos, os efeitos do estrógeno na homeostase energética estão relacionados com mecanismos periféricos que se relacionam com os níveis de leptina. ERs e receptor para leptina (OB-R) possuem quase que os mesmos mecanismos de transdução de sinal que envolve a via STAT 3 e PI3K (GAO et al. 2007; JEFFERY et al. 2011; ROEPKE et al. 2007).

A deleção de ER α também abole a supra-regulação na expressão de pró-ópiomelanocortina (POMC) induzida pela leptina em camundongos AKITA diabéticos (HIROSAWA et al. 2008). Além disso, a queda de OB-R em neurônios POMC de fêmeas de camundongos diminui a expressão de ER α no hipotálamo e camundongas ovariectomizadas com

déficit de POMC apresentam uma tendência em acumular mais gordura do que as fêmeas controles (SHI et al. 2010). No entanto, o aumento assimétrico da formação de sinapses induzida pelo estrógeno no pericário de neurônios POMC é independente da sinalização de leptina como esse efeito foi observado em camundongos ob/ob e db/db (GAO et al. 2007). O estrogênio também aumenta agudamente a concentração de leptina circulante em mulheres (Lin et al. 2005) e estimula a liberação de leptina em cultura de tecido adiposo de fêmeas e não de machos (CASABIELL et al. 1998). A expressão de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) de leptina também é mais alta em mulheres na pré-menopausa do que em menopausa (FAJARDO et al. 2004). Convencionalmente, em camundongos machos e ratas intactas a anorexia causada pela implantação crônica de estradiol é associada com níveis séricos, plasmáticos e no fluido cérebro-espinhal de leptina (ROCHA et al. 2001, TRITOS et al. 2004). Por outro lado, agonistas seletivos de ER α cronicamente administrados a ratas ovariectomizadas reduz os níveis circulantes de leptina associada ao peso corporal e gordura visceral (WEIGT et al. 2012). Esse poderia representar um efeito genômico seguido de ativação ER α ou alternativamente uma forma de compensar as alterações em face da prolongada exposição ao hormônio.

Um estudo de Fungfuang et al. (2013) evidenciou que existe um aumento significativo na expressão de ARNm para leptina no tecido adiposo durante o proestro comparado com o diestro. Esses achados sugerem que o aumento dos níveis séricos de leptina pelo estrógeno durante o proestro, pode ser um dos fatores que regulam o comportamento alimentar.

O sistema serotoninérgico também participa do controle do comportamento alimentar e pode ser influenciado pelo estradiol. Rivera et al. (2012) demonstraram que receptores serotoninérgicos tipo 2C (5-HT_{2C}) pós-sinápticos desempenham importante papel em mediar os efeitos anorexigênicos do estradiol no sistema serotoninérgico. Os autores mencionaram que o tratamento agudo de 1 μ g/0,1 ml de 17 β -estradiol pela via subcutânea durante dois dias foi capaz de reduzir o consumo de alimento durante a fase de escuro e a associação do estrógeno com mCPP (metacloro-fenilpiperazina), um agonista dos receptores 5-HT_{2C} intensificou a resposta anorexigênica e ainda evidenciou que o estrógeno aumenta o conteúdo proteico desse receptor no tronco cerebral caudal, mas não no hipotálamo de ratas ovariectomizadas. Também é conhecido que o estrógeno dessensibiliza o receptor 5HT_{1A} no PVN e em parte essa resposta ocorre pela ativação do GPR 30 (ROSSI et al. 2010; XU et al. 2009).

Em outro trabalho Santollo et al. (2011) monitoraram a ingestão de alimento por 48 horas seguidas de microinfusões agudas de veículo em doses diárias de estradiol (0,25 a 10,0 µg) em diferentes regiões encefálicas como núcleo mediano pré-óptico e núcleo arqueado e o núcleo dorsal da rafe em modelo de ratas ovariectomizadas. Os autores apontam que ainda não se sabe se o estradiol exerce efeito modulatório no núcleo paraventricular no contexto da ingestão de alimento, mas evidenciaram que o hipotálamo ventromedial não está envolvido nesta regulação. Neste estudo as infusões no núcleo mediano pré-óptico anterior (MPOA) com a dose mais alta (2,5 µg) de E2 foi suficiente para diminuir a ingestão de alimento. E também a administração de E2 no núcleo dorsal da rafe resultou em diminuição da ingestão de alimento por ser esta uma região rica em neurônios serotoninérgicos.

1.1.6 Alguns efeitos da terapia estrogênica em outros sistemas biológicos

O estrógeno também é capaz de aumentar a atividade mitótica nos lactotrofos da adenohipófise e conseqüentemente aumentar o peso da glândula hipofisária. Um aumento dose-dependente no índice mitótico foi observado após 7 dias do início do tratamento, representando uma aceleração da atividade mitótica de 1,7 % por dia em ratas ovariectomizadas na ausência de reposição estrogênica e 3,7% por dia na presença de uma dose farmacológica de 50 µg/rata/dia ou 230 µg/kg/ dia, sendo esta uma dose suprafisiológica (LONAN & LEVY, 2009).

Thomas et al. (1986) verificou que hormônios gonadais como o estrógeno e progesterona poderiam alterar os níveis séricos de glicose, insulina, tri-iodotironina (T3) e tetra-iodotironina (T4) em ratas ovariectomizadas. A glicemia foi reduzida em ratas ovariectomizadas e repostas com estrógeno, mas foi aumentada pelos tratamentos de estrógeno com progesterona. A insulina foi reduzida pela ovariectomia e normalizada pela reposição estrogênica e aumentada pelo tratamento do estrógeno mais progesterona. A concentração plasmática de T3 foi reduzida pela ovariectomia e foi normalizada pela reposição estrogênica e aumentada pela associação dos tratamentos (estrógeno mais progesterona). Já a concentração plasmática de T4 só foi afetada pela reposição com estrógeno, sendo que sua concentração estava reduzida.

O estrógeno também é capaz de alterar o metabolismo da glicose. Liu et al. (2013) em modelo de desnervação hepática evidenciou que ratas ovariectomizadas apresentaram 17 % de redução da glicose plasmática, que foi completamente restaurada pela reposição hormonal sistêmica. Além disso, a administração de estrógeno por microdiálise no núcleo paraventricular

do hipotálamo (NPV) ou no hipotálamo ventro-medial (HVM) restaurou a glicose plasmática. Adicionalmente, esse estudo demonstrou que a desnervação simpática no fígado bloqueou o efeito do estrógeno no HVM e a sensibilidade hepática à insulina, ou seja, a administração intra-hipotalâmica de estrógeno regula a sensibilidade periférica à insulina via sistema simpático.

1.1.7 Um breve comentário sobre ações genômicas e não-genômicas para estrógenos

Até o momento encontram-se descritos dois subtipos de ER: o ER α e o ER β . Além desses dois subtipos, são conhecidas variantes de ambas as isoformas, que podem ter o ARNm incompleto ou conter maior ou menor número de bases em seus exons.

Dentre os efeitos genômicos do estrógeno sabemos que os receptores de estrógeno promovem transcrição gênica por um mecanismo que consiste na dimerização do receptor e na ligação do dímero a uma sequência do ácido desóxi-ribonucléico (ADN), chamada de elemento responsivo ao estrógeno (ERE), a qual está presente nas regiões promotoras dos genes responsivos a esses receptores. No entanto, a transcrição gênica também pode ser ativada por meio de outras porções da molécula de DNA, como os sítios AP1 e Sp1.

O estrógeno pode ainda alterar o balanço entre inputs inibitórios ou estimulatórios para os neurônios magnocelulares. Isso pode trazer efeitos genômicos indiretos que podem interferir ao nível do núcleo da célula, alterando a expressão gênica e efeitos não – genômicos diretos através dos quais o estrógeno pode se ligar aos receptores alfa e beta (Hartley et al. 2004) e produzir diversos efeitos biológicos.

Já nas ações não-genômicas do hormônio existe grande número de relatos de ações rápidas dos estrógenos alterando as propriedades elétricas de neurônios em questão de minutos. Essas ações tem sido denominadas de não-genômicas e parecem ser decorrentes da atuação direta dos estrógenos na membrana celular, modulando a ativação de proteína G e segundos mensageiros; ainda não se sabe ao certo quais os tipos de receptores envolvidos nesse modo de ação; uma aventada é a existência de receptores de membrana para estrógenos. Wang et al. 2015 evidenciou a existência do receptor estrogênico alfa tipo 36 (Er α 36) que é principalmente expresso no citoplasma e na membrana plasmática ER- α 36 está envolvido com a sinalização rápida do estrógeno, no entanto o mesmo receptor inibe a sinalização genômica do hormônio.

Mohamed & Rahman (2000) mencionaram que a regulação gênica do hormônio estrogênico é tecido específica, tendo avaliado a expressão de ERs em rim, fígado, útero e outros tecidos.

1.2 Justificativa

Na literatura verificamos muitas diferenças metodológicas em muitos estudos quanto à duração da reposição hormonal, o período de tempo em que o tratamento é realizado, a dose utilizada do hormônio, a sua composição química (benzoato de estradiol, 17- β estradiol, etinilestradiol e outros), biodisponibilidade, e linhagem de animais de laboratório (Long Evans, Wistar, Sprague Dawley). A literatura também reporta que há diferenças na expressão dos receptores estrogênicos cerebrais nas diferentes linhagens e também é importante considerar se houve ou não intervalo entre a cirurgia e o início da reposição hormonal, pois tudo isso influencia na expressão dos receptores estrogênicos.

Assim, uma das intenções de nosso estudo é auxiliar na compreensão dos efeitos de tratamentos hormonais com estrogênio em alguns parâmetros de avaliação considerando doses infra-fisiológicas, fisiológicas e supra-fisiológicas do hormônio para estudar se há efeito dose-dependente relativo aos mecanismos fisiológicos estudados e compreender como o estrógeno age alterando a expressão comportamental dos animais.

Um outro ponto a ser considerado é que na literatura encontramos alguns trabalhos sobre os efeitos organizacionais e ativacionais dos hormônios sexuais, considerando o dimorfismo. No entanto, a literatura suporta muito mais informações sobre como o estrógeno regula a ingestão de água, mas não define a discussão sobre de que maneira o estrógeno regula o apetite ao sódio. Essa discussão da ingestão de sódio modulada por estrógeno é bastante complexa.

Adicionalmente é bastante discutida a influência do estrógeno sobre o sistema serotoninérgico e a maioria dos autores acredita que o estrógeno exerce uma modulação sobre este sistema pelo aumento da expressão da enzima triptofano-hidroxilase tipo 2 (TPH2), sendo esta encontrada principalmente em tecidos cerebrais (DONNER & HANDA, 2009). Contudo, em grande parte desses experimentos os cientistas utilizam baixas doses de estrógeno como foi utilizado 20 μ g/animal no estudo de Dalmaso et al. (2011). Nosso grupo, todavia, utiliza doses muito superiores do hormônio (40 - 80 μ g/Kg). Esta dose supra-fisiológica mimetiza os níveis de estrógeno circulantes em fêmeas no último terço de gestação.

Dados não publicados de nosso laboratório com a dose de 80µg/Kg demonstraram uma redução da expressão da enzima TPH2 a partir do NDR extraído dos encéfalos de ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno durante 14 dias sob condições basais. Ao contrário do esperado não observamos um aumento da expressão de ARNm da TPH2 em animais tratados com estrógeno mas sim uma diminuição significativa quando comparamos os resultados dos animais tratados com óleo.

Ao final da gestação verificamos que os níveis de estrógeno e ocitocina aumentam e que os níveis de progesterona diminuem. De acordo com Murata et al. (2003) o estrógeno estimula a expressão de ARNm de receptores de ocitocina (OTr) no útero em ratas ovariectomizadas e, aparentemente o mesmo ocorre no SNC aumentando a liberação de ocitocina.

Rossi et al. (2010) demonstraram que o uso de agonista dos receptores ERβ é capaz de levar a dessensibilização do autoreceptor 5-HT1A aumentando desta forma a mobilização e liberação de serotonina (5-HT). Popova et al. (2010) verificaram que a ativação a longo prazo dos receptores 5-HT1A com agonista seletivo leva a uma considerável queda do ARNm da TPH2 no mesencéfalo de camundongos. No entanto, não existem pesquisas que mostrem quais mecanismos ocorrem após estimulação serotoninérgica a longo prazo e com altas doses de estrógeno. Com estudos futuros pretendemos compreender se esse seria um mecanismo de controle homeostático específico do sistema serotoninérgico como uma tentativa de diminuir a liberação do neurotransmissor, mediante redução da expressão de ARNm para TPH2.

Há também outros estudos que reportam que o estrógeno é um fator de proteção cardiovascular e alguns estudos que relatam casos de hipertensão pós-menopausa, já que em condições de déficit estrogênico é comum que mulheres no climatério mudem seus hábitos alimentares, dentre eles, a adição de mais sódio ao alimento. Nosso estudo também pretende contribuir com experimentos que ajudem na compreensão dos mecanismos envolvidos entre homeostase hidroeletrólítica, déficit estrogênico, terapia estrogênica e pressão arterial.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

- a) Avaliar o efeito da administração de diferentes doses de cipionato de estradiol nas alterações hidroeletrólíticas de ratas Wistar ovariectomizadas.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Avaliar o efeito do estradiol sobre o apetite ao sódio, sede, natriurese, sódio plasmático, volume urinário, sódio urinário e índice uterino condições basais e após depleção de sódio;
- b) Avaliar a ingestão alimentar diária e o peso corporal diário em condições basais e verificar se a reposição estrogênica em diferentes doses pode alterar esses parâmetros.
- c) Realizar a dosagem dos níveis de estradiol plasmáticos e relacioná-los com a dose de hormônio administrada em ratas ovariectomizadas.

3.0 Material e métodos

3.0.1 Animais e Manutenção

Este trabalho foi conduzido conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH Publicação N° 85-23, revisado 1996) e os protocolos experimentais avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em consonância com a Lei AROUCA 11794 de 8 de outubro de 2008. (Processo n° 23083.011699/2013-99).

Foram utilizadas 120 ratas da linhagem Wistar, adultas (~230 g, ± 60 dias), e provenientes do Biotério Experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Destes animais, 64 fêmeas foram utilizadas nos protocolos de avaliação em gaiolas metabólicas e 56 fêmeas foram utilizadas nos protocolos de coleta de sangue e de cérebro. Os animais foram mantidos em caixas coletivas (5 animais por caixa), aclimatados à temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz 7:00-19:00h). Os animais tiveram acesso à água e alimento *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no período da manhã, entre 09:00 – 12:00 horas. Para avaliação de ingestão de água e de solução salina hipertônica (NaCl 1,8%), ingestão de ração moída, volume urinário, excreção renal de sódio, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas, nas quais foram aclimatados por 5 dias antes do experimento.

Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, seguindo o “princípio dos 3R” para reduzir o número de animais utilizados no estudo e otimizar os protocolos experimentais de modo a obter o máximo de dados de cada animal testado.

3.0.2 Procedimentos cirúrgicos

Todas as cirurgias foram realizadas sob plano anestésico induzido cetamina (Vetbrands, Brasil, 60 mg/kg, i.p.) combinada com xilazina (Bayer, Brasil, 7,5 mg/kg, i.p.) sendo seguidas de doses profiláticas de pentabiótico veterinário (0,2 mL/rata, i.m., Fort Dodge) para evitar possíveis infecções.

3.0.2.1 O modelo experimental de ovariectomia e seu aspecto translacional

A menopausa é definida como um período em que a síntese de hormônios gonadais está reduzida, bem como a produção de folículos ovarianos, sendo que na mulher esse processo se dá por volta dos 51 anos.

Em modelos experimentais não podemos dizer que as ratas possuem a fase de menopausa, pois elas não possuem ciclo menstrual, e sim ciclo estral. Então, desse modo, só poderemos denominar tal fase como período de déficit na síntese de hormônios gonadais ou insuficiência ovariana primária, que ocorre nos modelos de estudo da senescência natural, que na rata ocorre por volta de um ano e meio a dois anos de vida. O termo “menopausa” é referido em experimentação com o objetivo de evidenciar o aspecto translacional do modelo.

De modo artificial, reproduzimos em laboratório o modelo de insuficiência gonadal, mediante a cirurgia de ovariectomia, em que os ovários são retirados para reduzir os níveis plasmáticos de estrógeno endógeno e com isso poderemos avaliar os efeitos da reposição hormonal em diversos parâmetros de interesse.

Em nosso protocolo experimental a ovariectomia bilateral (OVX) foi realizada em ratas adultas, por um acesso para-costal e em condições assépticas. Após indução anestésica com a perda dos reflexos medulares, os animais foram submetidos à tricotomia e, em seguida, foi realizada uma incisão bilateral da pele entre a última costela e a coxa. Posteriormente, o tecido subcutâneo e a musculatura foram divulsionados com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas, para visualização dos ovários. Os ovários foram exteriorizados e foi realizada a ligadura das trompas

uterinas, artérias e veias ovarianas, seguida da remoção dos ovários. Por fim, foi realizada a sutura da musculatura e pele.

3.0.3 Protocolo de reposição hormonal

3.0.4 Tratamentos hormonais e doses

Com o intuito de verificar se há efeito dose – dependente nos parâmetros avaliados utilizamos neste estudo diferentes doses de cipionato de estradiol (Pfizer, Saúde Animal) para um estudo comparativo entre doses infra-fisiológicas (2,5 µg/kg), fisiológicas (10 µg/kg) e supra-fisiológicas (40 µg/kg) em ratas ovariectomizadas com e sem reposição hormonal pelo período de 7 dias de tratamento. Sierra-Ramirez, et al. (2011) avaliaram a farmacocinética e a farmacodinâmica do cipionato de estradiol sob duas diferentes vias de administração (subcutânea e intramuscular). No entanto, a informação sobre a meia-vida do hormônio é citada na espécie humana, mas não está muito clara neste artigo.

De acordo com a literatura, a dose de 2 µg/kg (Geary & Asarian, 1999) é capaz de produzir níveis plasmáticos de estradiol similares aos níveis de pico encontrados durante o ciclo ovariano de ratas intactas, sendo capaz de diminuir a ingestão de alimento e retomar o peso corporal à normalidade (BUTCHER et al., 1974; CECCHINI, et al., 1983; LU et al., 1985).

Dados publicados na literatura suportam evidências que 10 µg/kg (2,5 µg/rata) de estrógeno (Liu et al., 2013; Vilhena-Franco et al., 2011; Silva et al. 2010) é uma dose suficiente para reposição estrogênica em condições fisiológicas similares à concentração de estradiol encontrada em ratas durante o proestro. Esse dado foi confirmado por Smith et al. (1975) que verificou que a dose de 2,0 µg/rata a cada 4 dias é a dose de reposição em que os níveis de estradiol são encontrados na manhã do proestro. Mecawi et al. (2011) verificou que ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno com doses de 10 µg/kg e 40 µg/kg e que foram submetidas à hemorragia apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina.

3.0.5 Tratamento com cipionato de estradiol

No dia da cirurgia de ovariectomia os animais foram pesados previamente para homogeneização dos grupos experimentais. O grupo tratado recebeu diferentes doses de estrógeno que foram administradas de acordo com o peso corporal, sendo que o volume administrado não excedeu 0,13 ml para as ratas mais pesadas, sendo que o volume mínimo administrado era de 0,1 ml. Todas as administrações foram feitas pela via subcutânea e realizadas diariamente, entre 9:00 e 12:00 horas, tendo início 24 horas após a ovariectomia, e prosseguindo durante 7 dias, com o objetivo de mimetizar a terapia estrogênica da mulher em menopausa. O tratamento com estrógeno foi realizado com cipionato de estradiol (ECP, Pfizer Saúde Animal) diluído em óleo de milho filtrado. Previamente às injeções os animais foram pesados na balança analítica (modelo Helmac 1000) e seus pesos foram divididos por 2, já que a concentração da solução preparada era o dobro da dose. Após a divisão do peso o valor resultante sofria uma aproximação matemática.

Dessa forma teremos quatro grupos experimentais: OVX-óleo, E2 2,5, E2 10, E2 40.

3.0.5.1 Preparação das alíquotas de estrógeno

Considerando que o frasco original de cipionato de estradiol (Pfizer, Saúde Animal) contém 2 mg de estradiol em cada ml, objetivamos preparar 3 alíquotas que correspondem às seguintes doses administradas: 40 µg/kg (solução 1), 10 µg/kg (solução 2) e 2,5 µg/kg (solução 3) ou administração de veículo (óleo de milho filtrado). As soluções de estradiol foram preparadas para o dobro da concentração desejada para que o volume administrado aos animais fosse reduzido a aproximadamente 0,1 ml por animal.

Realizamos as diluições a partir do frasco original, utilizando a seguinte fórmula, em que:

$$C1.V1 = C2.V2$$

C1- concentração do frasco inicial (µg/ml)

V1- volume do frasco inicial (ml)

C2- concentração do frasco final (µg/ml)

V2- volume do frasco final (ml)

Primeira etapa - Preparo da Solução 1 – 40 µg/kg (10 µg/rata)

Colocamos 0,4 ml do estrógeno do frasco original (Pfizer , Saúde Animal) e adicionamos 9,6 ml de óleo de milho filtrado, totalizando 10 ml.

Segunda etapa – Preparo da Solução 2 – 10 µg/kg (2,5 µg/rata)

Colocamos 0,1 ml do estrógeno do frasco original (Pfizer, Saúde Animal) e adicionamos 9,9 ml de óleo de milho filtrado, totalizando 10 ml.

Terceira etapa – Preparo da Solução 3 – 2,5 µg/kg (0,625 µg/rata)

Colocamos 0,1 ml do estrógeno do frasco original (Pfizer, Saúde Animal) e adicionamos 39,9 ml de óleo de milho filtrado, totalizando 40 ml.

3.0.6 Avaliação das ingestões de água e solução salina hipertônica (NaCl 1,8%)

Ratas OVX normovolêmicas e normohidratadas foram previamente adaptadas às gaiolas metabólicas por cinco dias. Os animais receberam em suas gaiolas dois bebedouros volumétricos individuais graduados em 0,1 ml, um contendo água e o outro, NaCl 1,8%, e comedouros contendo ração moída *ad libitum* ,previamente pesada,até o final do experimento. A ingestão dos fluidos foi avaliada diariamente, por 7 dias, em ciclos de 24 horas. Posterior a esta avaliação, foi calculado o índice de preferência por sódio: (ingestão de NaCl 1,8% / ingestão de água + ingestão de NaCl 1,8%) x 100 (FRANKMANN et al., 1986).

Para avaliação do efeito da terapia estrogênica no apetite e na saciedade ao sódio e à água utilizamos o protocolo da furosemida que consiste num protocolo de depleção de volume e de depleção corpórea de íons sódio através da administração do diurético de alça , furosemida (20 mg/Kg, s.c.) mais dieta pobre em sódio. Durante as 24 horas anteriores ao experimento os animais tiveram acesso à água destilada e dieta pobre em NaCl e condicionados em gaiolas

metabólicas. No dia seguinte , após 24 horas de depleção de sódio foi realizada a reapresentação dos fluidos colocando bebedouros individuais contendo NaCl 1,8% e água filtrada que foram oferecidos aos animais depletados de sódio. Em seguida, a ingestão dos fluidos foi avaliada cumulativamente por 300 minutos. Nos protocolos sob condições basais, depleção de sódio e de reapresentação de fluidos foram utilizados os mesmos animais em sequência.

3.0.7 Avaliação do volume urinário e osmolalidade urinária e plasmática

O volume urinário foi avaliado diariamente sob condições basais a partir do primeiro dia da terapia estrogênica. Após a depleção de sódio com furosemida o volume urinário foi avaliado 2 horas após a depleção de sódio, 24 horas após a depleção e 2 horas após início da avaliação de ingestão de fluidos.

Após as coletas das amostras de urina realizadas em gaiolas metabólicas. Também foi coletado o plasma no 8º dia do experimento 24 horas após depleção de sódio. A osmolalidade das amostras de sangue e urina foi determinada por meio do osmômetro. Para uniformizar os resultados, e para comparação entre médias dos diferentes grupos, os dados obtidos foram expressos em mOsm/kg H₂O/ para osmolalidade.

3.0.8 Avaliação do sódio plasmático

O conteúdo de sódio das amostras de plasma 24 horas após depleção de sódio foi determinado por meio de fotometria de chama (Modelo Micronal B462). Para uniformizar os resultados, e para comparação entre médias dos diferentes grupos, os dados obtidos foram expressos em $\mu\text{Eq/L}$ para excreção de sódio. Os dados de sódio urinário diário, 24 horas após a depleção de sódio e 2 horas após reapresentação de fluidos estão em análise. A diluição das amostras de plasma foi 1:100 e das amostras de urina foi 1:200 num volume total de 3 ml em cada leitura.

3.1 Avaliação do índice hipofisário e uterino

Após a eutanásia dos animais, as hipófises e os úteros foram coletados inteiros para obtenção do peso úmido desses tecidos e assim realizar a determinação dos seus respectivos índices absolutos para validação das cirurgias e reposições hormonais.

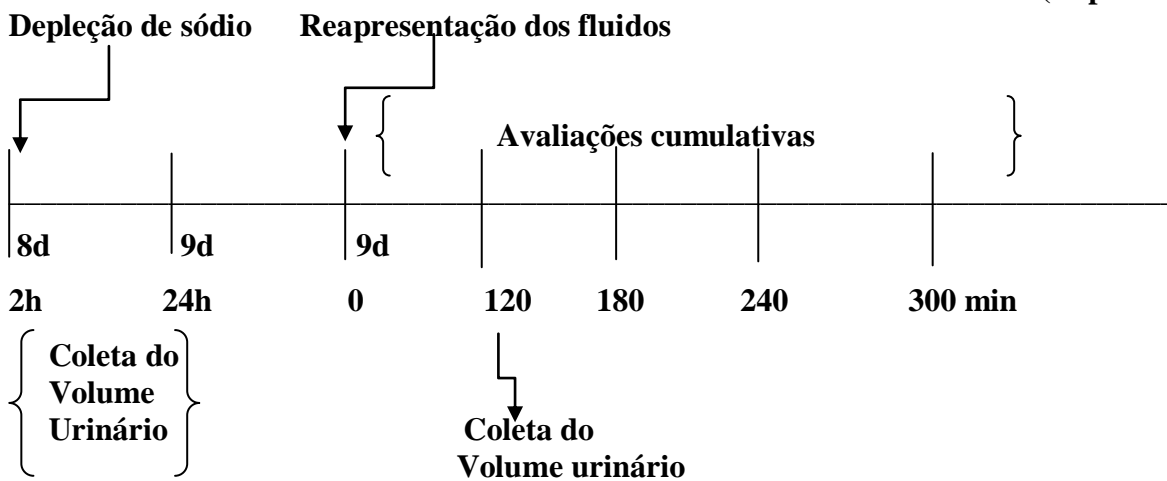
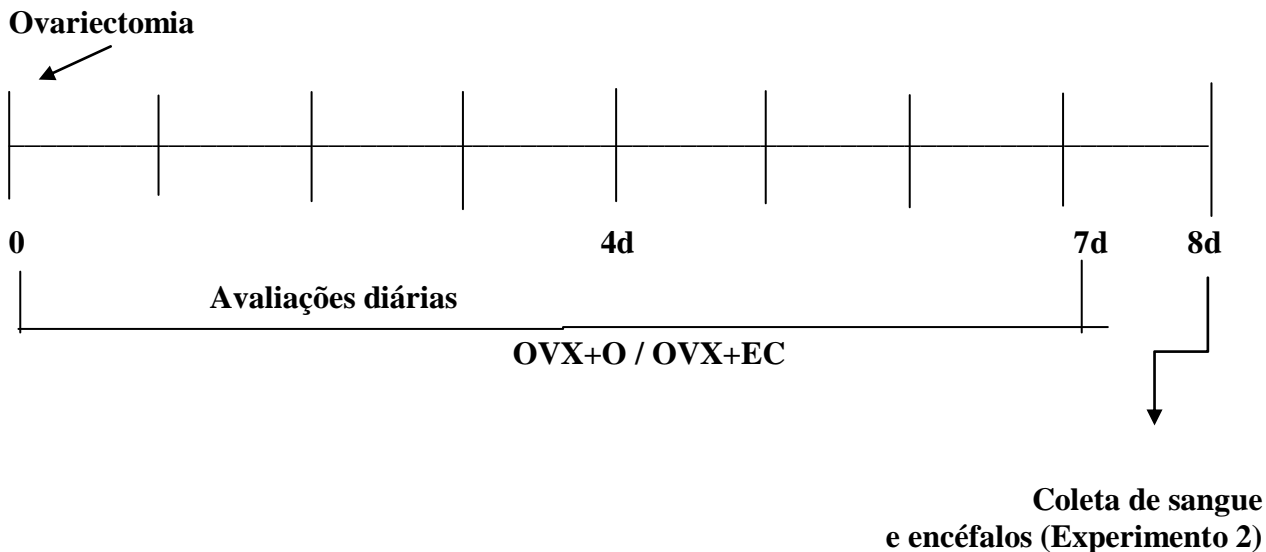
4.0 Protocolos experimentais

4.1 Experimento 1 – Efeito do tratamento com estradiol sobre o apetite ao sódio, sede, índice uterino e hipofisário em ratas OVX controle e ratas OVX tratadas com estrógeno

Ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia foram avaliadas diariamente em gaiolas metabólicas quanto à ingestão de água e de salina hipertônicas que foram ofertadas aos animais em buretas volumétricas individuais. Para avaliação da influência estrogênica nos comportamentos dispsogênicos e natriorexigênicos sob condições basais, após depleção de sódio com furosemida e após reapresentação de água e salina hipertônica (1,8%). No último dia de reposição hormonal os animais foram submetidos ao protocolo de depleção de íons sódio e no dia seguinte os mesmos animais passaram pelo protocolo de reapresentação dos fluidos para avaliação das ingestões cumulativas. Ao final das avaliações os animais foram decapitados e coletados os úteros e a hipófise para avaliação do índice uterino e hipofisário, respectivamente. Essa avaliação permite verificar a eficácia dos tratamentos hormonais, sendo realizada pela divisão do peso do órgão pelo peso do animal.

4.1.2 Desenho experimental

Experimento 1



5.0 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados usando o programa Graphpad Prism 6.0 (San Francisco, USA) e submetidos ao teste de Grubbs que identifica pelo menos um outlier. Posteriormente foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Após verificar que os dados apresentavam distribuição normal foi realizado o teste ANOVA de medidas repetidas, ANOVA two way ou ANOVA one-way, seguido de pos-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 5\%$). Consideraremos o efeito dose dependência sempre que houver diferença do grupo tratado comparado ao controle.

6.0 Resultados e discussão

6.1 Avaliação da influência da ovariectomia e reposição hormonal sobre o peso corporal

Apresentamos a seguir a tabela 1 que se relaciona à figura 1 (Avaliação do peso corporal diário) em que caracterizamos as diferenças em comparação ao grupo controle e também as diferenças entre as doses hormonais.

Tabela 1. Peso corporal Comparações de grupos	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
E2 40 vs. óleo	229,57 ± 3,59 vs. 232,39 ± 5,04 *p<0,05	230,55 ± 3,90 vs. 234,60 ± 5,07 *p< 0,0001	229,80 ± 3,64 vs. 236,76 ± 5,1 *p< 0,0001	230,22 ± 3,54 vs. 238,99 ± 5,15 *p<0,0001	231,71±3,46 vs. 242,48 ± 5,09 *p< 0,0001
E2 10 vs. óleo	228,35 ± 5,38 vs. 232,39 ± 5,04 *p< 0,001	228,95 ± 5,18 vs. 234,60 ± 5,07 *p< 0,0001	228,87 ± 5,27 vs. 236,76 ± 5,1 *p< 0,0001	228,92 ± 5,27 vs. 238,99 ± 5,15 *p< 0,0001	228,41 ± 5,18 vs. 242,48 ± 5,09 *p< 0,0001
E2 2,5 vs. E2 10	232,45 ± 3,01 vs. 228,35 ± 5,38 ϕ p<0,001	235,20 ± 2,64 vs. 228,95 ± 5,2 ϕ p<0,001	235,57 ± 2,38 vs. 228,87 ± 5,27 ϕ p<0,001	238,02 ± 2,7 vs. 228,92 ± 5,26 ϕ p<0,0001	239,87 ± 2,86 vs. 228,41 ± 5,18 ϕ p<0,0001
E2 2,5 vs. E2 40	232,45 ± 3,01 vs. 229,57 ± 3,59 θ p<0,05	235,20 ± 2,64 vs. 230,55 ± 3,9 θ p< 0,0001	235,5 ± 2,38 vs. 229,80 ± 3,64 θ p<0,0001	238,02 ± 2,7 vs. 230,22 ± 3,5 θ p< 0,0001	239,87 ± 2,86 vs. 231,71 ± 3,46 θ p<0,0001

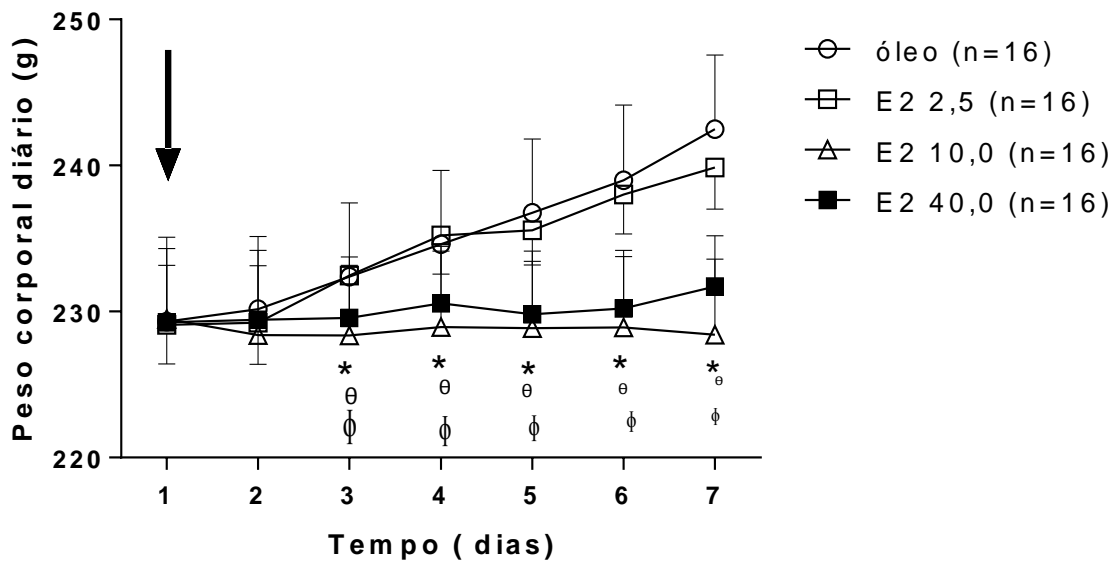


Fig 1. Avaliação do peso corporal diário sob condições basais. Dados expressos como médias±SEM, em que *(asterisco) representa a comparação com o grupo óleo, ϕ (phi) representa a comparação entre E2 2,5 e E2 10, θ (theta) representa a comparação entre E2 2,5 e E2 40. Os valores de médias±SEM, bem como os níveis de significância (valores de P) podem ser consultados na tabela 1. Os dados foram analisados por anova two way medidas repetidas, seguido de post-teste de Bonferroni. A seta indica o início do tratamento.

Neste gráfico vimos que o peso corporal diário dos animais tratados com as doses de E2 10 e E2 40 diferem do controle a partir do 3º dia de tratamento e se mantém reduzido até o final do tratamento, o que caracteriza que o estradiol, provocou um efeito dose-resposta neste parâmetro de estudo. Já o grupo que recebeu a dose mais baixa (2,5 µg/kg) apresentou acréscimo de peso no decorrer do tempo assim como o grupo controle. Observamos também que o grupo tratado com a dose de (40 µg/kg) apresentou um pequeno aumento de peso corporal em relação à dose de 10 µg/kg no 7º dia de avaliação. Esse resultado que poderia ser devido à retenção líquida que ocorre em níveis estrogênicos elevados não se confirmou.

Sabemos que fêmeas tendem a acumular mais gordura no tecido subcutâneo e machos tendem a acumular gordura no tecido visceral.

De acordo com a literatura o estradiol atua por mecanismos complexos e pouco compreendidos pelos quais ele altera o metabolismo energético, produção de calor, composição corporal (Toth et al. 2001) e atividade locomotora.

O estrógeno influencia o gasto energético modulando a temperatura corporal e a termogênese. Além disso pode atuar sobre a mobilização de gordura, modificando também o perfil lipídico (níveis de colesterol e de triglicerídeos), além de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial.

Gao et al. (2008) mencionam que o estrogênio e a leptina podem interagir via estatina 3 (STAT 3), regulando genes em comum em regiões hipotalâmicas relacionadas a homeostase energética e reprodução.

Assim, a perda de peso promovida pelos hormônios gonadais é elaborada por um amplo conjunto de fatores envolvendo queda na expressão de neuropeptídios orexigênicos e aumento dos anorexigênicos (SILVA et al. 2011). Além disso Donner & Handa (2009) evidenciaram que aumento da TPH2 e conseqüentemente da síntese de serotonina é mediada pelo receptor estrogênico beta (Erβ). A ativação desse sistema também é um estímulo para saciedade. E também o aumento do consumo de oxigênio (GAO et al. 2007) e do estresse oxidativo (PUERTA et al. 1998), aumento da mobilização de gordura e um dos mecanismos seria por β-oxidação. Todos esses fatores somados resultam em saciedade e perda de peso.

6.2 Avaliação do efeito da ovariectomia e da reposição hormonal sobre o peso uterino e o peso hipofisário

A seguir apresentamos a tabela 2 que se relaciona com a figura 2 (avaliação do peso uterino). Nesta tabela inserimos as diferenças em relação ao grupo controle, caracterizando assim um fenômeno de dose-dependência.

Tabela 2: Peso uterino	
E2 40 vs. óleo	0,69 ± 0,19 vs. 0,22 ± 0,04g, *p<0,0001
E2 10 vs. óleo	0,69 ± 0,15 vs. 0,21 ± 0,04 g, *p<0,0001
E2 2,5 vs. óleo	0,61 ± 0,1 vs. 0,21 ± 0,04 g , *p<0,001

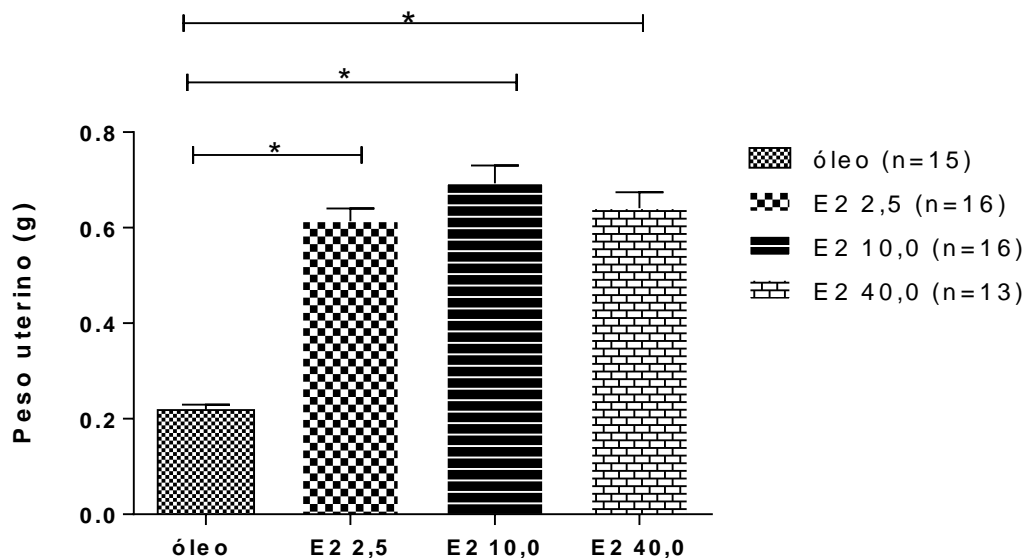


Fig.2 Avaliação do peso uterino absoluto. Anova one way, seguido de pos-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média±SEM. O símbolo* (asterisco) representa a comparação com o grupo óleo. Retornar à tabela 2 (Peso uterino) para consulta.

A avaliação do peso uterino foi importante em nosso estudo como forma de comprovar a eficácia cirúrgica bem como o efeito da reposição estrogênica no tecido uterino. Sabe que a resposta uterina ao estrógeno e no sentido de aumentar o conteúdo de líquido uterino, bem como promover um aumento no tamanho do útero. Essa resposta ocorre principalmente pela grande quantidade de receptores estrogênicos expressos no útero. Assim, observamos que com uma baixa dose do hormônio (2,5 µg/kg) já houve a resposta máxima.

Nakajima, et al. (2015) evidenciou que o receptor estrogênico α (ER α) desempenha um importante papel na proliferação do epitélio uterino. No entanto o receptor estrogênico β (ER β) inibe a proliferação.

Apresentamos a seguir a tabela 3 (Peso hipofisário) que se relaciona com a figura 3 (Avaliação do peso hipofisário). Nesta tabela inserimos as diferenças em relação ao grupo controle, caracterizando assim um fenômeno de dose-dependência.

Tabela 3. Peso hipofisário	
E2 40 vs. óleo	0,022 ± 0,026 vs. 0,009 ± 0,002 g, *p<0,0001
E2 10 vs. óleo	0,014 ± 0,003 vs. 0,009 ± 0,002 g, *p<0,0001
E2 2,5 vs. óleo	0,014 ± 0,003 vs. 0,009 ± 0,002 g, *p<0,0001

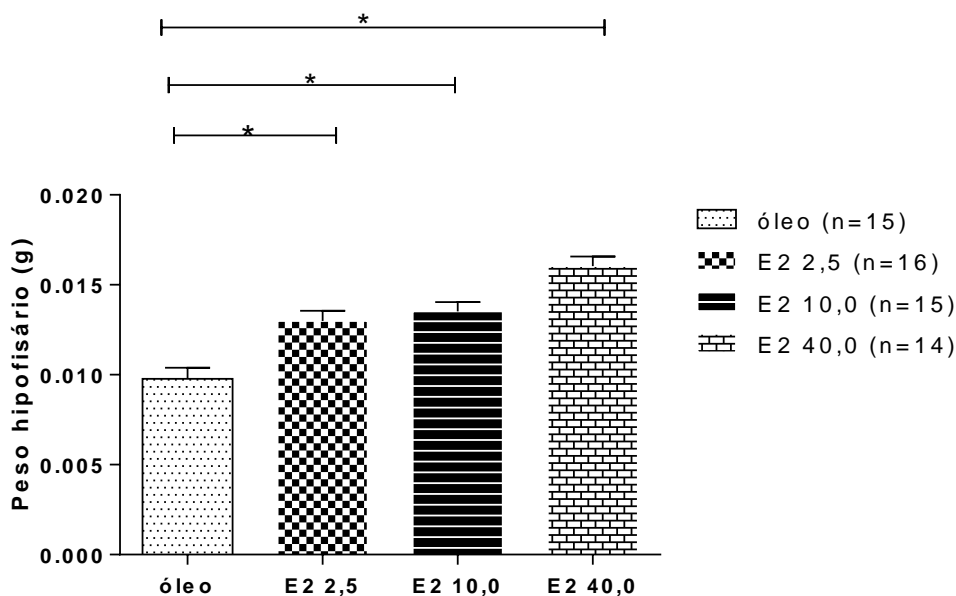


Fig. 3 Avaliação do peso hipofisário absoluto. Anova one way, seguido de pos-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média±SEM. O símbolo* (asterisco) representa a comparação com o grupo óleo. Retornar à tabela 3 (Peso hipofisário) para consulta.

Neste gráfico vemos que o estrógeno foi capaz de promover um efeito dose-resposta na hipófise, caracterizado pelo aumento progressivo do peso da glândula em função da dose, quando comparamos ao grupo controle. A avaliação do índice hipofisário é mais um parâmetro que contribui para confirmar o protocolo de reposição hormonal.

O estrógeno também é capaz de aumentar a atividade mitótica nos lactotrofos da adenohipófise e conseqüentemente aumentar o peso da glândula hipofisária. Um aumento dose-dependente no índice mitótico foi observado após 7 dias do início do tratamento, representando uma aceleração da atividade mitótica de 1,7 % por dia em ratas ovariectomizadas na ausência de

reposição estrogênica e 3,7% por dia na presença de uma dose farmacológica de 50 µg/rata/dia ou 230 µg/kg/ dia, sendo esta uma dose suprafisiológica (LONAN & LEVY, 2009).

6.3 Avaliação do comportamento ingestivo de água e salina hipertônica sob condições basais em função da dose hormonal administrada

Não foi observada dose dependência na avaliação de ingestão de água em relação ao controle, logo não há representação de dados significativos em relação ao controle, no entanto observamos diferença entre doses de estradiol que pode ser observada a seguir na tabela 4.

Tabela 4. Ingestão basal de água Comparações de grupos	2° dia	3° dia
E2 10 vs. E2 40	8,27±0,59 vs. 6,52 ± 0,56 Ψ p<0,01	9,96 ±0,54 vs. 8,31 ±0,45 Ψ p< 0,01
E2 2,5 vs. E2 40	7,88± 0,52 v.s .6,52 ±0,56 ,θ p<0,05	—————

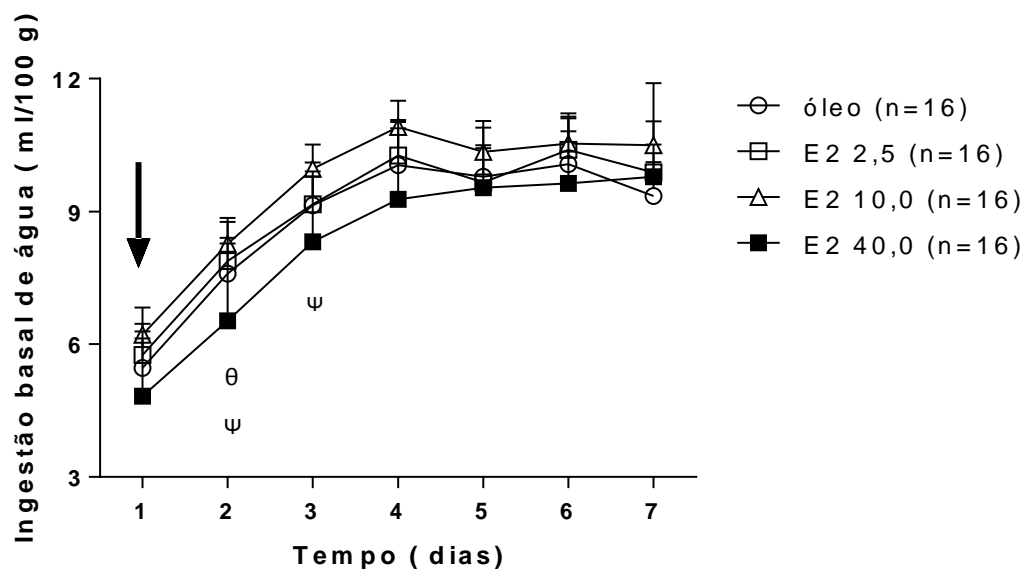


Fig. 4 Avaliação da ingestão de água diária. Anova two way medidas repetidas, seguido de post-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média±SEM. Dados expressos como médias±SEM, em que Ψ (psy) representa a comparação entre E2 10 e E2 40, θ (theta) representa a comparação entre E2 2,5 e E2 40. Os valores de médias±SEM, bem como os níveis de significância (valores de P) podem ser consultados na tabela 4. Os dados foram analisados por anova two way medidas repetidas, seguido de post-teste de Bonferroni. A seta indica o início do tratamento.

Kisley et al. (1999) evidenciaram que o estradiol atenuou a ingestão de água de forma dose-dependente em fêmeas da linhagem Sprague-Dawley e observou diferença significativa neste parâmetro em relação ao controle. No entanto, nosso estudo utilizou ratas da linhagem Wistar e não reproduziu a diferença em comparação ao controle. No entanto, conseguimos verificar que houve diferença entre as doses hormonais.

Graves et al. (2011) evidenciaram num modelo de sede induzida por isoproterenol que o estrógeno atenua a ingestão de água. Neste trabalho também foi avaliada a latência para que tal resposta possa acontecer. Cerca de 90 minutos após a injeção subcutânea de 10 $\mu\text{g}/\text{rata}$ de estrógeno não foi observado nenhum efeito, no entanto a partir de 24 horas da injeção foi observada uma redução da ingestão de água que continuou até 48 horas após a administração do hormônio. Nesse contexto, os autores consideraram os efeitos após 24 horas como resultado das ações genômicas do estradiol.

Findlay et al. (1979) realizaram um estudo em ratas ovariectomizadas e tratadas com 20 µg de benzoato de estradiol no modelo de sede induzida por isoprenalina e também pelo aumento da hipertonicidade com injeção subcutânea de salina hipertônica (2%). Neste trabalho foi demonstrado que a sede de origem extracelular ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona que responde a diferentes mecanismos induzidos por desidratação. Os autores evidenciaram que somente o comportamento ingestivo causado pela ativação de mecanismos extracelulares parece ser mais sensível às variações do ciclo ovariano e aos hormônios ovarianos.

No entanto, em condições basais, embora sem alterações significativas, observamos que a dose intermediária (10 µg/kg) apresentou um aumento não significativo na ingestão de água durante todo o período de avaliação. Já o grupo que recebeu a dose alta (40 µg/kg) apresentou um aumento não significativo. Desse modo, podemos supor que em níveis estrogênicos altos poderia haver downregulation dos receptores AT1, o que impossibilitaria os efeitos dipsogênicos da angiotensina II.

Em relação à ingestão basal de salina hipertônica não observamos efeito dose-resposta neste parâmetro, mas no grupo que recebeu a dose de 10 µg/kg verificamos que houve uma redução não significativa o consumo de salina. Esse dado já é bem conhecido na literatura.

A seguir apresentamos a tabela 5 que se refere à figura 5 (Ingestão basal de salina hipertônica). Não observamos dose dependência em relação ao grupo controle, mas houve diferença quanto à ingestão de salina entre as doses do hormônio.

Tabela 5. Ingestão basal de salina (1,8%) Comparações de grupos	2º dia	4º dia	5º dia
E2 10 vs. E2 40	1,29 ± 0,16 vs. 3,01 ± 0,42 Ψ p < 0,01	1,35 ± 0,33 vs. 3,7 ± 0,65 Ψ p < 0,0001	1,29 ± 0,31 vs. 2,79 ± 0,57 Ψ p < 0,05
E2 2,5 vs. E2 10	—————	2,9 ± 0,58 v.s 1,35 ± 0,3 ϕ p < 0,05	—————

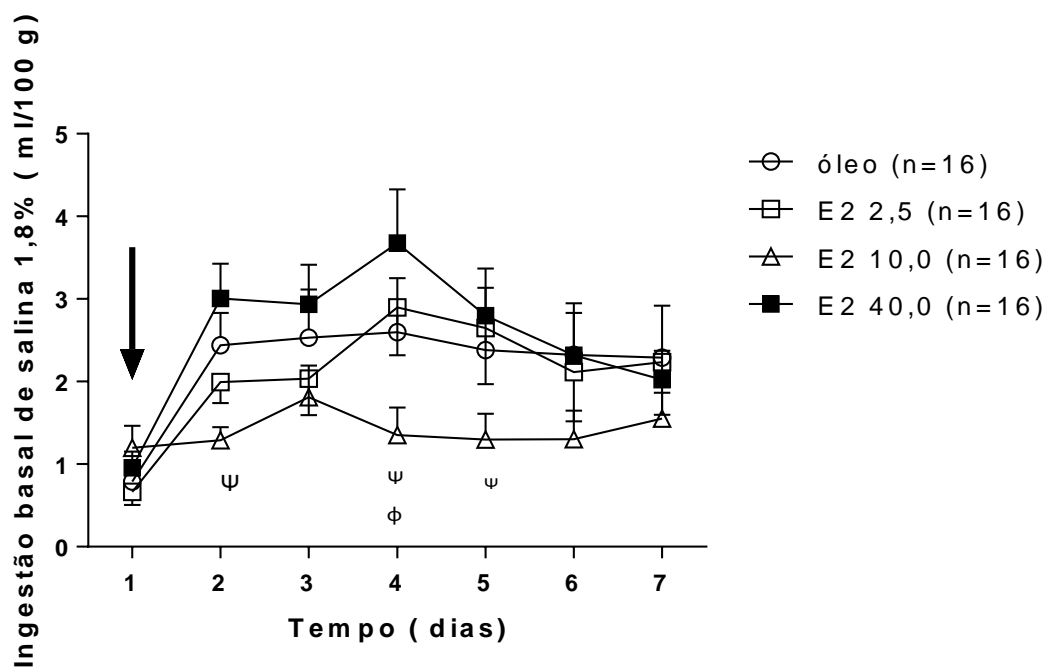


Fig. 5 Avaliação diária da ingestão basal de salina hipertônica (1,8%) sob condições basais. Anova two way medidas repetidas, seguido de pos-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média±SEM. Dados expressos como médias±SEM, em que Ψ (psy) representa a comparação entre E2 10 e E2 40, ϕ (phi) representa a comparação entre E2 2,5 e E2 10. Os valores de médias±SEM, bem como os níveis de significância (valores de P) podem ser consultados na tabela 5. Os dados foram analisados por anova two way medidas repetidas, seguido de post-teste de Bonferroni. A seta indica o início do tratamento.

Sabemos que o estrógeno aparentemente desempenha um claro efeito anti-dipsogênico e anti-natriurexigênico agudamente. No entanto, na dose de (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em que provavelmente os níveis plasmáticos de estrógeno estavam elevados observamos que essa dose não promoveu uma queda na ingestão de salina hipertônica como era esperado e sim um aumento do consumo.

Além disso se trata de uma dose muito alta de estrógeno provavelmente poderíamos supor que os níveis plasmáticos do hormônio estariam elevados assim como ocorre na gestação. Pike et al. (1971) evidenciou que o consumo de salina hipertônica aumenta muito pela necessidade do sódio para formação fetal.

Sabemos que o núcleo dorsal da rafe possui um importante papel no controle do apetite ao sódio (Franchini et al. 2002; Badaue-Passos et al. 2007; Reis, 2007) e também há dados da literatura que suportam a possibilidade de o estrogênio dessensibilizar receptores 5-HT_{1A} no núcleo paraventricular (Creech et al. 2012). Não sabemos se essa dessensibilização também poderia estar ocorrendo em neurônios do NDR.

Além disso, estudos translacionais em mulheres demonstraram que a hipertensão é duas vezes mais prevalente em mulheres na pós-menopausa e que essa prevalência é reduzida pela terapia hormonal (SCUTERI, et al. 2001).

Em nosso estudo observamos que níveis estrogênicos altos (40 µg/kg) levam ao aumento no consumo de salina hipertônica e não em sua redução. Com isso, podemos supor que a médio e longo prazo o uso de terapias de reposição hormonal pode ser um fator predisponente à hipertensão. Assim como o uso prolongado de contraceptivos poderia levar ao mesmo efeito.

O mecanismo pelo qual o estrógeno aumenta a ingestão espontânea de salina hipertônica pode estar associado à vasodilatação promovida pelo estrógeno. O estrogênio pode influenciar a atividade de células endoteliais via mecanismos genômicos e não genômicos. Ao se ligar ao ER α , estrogênios aumentam a produção de agentes vasodilatadores como óxido nítrico, prostaciclina e prostaglandina E₂ (DARBLADE et al. 2002; VEGETO et al. 2003). Desse modo, em doses altas do hormônio haveria uma queda na pressão arterial e como mecanismo compensatório os animais aumentariam o consumo de salina hipertônica.

A seguir apresentamos a Tabela 6 (ingestão de alimento) que se relaciona com a figura 6 (Avaliação da ingestão alimentar).Caracterizamos a seguir as diferenças em relação ao grupo controle, o que evidenciou um efeito de dose-dependência neste parâmetro.

Tabela 6. Ingestão alimentar Comparações de grupos	4º dia	5º dia	6º dia
E2 40 vs. óleo	6,17 ± 0,25 vs. 7,13 ± 0,21 *p<0,01	6,85 ± 0,22 vs. 7,62 ± 0,24 *p<0,05	8,01 ± 0,21 vs. 6,81 ± 0,19 *p<0,001
E2 10 vs. óleo	_____	_____	8,01 ± 0,21 vs. 7,17 ± 0,28 *p<0,05

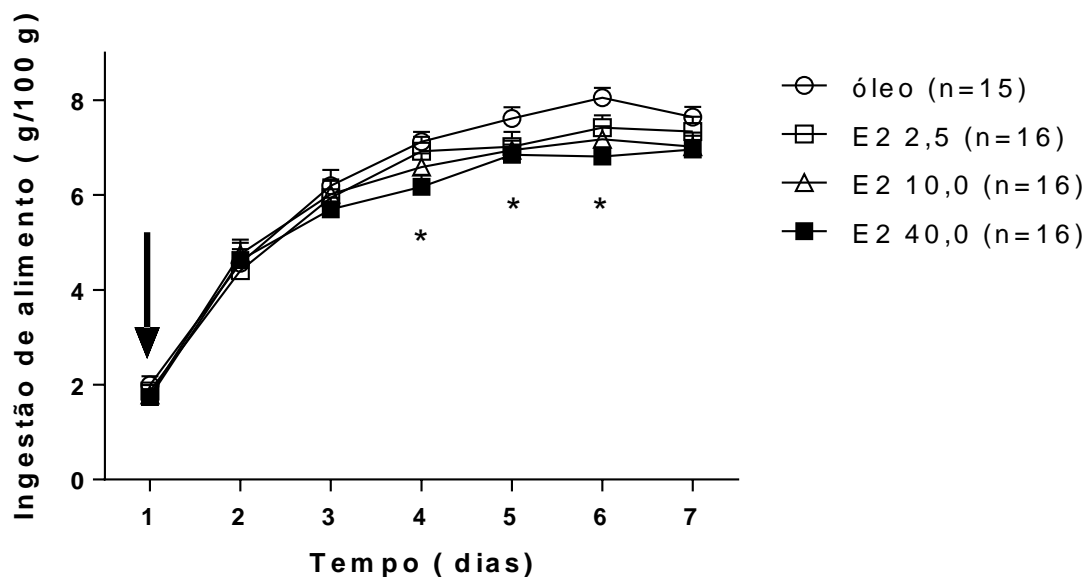


Fig 6. Avaliação diária da ingestão de ração moída sob condições basais. Anova two way medidas repetidas, dados expressos por médias ± SEM. O símbolo * (asterisco) refere-se às comparações com o grupo óleo. Retornar à tabela 4 para consulta dos valores de P.

Desse modo observamos que houve redução no consumo alimentar no grupo E2 40, sendo que esse consumo foi inferior ao grupo E2 10, o que caracteriza que o nível estrogênico alto deprime mais o sistema regulador da ingestão alimentar.

Silva et al. (2010) evidenciou que ratas ovariectomizadas e tratadas com 10 µg/kg de cipionato de estradiol por 8 dias apresentavam hipofagia. Neste trabalho foi demonstrado que tal efeito poderia ser mediado por neuropeptídeos orexigênicos como neuropeptídeo Y (NPY),

peptídeo agouti relativo (AgRP) e orexina A, cuja expressão estava reduzida e pela expressão aumentada de mediadores anorexigênicos como melanocortina 4 (MC4), leptina e CRH.

De acordo com a literatura fêmeas em estro são mais sensíveis do que machos ou do que fêmeas intactas em diestro ao efeito anorexigênico de agonistas serotoninérgicos como a fenfluramina (RIVERA, et al. 2005). Além disso, a administração exógena de E2 aumenta o efeito anorexigênico em ratas OVX (ECKEL, et al. 2005), sugerindo que os efeitos anorexigênicos da fenfluramina relacionados ao estro também podem ser mediados pelo estrógeno endógeno. Além disso, o estrógeno aumenta a expressão de Pet-1 e de transportadores de serotonina, que poderiam estar implicados na regulação de neurônios serotoninérgicos no DRN durante o mesmo período em que o E2 diminui a ingestão de alimento e o peso corporal em ratas OVX (RIVERA, et al. 2005). O sistema serotoninérgico também participa do controle do comportamento alimentar e pode ser influenciado pelo estradiol. Rivera et al. (2012) demonstraram que receptores serotoninérgicos tipo 2C (5-HT_{2C}) pós-sinápticos desempenham importante papel em mediar os efeitos anorexigênicos do estradiol no sistema serotoninérgico.

Dados prévios da literatura demonstraram que E2 modula neuropeptídeos relativos ao controle da ingestão alimentar nas regiões cerebrais supra-citadas, incluindo NPY, fator de liberação de corticotrofina (CRF), POMC e neurotransmissores como a serotonina (RIVERA, et al. 2005; ECKEL, et al. 2005). De fato, receptores para estrógeno e leptina estão co-localizados em regiões que controlam o metabolismo e a função gonadal como núcleo arqueado (ARC), hipotálamo ventromedial (HVM), núcleo pré-óptico anterior (POA).

Outro estudo documentou que o estrógeno não apresenta efeito nos níveis de ghrelina circulantes em mulheres que estejam normalmente ciclando ou em menopausa (DAFOPOULOS et al. 2010).

6.4 Avaliação da reposição hormonal sobre o volume urinário e a osmolalidade urinária sob condições basais

A seguir apresentamos a tabela 7 que se relaciona com a figura 7 (Avaliação do volume urinário). Demonstramos nesta tabela que houve dose-dependência em relação ao volume urinário.

Tabela 7. Volume urinário Comparações de grupos	6º dia
E2 2,5 vs. óleo	5,15 ± 0,61 vs. 6,76 ± 0,69 ml/100g, *p<0,01
E2 10 vs. óleo	4,98 ± 0,43 vs. 6,76 ± 0,69 ml/100g, *p<0,01

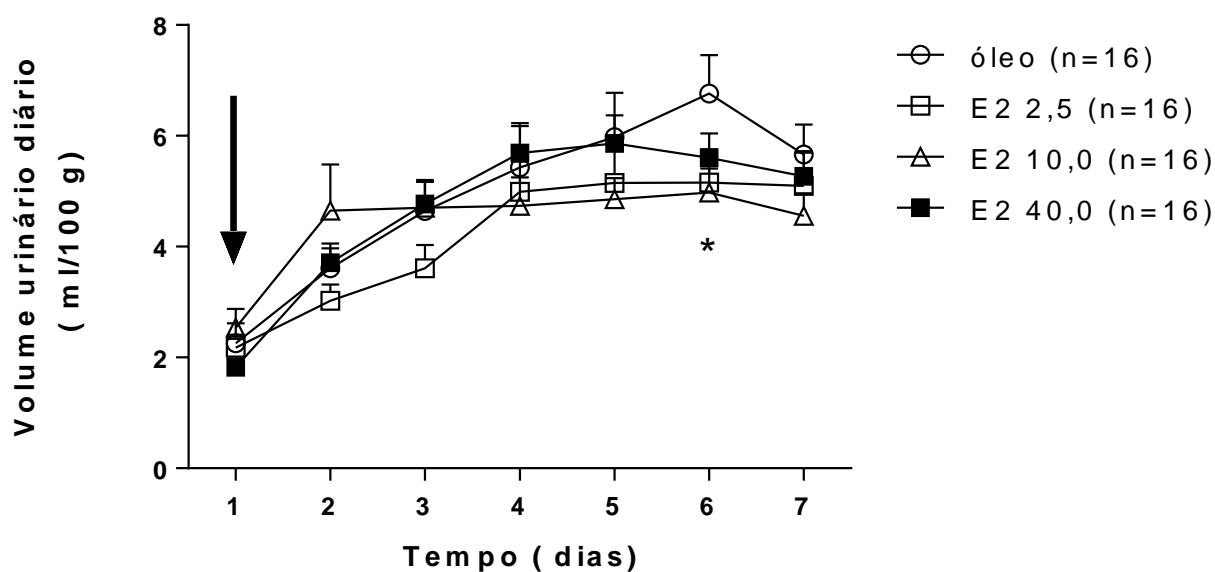


Fig.7 Avaliação diária do volume urinário sob condições basais. Anova two way medidas repetidas, dados expressos por médias \pm SEM. O símbolo * (asterisco) refere-se às comparações com o grupo óleo. Retornar à tabela 7 para consulta dos valores de P.

O estrogênio através de mecanismos genômicos aumenta a expressão de ARNm para vasopressina, aumentando a síntese e a liberação da vasopressina, que estimula a reabsorção renal de sódio nos túbulos renais e reabsorção de água pela inserção de canais de aquaporina tipo 2 (AQP2) na membrana basolateral dos túbulos coletores renais. Cheema et al. (2015) demonstrou

que o receptor estrogênico alfa ($ER\alpha$) modula negativamente a expressão de AQP2 nos túbulos coletores renais. Podemos considerar que para haver alteração no volume urinário foi necessária um maior tempo de exposição ao hormônio (6 dias), porque a excreção de sódio e água estão associados ao comportamento ingestivo e à secreção hormonal de vasopressina. Assim, é necessária uma associação de todos esses fatores para haver redução no volume urinário.

Não realizamos até o momento as dosagens hormonais em condições basais, no entanto podemos supor que houve um efeito dose-resposta quanto a secreção de vasopressina, por isso observamos a redução do volume urinário nos grupos tratados com as doses de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ comparados ao grupo controle.

Na osmolalidade urinária não observamos efeito dose-resposta muito provavelmente pela elevada variabilidade dos resultados e do erro experimental. No entanto, observamos uma redução não significativa da osmolalidade urinária a partir do 3º dia nos grupos que receberam a dose intermediária (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e a dose alta (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de estradiol e elevação da osmolalidade na dose baixa do hormônio e também no grupo controle.

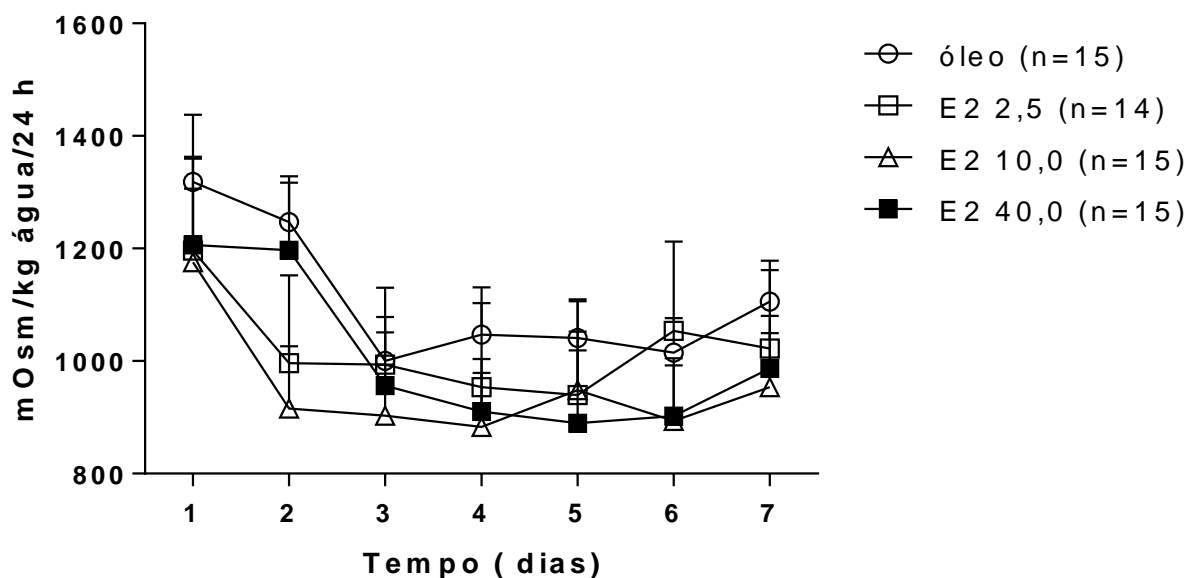


Fig. 8 Avaliação diária da osmolalidade urinária sob condições basais. Anova two way medidas repetidas, seguido de pos-teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média \pm SEM.

O estradiol poderia ativar mecanismos que ajudam na retenção de sódio quando os níveis estrogênicos estão altos e por isso observamos a redução da osmolalidade urinária.

É conhecido que o aumento de volume extracelular na mulher ocorre durante a fase pré-ovulatória do ciclo menstrual quando os níveis estrogênicos estão aumentando (STEPHENSON et al. 1988). Além disso, a retenção de água e sódio ocorre durante a gestação (STACHENFELD et al. 2005) e em mulheres na pós-menopausa que recebem estrogênio (DIGNAM, et al. 1956). A dose mais alta de estrógeno (40 μ /kg) provavelmente favoreceu ainda mais a retenção de sódio por ser uma dose que se assemelha os níveis estrogênicos durante a fase final da gestação. Esses achados poderiam estar associados com ações do estrógeno e da progesterona na função renal, levando a retenção de água e sódio (STACHENFELD et al. 2005). No entanto, nosso estudo não avaliou o efeito da reposição com progesterona em nos animais testados. O estradiol estimula o aumento da expressão de ARNm do ENaC no rim de ratas (GAMBLING, et al. 2004), principalmente nos túbulos proximais e distais (BRUNETTE, et al. 2001), favorecendo a retenção de íons sódio.

Um outro possível mecanismo é a ação estrogênica sobre o sistema nervoso autônomo simpático, já que a inervação simpática renal contribui para a retenção de sódio. O estrógeno exerce efeitos diretos na inervação simpática renal de acordo com GRACELLI et al. 2013). Neste estudo foi utilizado o modelo desnervação renal em ratas castradas com reposição de estrogênio (2,0 mg/kg) ou progesterona. Foi observado que a reposição estrogênica normalizou os níveis plasmáticos de catecolaminas após a desnervação renal.

6.5 Avaliação da influência da reposição hormonal sobre o volume urinário após a depleção de sódio

Avaliamos também o volume urinário após a depleção de sódio com furosemida para confirmação da eficácia do modelo. Assim observamos nas duas primeiras horas um aumento da diurese, como era esperado. No entanto, não foi observado efeito em função da dose do hormônio estrogênico mas somente em função do tempo de avaliação.

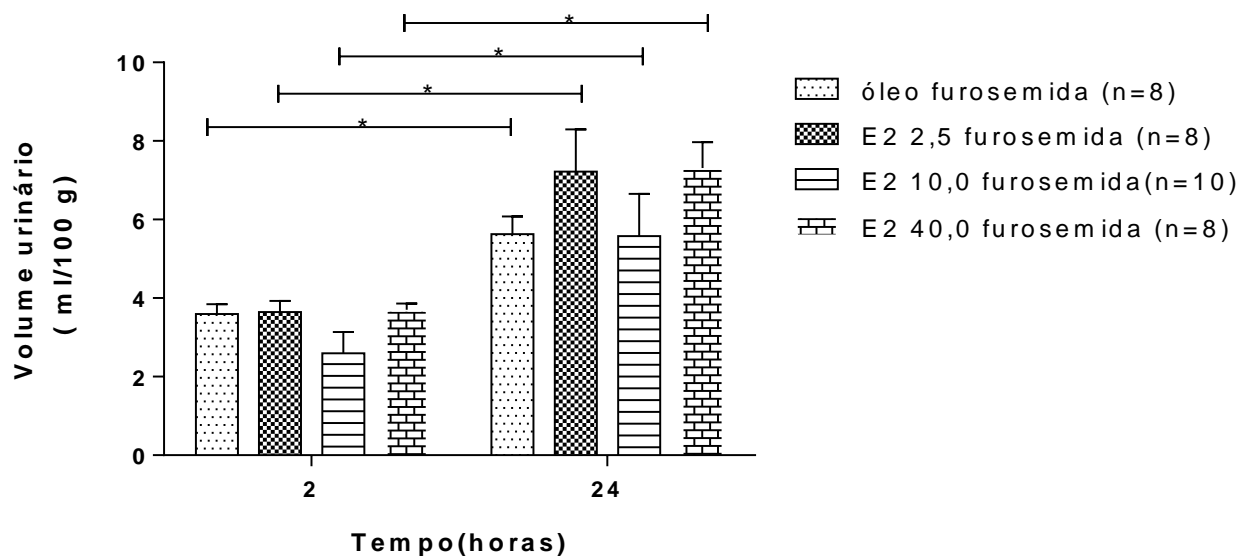


Fig 9. Avaliação do volume urinário 2 horas após depleção de sódio e do volume total em 24 horas após o experimento. Dados expressos como média±SEM e analisados por anova de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni. O símbolo * (asterisco) indica a diferença entre os grupos em função do tempo, em que $*p<0,0001$.

Avaliamos também o volume urinário após a depleção de sódio com furosemida para confirmação da eficácia do modelo. Assim observamos nas duas primeiras horas um aumento da diurese, como era esperado. No entanto, não foi observado efeito em função da dose do hormônio estrogênico mas somente em função do tempo de avaliação.

A furosemida é um potente agente salurético e caliurético que atua no ramo ascendente da alça de Henle, interferindo com a reabsorção ativa de sódio. Determina também grande parte da diurese e natriurese, produzindo depleção de água e de sódio, sendo poderoso estímulo do sistema renina-angiotensina aldosterona (DENTON, 1984; FITZSIMONS, 1998).

Se fossem observados diferentes níveis plasmáticos de vasopressina em função da dose de estrogênio administrada poderíamos ter observado diferença no volume urinário após a depleção de sódio.

6.6 Avaliação do efeito do estradiol sobre comportamento de ingestão cumulativa de água e salina hipertônica após a rerepresentação dos fluidos

A tabela 8 mostrada a seguir refere-se à figura 10 (Avaliação da ingestão cumulativa de salina hipertônica nos animais injetados com salina isotônica).

Tabela 8. Ingestão salina (1,8%) Comparações de grupos	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min
E2 40-salina vs. óleo-salina	1,43 ± 0,4 vs. 0,51 ± 0,2 ml , *p<0,0001	1,59 ± 0,45 vs. 0,64 ± 0,26 ml , *p<0,0001	1,73 ± 0,48 vs. 0,73 ± 0,29 ml , *p<0,0001	2,0 ± 0,48 vs. 1,68 ± 0,37 ml , *p<0,0001	2,14 ± 0,52 vs. 1,22 ± 0,29 ml , *p<0,0001
E2 2,5-salina vs. óleo	1,43 ± 0,4 vs. 0,51 ± 0,2 ml , *p<0,0001	1,36 ± 0,32 vs. 0,64 ± 0,26 ml , *p<0,0001	1,48 ± 0,35 vs. 0,73 ± 0,29 ml *p<0,0001	1,68 ± 0,37 vs. 1,02 ± 0,29 ml , *p<0,0001	1,87 ± 0,39 vs. 1,22 ± 0,29 ml , *p<0,0001
E2 10-salina vs. óleo-salina	—	1,02 ± 0,25 vs. 0,64 ± 0,26 ml , *p<0,05	—	—	1,62 ± 0,3 vs. 1,22 ± 0,29 ml , *p<0,05
Comparações de grupos (Cont.)	240 min	300 min			
E2 40-salina vs. óleo-salina	2,3 ± 0,52 vs. 1,38 ± 0,36 ml , *p<0,0001	2,4 ± 0,54 vs. 1,5 ± 0,34 ml , *p<0,0001			
E2 2,5-salina vs. óleo	1,96 ± 0,42 vs. 1,38 ± 0,36 ml , *p<0,001	1,98 ± 0,42 vs. 1,5 ± 0,34 ml , *p<0,01			

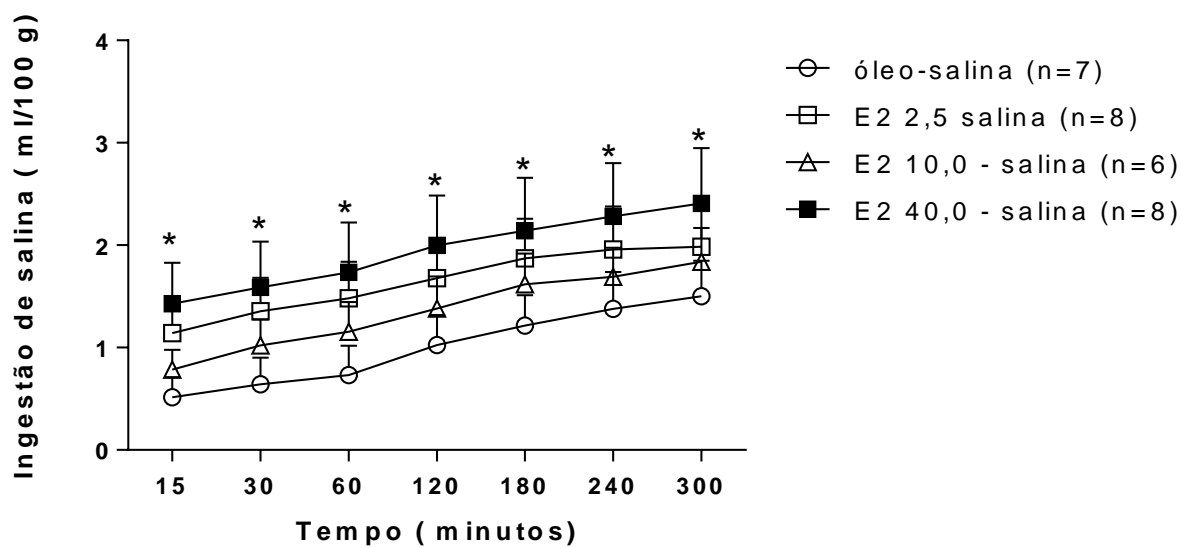


Fig 10. Avaliação da ingestão de salina hipertônica (1,8%) aos animais que receberam injeção de veículo (salina isotônica), dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação cumulativa. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova two way medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni. O símbolo * (asterisco) indica as diferenças em relação ao grupo controle (ver tabela 8 para consulta).

Observamos que a privação do acesso ao bebedouro de salina hipertônica por 24 horas desencadeou uma sutil avidez por sal em diferentes tempos de avaliação. Verificamos ainda que a dose alta EC 40 apresentou maior consumo de salina em comparação com as demais doses. Esse comportamento de avidez pelo sódio pode ser devido à diluição do plasma nas 24 horas anteriores ao experimento. Supomos que possa haver diferentes níveis de hemodiluição devido aos diferentes status estrogênicos.

Quanto à ingestão de salina hipertônica do grupo que recebeu administração de furosemida observamos que houve efeito dose-resposta em todos os tempos avaliados considerando as doses de 10 μ g/kg e de 2,5 μ g/kg em relação ao controle.

A tabela 9 a seguir refere-se à figura 11 (avaliação da ingestão cumulativa de salina hipertônica pelos animais depletados de sódio).

Tabela 9. Ingestão salina (1,8%) Comparações de grupos	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min
E2 2,5- furo vs. óleo-furo	_____	_____	_____	3,12 ± 0,65 vs. 2,47 ± 0,74 ml , *p<0,05	3,33 ± 0,68 vs. 2,55 ± 0,77 ml , *p<0,01
E2 10-furo vs. óleo-furo	2,0 ± 0,3 vs. 1,12 ± 0,50 ml , *p<0,01	2,65 ± 0,33 vs. 1,82 ± 0,62 ml , *p<0,01	3,16 ± 0,35 vs. 2,12 ± 0,66 ml , *p<0,0001	3,67 ± 0,40 vs. 2,47 ± 0,74 ml , *p<0,0001	3,90 ± 0,39 vs. 2,55 ± 0,77 ml , *p<0,0001
Comparações de grupos (Cont.)	240 min	300 min			
E2 10-furo vs. óleo-furo	4,24 ± 0,45 vs. 2,65 ± 0,78 ml , *p<0,0001	4,25 ± 0,46 vs. 2,99 ± 0,74 ml , *p<0,0001			
E2 2,5-furo vs. óleo-furo	3,51 ± 0,71 vs. 2,65 ± 0,78ml *p<0,01	_____			

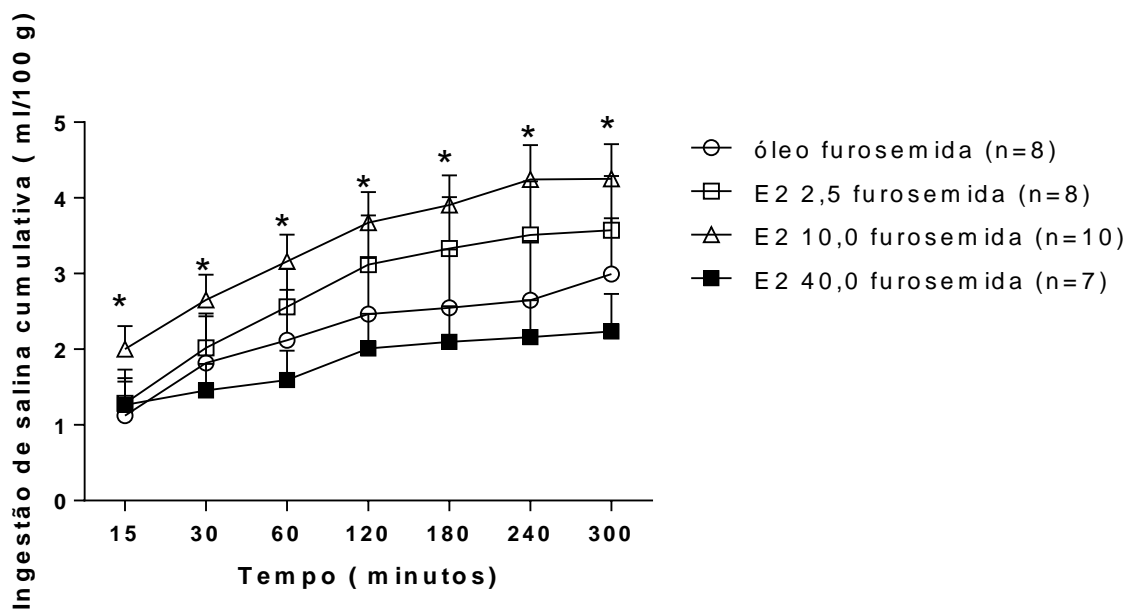


Fig 11. Avaliação da ingestão de salina hipertônica (1,8%) aos animais que receberam injeção de furosemida (20 mg/kg), dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação

cumulativa. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova two way medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni. O símbolo *(asterisco) representa as comparações em relação ao grupo controle. Retornar à tabela 9 para verificar os dados estatísticos.

Após o desafio hidroeletrólítico percebemos que o grupo tratado com a dose de 40 μ g/kg apresentou menor consumo de salina hipertônica sob estímulo. Isso poderia ser explicado pela elevada ingestão de salina já em condição basal e desse modo podemos supor que os níveis plasmáticos de sódio já estavam elevados anteriormente, e supostamente a necessidade de busca pelo sódio sob estímulo seria menor. Além disso, é bastante provável que nesse grupo os mecanismos que favorecem a retenção de íons sódio e também de água estejam mais sensibilizados para restauração de volume sanguíneo, pois a reposição com a dose alta (40 μ g/kg) provavelmente resultaria em hipernatremia. Por isso, quando os níveis estrogênicos estão altos não há um significativo apetite pelo sódio.

Já o grupo tratado com a dose de 10 μ g/kg apresentou significativo apetite ao sódio, pois já em condições basais a ingestão espontânea de sal era baixa, logo seus níveis plasmáticos de sódio também eram possivelmente mais baixos. Assim, após o desafio houve uma ativação significativa do sistema-renina angiotensina aldosterona, desencadenando o apetite pelo sódio.

Na ingestão cumulativa de água do grupo que recebeu salina houve efeito dose-resposta no tempo de 300 min entre os grupos E2 10 vs. Óleo ($0,63 \pm 0,13$ vs. $0,38 \pm 0,20$ g, * $p < 0,05$).

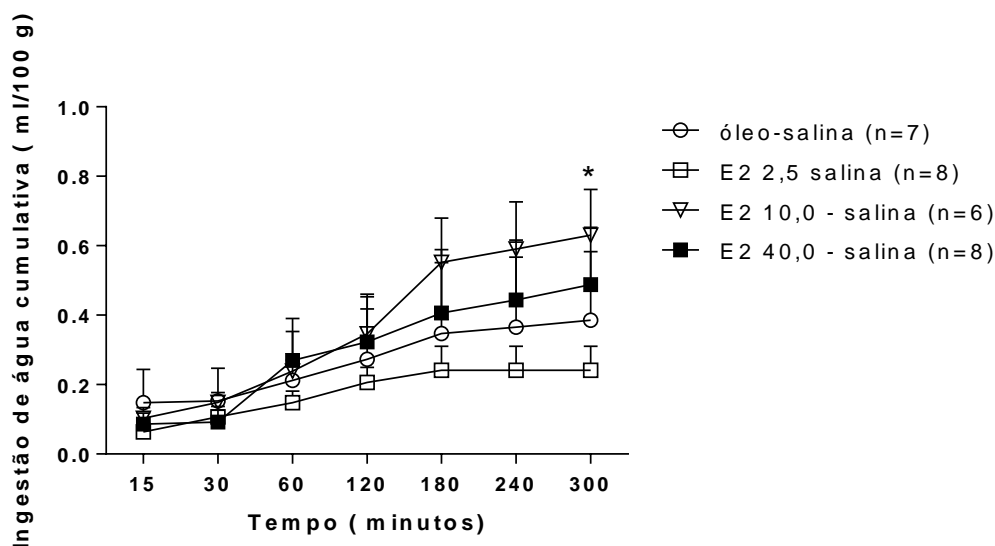


Fig 12. Avaliação da ingestão de água aos animais que receberam injeção de veículo (salina isotônica), dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação cumulativa. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova two way medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni.

Neste parâmetro somente a dose intermediária (10 μ g/kg) apresentou maior consumo de água. O consumo de água foi baixo em todos os grupos, pois houve acesso ao bebedouro de água nas 24 horas anteriores ao experimento, logo não houve hiperosmolalidade por isso o estímulo de sede bem como o comportamento dipsogênico não foram desencadeados. Além disso, muito provavelmente ocorreu a diluição do plasma nesses animais, o que torna o seu apetite mais favorável ao sódio e não à água.

A seguir apresentamos a tabela 10 que se relaciona com a figura 13 (avaliação da ingestão de água pelo grupo depletado de sódio).

Tabela 10. Ingestão água (1,8%) Comparações de grupos	60 min	120min	180 min	240 min	300 min
E2 2,5-furo vs. óleo-furo	_____	_____	1,18 ± 0,28 vs. 0,73 ± 0,34 ml *p<0,05	1,21 ± 0,28 vs. 0,80 ± 0,33 ml, *p<0,05	_____
E2 40- furo vs. óleo-furo	1,05 ± 0,20 vs. 0,43 ± 0,21 ml, *p<0,001	1,45 ± 0,24 vs. 0,68 ± 0,32 ml, *p< 0,0001	1,56 ± 0,25 vs. 0,73 ± 0,34 ml, *p< 0,0001	1,57 ± 0,24 vs. 0,80 ± 0,33 ml, *p< 0,0001	1,56 ± 0,24 vs. 0,86 ± 0,35 ml, *p< 0,0001
E2 10-furo vs. óleo-furo	0,91 ± 0,24 vs. 0,43 ± 0,21 ml, *p< 0,01	1,30 ± 0,29 vs. 0,68 ± 0,32 ml, *p<0,001	1,45 ± 0,29 vs. 0,73 ± 0,34 ml *p< 0,0001	1,64 ± 0,27 vs. 0,80 ± 0,33 ml *p< 0,0001	1,64 ± 0,27 vs. 0,86 ± 0,35 ml *p<0,0001

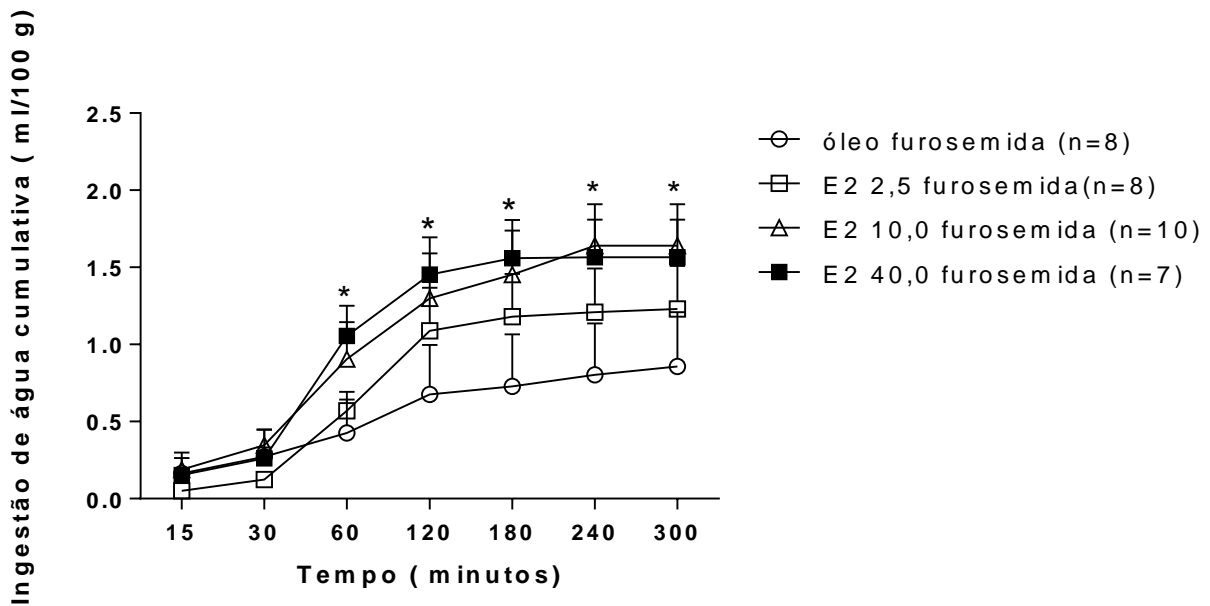


Fig 13 Avaliação da ingestão de água aos animais que receberam injeção de furosemida (20 mg/kg), dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação cumulativa. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova two way medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni. O símbolo *(asterisco) indica as comparações com o grupo controle. É importante retornar à tabela 10 para melhor compreensão dos dados.

Avaliamos neste gráfico o papel do estrógeno em modular o comportamento dipsogênico sob estímulo de depleção de sódio. Lembramos que neste modelo há tanto perda de água quanto perda de sódio, ocorrendo primeiramente o apetite ao sódio seguida da ingestão de água. Observamos que o modelo ocasionou em hiperosmolalidade plasmática, sendo esse um importante estímulo para sede e liberação de vasopressina.

Assim podemos supor que as três doses hormonais provocaram diferentes níveis de hemodiluição e conseqüentemente diferentes necessidades de reposição de água ou sódio. Sabe-se que o estrógeno diminui o limiar osmótico para liberação de vasopressina, logo é provável que um elevado nível estrogênico seja capaz de ocasionar a liberação de AVP mais facilmente. Além disso, os neurônios osmossensitivos podem ser mais sensibilizados aos efeitos dipsogênicos da ANG II, por isso também o consumo de água é maior em níveis estrogênicos altos sob estímulo osmótico.

Não encontramos diferença significativa entre os grupos com relação à preferência por sódio, no entanto percebemos que a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentaram um percentual de preferência levemente menor que a dose baixa 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e que o controle.

6.7 Avaliação da influência da reposição hormonal sobre a preferência por sódio pelos grupos controle e depletados.

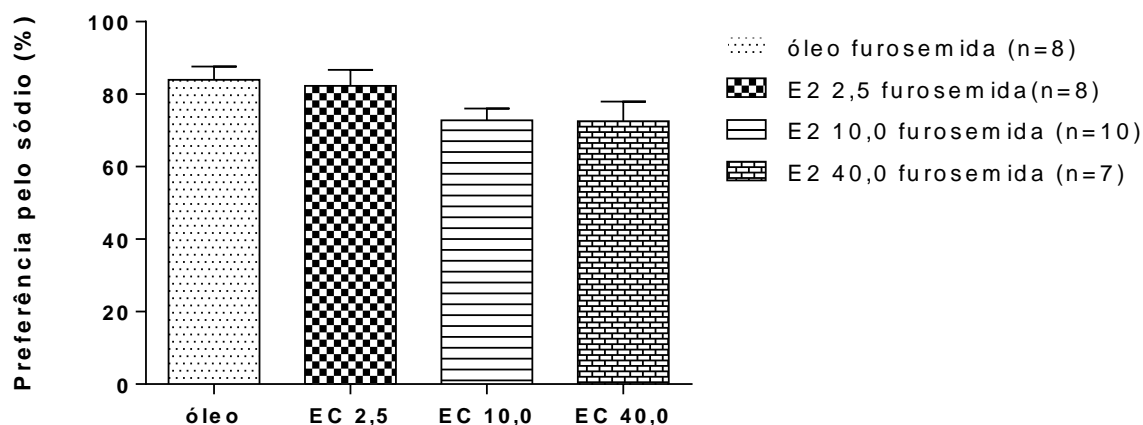


Fig 14 Avaliação da preferência por sódio dos animais que receberam injeção de furosemida (20 mg/kg), dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação cumulativa. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova one way medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni.

O índice de preferência é um parâmetro para avaliar a tomada de decisão dos animais na busca pela restauração do volume após o desafio hidroeletrolítico, em que observamos a preferência pelo sódio como era esperado.

A dose alta e também a dose intermediária podem ter atenuado a preferência pelo sal.

Não encontramos diferença significativa entre os grupos que receberam a injeção de salina isotônica com relação à preferência por sódio, no entanto verificamos que mesmo a ausência do bebedouro de salina hipertônica por 24 horas é capaz de promover a preferência ao sódio.

Também percebemos que a dose de 10 μ g/kg apresentou um percentual de preferência levemente menor que as demais doses e que o controle.

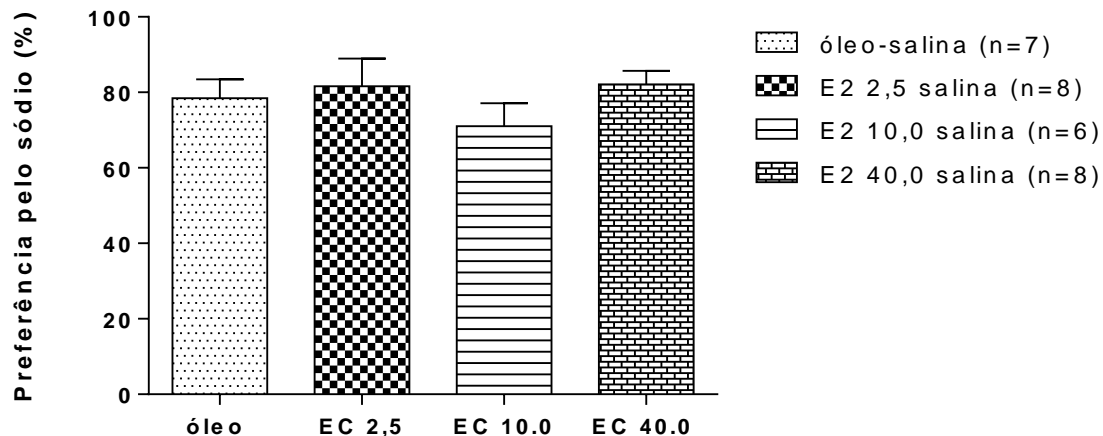


Fig 15 Avaliação da preferência por sódio dos animais que receberam injeção de veículo (salina isotônica), dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação cumulativa. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova one way e pós-teste de Bonferroni.

6.8 Avaliação da reposição hormonal sobre o volume urinário após 2 horas de representação de fluidos.

Não observamos nenhuma alteração significativa no volume urinário 2 horas após a reapresentação de fluidos. No entanto a avaliação do volume urinário nas duas primeiras horas após a oferta de fluidos nos permite compreender se a excreção urinária de sódio voltou aos níveis normais. Vamos analisar esses dados em experimentos futuros.

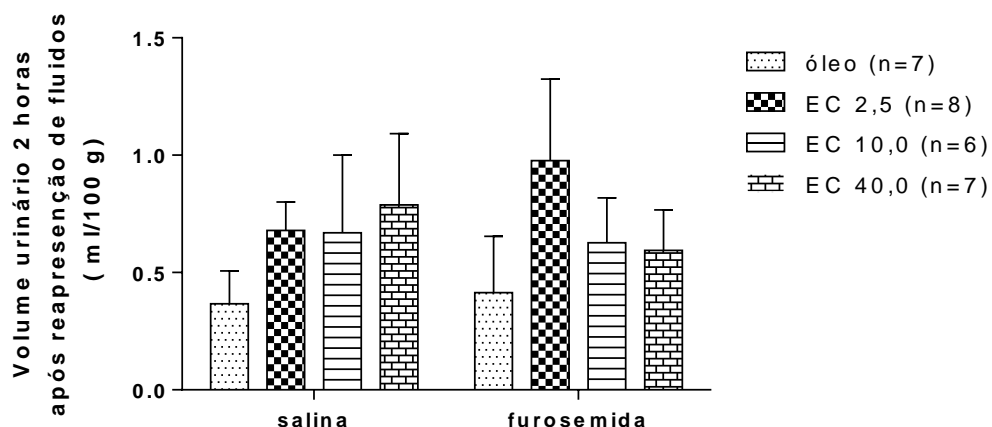


Fig 16 Avaliação do volume urinário 2 horas após a rerepresentação dos fluidos. Os animais ficaram sob dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova one way e pós-teste de Bonferroni.

6.9 Avaliação do efeito da reposição hormonal com diferentes doses de estrógeno sobre a osmolalidade plasmática e concentração de sódio plasmático no 8º dia do experimento

Não foi observada alteração na osmolalidade plasmática dos animais, que ficou próxima aos níveis normais (290 mOsm), no entanto como os animais tiveram acesso ao bebedouros com água destilada nas 24 horas anteriores supomos que houve uma diluição do plasma.

Não temos os dados de dosagens hormonais a tempo de inserir na dissertação, mas o material está coletado para posterior análise. Desse modo, poderemos avaliar os níveis de vasopressina plasmática que pode nos responder algumas perguntas.

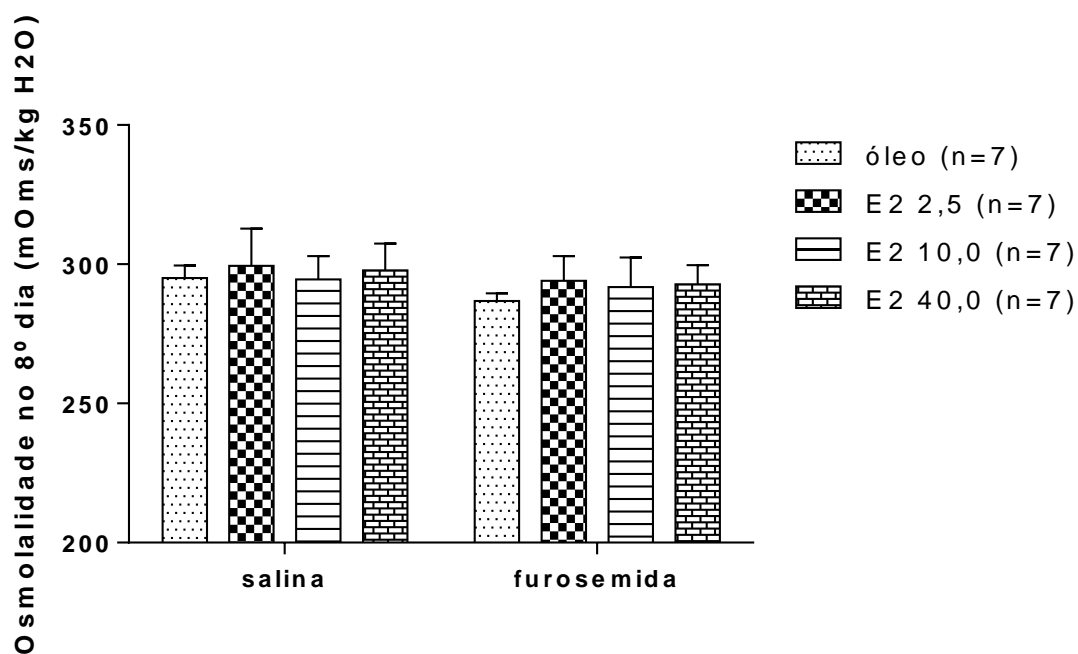


Fig 17 Avaliação da osmolalidade plasmática no 8º dia do experimento. Os animais ficaram em caixas sob dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova two way e pós-teste de Bonferroni.

Apresentamos a seguir a tabela 11 que se relaciona com a figura 18 (avaliação da concentração de sódio plasmático).

Tabela 11. Sódio plasmático Comparações de grupos	8º dia
E2 40-furo vs. óleo-furo	143,14 \pm 1,18 vs. 133,86 \pm 1,18 mEq/L , $\Psi p < 0,05$
Óleo-furo vs. óleo-salina	133,85 \pm 1,18 vs. 139,71 \pm 0,96 mEq/L , * $p < 0,01$
E2 2,5-furo vs. E2 2,5-salina	136,71 \pm 0,64 vs. 142,0 \pm 0,62 mEq/L , $\theta p < 0,05$

O grupo que recebeu a dose alta do hormônio (40 µg/kg) apresentou maior concentração plasmática de sódio em relação ao controle após a depleção de sódio.

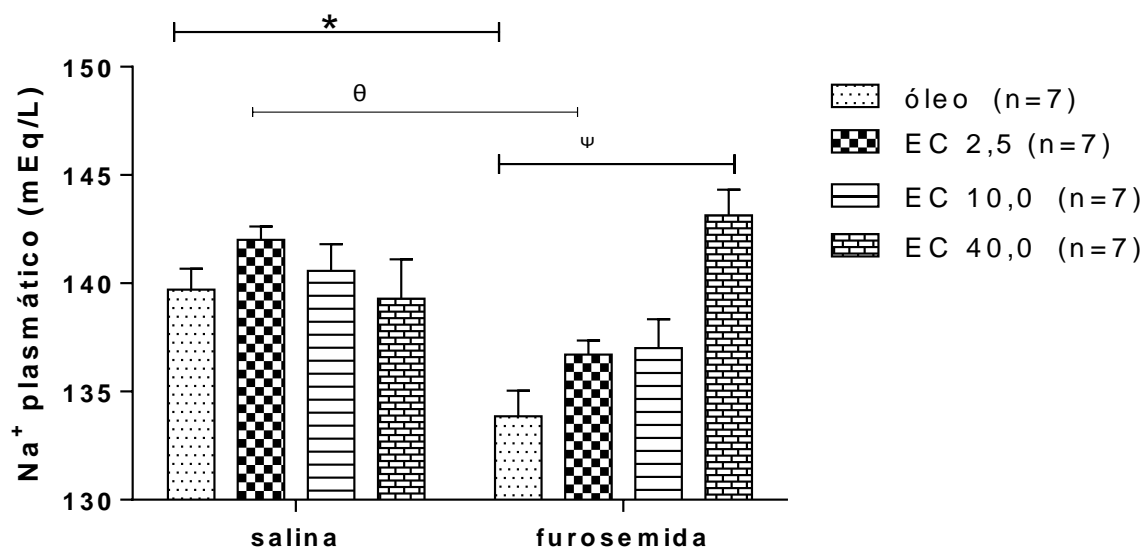


Fig 18. Avaliação da concentração de sódio plasmático no 8º dia do experimento na condição de depleção de sódio. Os animais ficaram em caixas sob dieta pobre em sódio e água destilada nas 24 horas anteriores à avaliação, sendo que o bebedouro de salina hipertônica estava ausente. Dados expressos por médias \pm SEM, Anova two way e pós-teste de Bonferroni. É importante retornar à tabela 11 para consulta dos valores P equivalentes.

A depleção de sódio promove uma tendência de hemoconcentração devido à desidratação, no entanto o tratamento com E2 atenua a redução de volume na condição de depleção. Podemos supor que esse aumento na concentração plasmática de sódio parece influenciar na inibição do apetite específico para o sódio nos animais depletados. Esses dados corroboram com a Fig. 11 (Avaliação cumulativa do consumo de salina hipertônica após injeção de furosemida) mencionada anteriormente, em que o consumo de sódio em altos níveis estrogênicos (40 µg/kg) foi diminuído após o desafio, reforçando que o apetite ao sódio foi reduzido, porém não foi diferente do controle.

Podemos supor que altos status estrogênicos associados com a desidratação favorecem a ativação de mecanismos fisiológicos relacionados com a reabsorção renal de sódio e redução da

natriurese como aumento dos níveis de aldosterona, diminuição dos níveis de OT e ANP, o que auxiliaria na retenção de sódio. Mais estudos são necessários para avaliar esse parâmetro.

Ao compararmos a concentração plasmática de sódio nos animais injetados com a salina isotônica não observamos alteração em função da dose de estradiol. E ao observar o consumo de salina hipertônica sob condições basais (Fig.5) verificamos que o mesmo já estava mais elevado no grupo EC 40 porém sem alteração significativa. Esse dado sugere que a diluição do plasma pode ter influenciado neste parâmetro, supostamente porque os animais tiveram acesso ao bebedouro de água nas 24 horas anteriores ao experimento. No entanto não medimos o consumo de água durante esse período.

Verificamos que a furosemida promoveu uma significativa redução nos níveis de sódio plasmáticos nos grupos óleo-furosemida e E2 2,5 furosemida ao compararmos com os seus respectivos controles que receberam a administração de salina. Essa resposta era esperada. Desse modo, podemos inferir que a baixa dose do hormônio (2,5 µg/kg) não é suficiente para acionar mecanismos que favorecem a retenção de sódio.

Além disso, um estudo recente de Hofmeister et al. (2015) demonstrou que a pele também possui reservatórios para sódio e que este, por sua vez, poderia estar ligado aos glicosaminoglicanos existentes no músculo esquelético e na epiderme.

A partir da hipótese anterior podemos supor que o estrógeno também poderia aumentar a síntese dos glicosaminoglicanos em outros reservatórios de sódio e também poderia ser uma forma de reter mais sódio.

7.0 Conclusões

7.1 Conclusão geral

Nosso estudo sugere que provavelmente o hormônio estrogênico também exerce um efeito dose dependente em parâmetros comumente avaliados em estudos de regulação hidroeletrólítica e exerce um efeito modulatório sobre a expressão comportamental dos animais seletivamente na ingestão alimentar e no volume urinário sob condições basais e nos comportamentos natriorexigênicos e dipsogênicos após depleção de sódio. Há possibilidade de o estradiol desempenhar efeitos neuroendócrinos e também genômicos. Tais dados poderiam auxiliar a elucidar os resultados comportamentais.

7.2 Conclusões específicas

- 1) Os dados sugerem que o estrógeno sensibiliza os neurônios osmosensitivos para desencadear respostas dipsogênicas e natriurexigênicas da angiotensina II em regiões cerebrais envolvidas com o controle da homeostase hidroeletrólítica. Um dos possíveis mecanismos é a influência estrogênica sobre a expressão gênica dos receptores AT1 em órgãos circumventriculares.
- 2) A resposta natriorexigênica desencadeada por diferentes níveis hormonais é intensificada quando há um desafio hidroeletrólítico cuja origem do estímulo é extracelular como ocorre no modelo de depleção de sódio, ou seja, depende do paradigma experimental utilizado.
- 3) Possivelmente, após a depleção de sódio haveria diferentes níveis de diluição do plasma a partir de diferentes status estrogênicos, no entanto nosso estudo não aferiu essa resposta.
- 4) O efeito-dose dependente reflete a intensidade com que o sistema renina-angiotensina aldosterona é sensibilizado.
- 5) Nossa suposição é que poderia existir um *cross-talk* intracelular envolvendo diferentes fatores de transcrição e mecanismos de super-expressão ou de silenciamento gênico entre sistema renina- angiotensina, estrógeno e níveis hormonais de AVP, OT em neurônios osmosensitivos para ajuste da osmolalidade - tonicidade dos fluidos corporais.

8.0 Considerações finais e perspectivas

Em experimentos futuros seria interessante investigar os mecanismos intracelulares pelos quais o estradiol ativa os neurônios osmosensitivos e indiretamente o sistema renina angiotensina aldosterona após estímulo osmótico pode ser uma maneira - em associação com dados que já existem na literatura- para explicar o papel do estrógeno em inibir o apetite ao sódio. Há muitos estudos de comportamento, imunoistoquímicos e mesmo análises hormonais, mas falta conhecer o que o estrógeno ativa ou inibe em cascatas intracelulares importantes para ativação dos neurônios osmosensitivos.

Uma outra possibilidade para estudos futuros seria realizar o mesmo protocolo de reposição hormonal e alterar o paradigma experimental, acrescentando novos desafios como

sobrecarga salina, protocolo furocap, oferta de dieta hipossódica ou hiperssódica e avaliar se há outras respostas possíveis neste contexto.

9.0 Referências bibliográficas

ALHEID, G. DE OLMOS, J.; BELTRAMINO, C. Amygdala and extended amygdala, In: Paxinos, G. The rat nervous system, 2nd ed, San Diego, **Academic Press**, p 495-578, i 1995.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; RUGINSK, S.G. ; MECAWI, A.S. MARGATHO, L.O.; CRUZ, J.C.; VILHENA-FRANCO, T.; REIS, W.L.; VENTURA, R.R.; REIS, L.C.; VIVAS, L.M. ; ELIAS, L.L.K. Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis **Braz J Med Biol Res** 46(4), 2013.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M. The neuroendocrine control of atrial natriuretic peptide release. **Mol Psychiatry**, 2(5):359-67, 1997.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M.R.; Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. **Acta Physiol Lat Am** 13: 94-100, 1963.

AKAISHI, T.; SAKUMA Y. Estrogen-induced modulation of hypothalamic osmoregulation in female rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 258: R924–R929, 1990.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic Estradiol Treatment Normalizes Body Weight and Restores Physiological Patterns of Spontaneous Feeding and Sexual Receptivity in Ovariectomized Rats **Hormones and Behavior** 42, 461–471, 2002.

AZMITIA, E.C; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J Comp Neurol**, 179 (3), 641-668, 1978.

BADAUÊ-PASSOS, D.; GODINO, A.; JOHNSON, A.K.; VIVAS, L. ANTUNES-RODRIGUES, J. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by sodium depletion-induced ingestion. **Exp Neurol** 206:86-94, 2007.

BARRON, W.M.; SCHREIBER, J.; LINDHEIMER, M.D. Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 250: E352–E361, 1986.

BLACKBURN, R.E., SAMSON W.K. FULTON, R.J. STRICKER, E.M. VERBALIS, J.G. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, 269R245–R251, 1995.

BIEGON, A.; BERCOVITZ, SAMUEL, D. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. **Brain Res.** 187:221–225, 1980.

BOTELHO, L.M.; BLOCK, C.H.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. Plasma angiotensin (1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Pept**, 15(4):723-9, 1994.

BRUNETTE, M.G.; LECLERC, M. Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. **J Endocrinol** 170: 441-450, 2001.

BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E.; FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology** 94:1704–1708, 1974.

BUTERA, P.C.; CZAJA, J.A. Intracranial estradiol in ovariectomized guinea pigs: effects on ingestive behaviors and body weight. **Brain research.** 322:41–48, 1984.

CALZONE, W.L.; SILVA, C.; KEEFE, D.L.; STACHENFELD, N.S. Progesterone does not alter osmotic regulation of AVP. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 281: R2011–R2020, 2001.

CASABIELL, X.; PINEIRO, V.; PEINO, R.; LAGE, M.; CAMINA, J.; GALLEGO, R.; VALLEJO, L.G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism** 83:2149–2155, 1998.

CECCHINI, D.J.; CHATTORAJ, S.C. ; FANOUS, A.S. ; PANDA, S.K.; BRENNAN, T.F.; EDELIN, K.C. Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone in plasma during the estrous cycle of the rat: interrelationships with estradiol, progesterone, and the gonadotropins. **Endocrinology** 112:1122–1126; 1983.

CHEEMA, M.U.; IRSIK, D.L.; WANG, Y.; MILLER-LITTLE, W.; HYNDMAN, K.A.; MARKS, E.S.; FROKIAER, J.; BOESEN, E.; NORREGAARD, R. Estradiol regulates AQP2 expression in the collectin duct – a novel inhibitory for estrogen receptor alpha **Am J Renal Physiol** (junho, 2015) doi: 10.1152/ajprenal.00685.2014.

CREECH, R.D.; Q LI, G.A. CARRASCO, L.D. VAN DE KAR, N.A. Estradiol induces partial desensitization of serotonin 1A receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and alters expression and interaction of RGSZ1 and Gaz **Neuropharmacology** 62: 2040-2049, 2012.

CROWLEY, R.S. ; AMICO, J.A. Gonadal steroid modulation of oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamus of the osmotically stimulated rat. **Endocrinology**133: 2711– 2718, 1993.

CROWLEY,W.R. ; O'DPNOHUE, T.L.; GEORGE, J.M.; JACOBOWITZ,D.M. Changes in pituitary oxytocin and vasopressin during theestrous cycle and after ovarian hormones: evidence for mediation by norepinephrine. **Life Sci**23: 2579–2586, 1978.

CURTIS, K.S. Estrogen and the central control of body fluid balance. **Physiology & Behavior**97 :180–192, 2009.

CZAJA, J.A; GOLDFOOT, D.A.; KARAVOLAS, H.J. Comparative facilitation and inhibition of lordosis in the guinea pig with progesterone, 5-alpha-pregnane-3,2-dione, or 3-alpha-hydroxy-5-alphapregnan- 20-one. **Hormones and behavior.** 5:261–274, 1974.

DAFOPOULOS, K.; CHALVATZAS, N.; KOSMAS,G.; KALLITSARIS, A.; POURNARAS, S.; MESSINIS, I.E. The effect ofestrogens on plasma ghrelin concentrations in women. **Journal of endocrinological investigation** 33:109–112, 2010.

DALMASSO, C.; AMIGONE, J.L. ; VIVAS, L.Serotonergic system involvement in the inhibitory action of estrogen on induced sodium appetite in female rats. **Physiol Behav,** 1;104(3):398-407, 2011.

DANIELSEN, J.; BUGGY, J. Depression of ad lib and angiotensin-induced sodium intake at oestrus. **Brain Res Bull.** 5, 501–504, 1980.

DARBLADE, B.; PENDARIES, C.; KRUST, A. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. **Circ Res.** 90(4):413–419, 2002.

DAVISON, J.M.; GILMORE, E.A.; DURR, J.; ROBERTSON, G.L.; LINDHEIMER, M.D. Altered osmotic thresholds for vasopressin secretion and thirst in human pregnancy. **Am J Physiol Renal FluidElectrolyte Physiol**246: F105–F109, 1984.

□ **DENTON, D.A; COGHLAN, J.P.; FEL, D.T.; MCKINLEY, M.; NELSON, J.; SCOGGINS.; TARJAN, E.; TREGEAR, G.W.; TRESHAM, J.J.; WEISINGER, R.** Stress, ACTH, salt intake and high blood pressure. **Clin Exp Hypertens A.**6(1-2):403-15, 1984.

DESAN, P.H.;WOODMANSEE, W.W.; RYAN, S.M.; SMOCK, T.K.; MAIER, S.F. Monoamine neurotransmitters and metabolites during the estrous cycle, pregnancy, and the postpartum period. **Pharmacol. Biochem.Behav.** 30:563–568, 1988.

DIGNAM, W.S.; VOSKIAN, J. ; ASSALI, N.S. Effects of estrogens on renal hemodynamics and excretion of electrolytes in human subjects. **J Clin Endocrinol Metab** 16: 1032-1042, 1956.

DONNER, N. & HANDA, J.R. Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. **Neuroscience**, 163:705-718, 2009.

ELIAS, P.C.L.; ELIAS, L.L.K.,; MOREIRA, A.C. Padronização do teste de infusão de salina hipertônica para o diagnóstico de diabetes insípido com dosagem da vasopressina plasmática. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 42:198-204, 1998.

ESQUERDA, M.E.D.; CRAIG, T.; HINOJOSA-LABORDE, C.Effect of Ovariectomy on Renal Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β in Young Salt-Sensitiveand -Resistant Rats. **Hypertension**,50:768-772,2007.

ECKEL, L.A.; HOUP, T.A.; GEARY, N. Estradiol treatment increases CCK-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.** 283:R1378–1385, 2002.

FAJARDO, M.E.; MALACARA, J.M.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H.G.; BARRERA-SALDANHA, H.A. Hormone and metabolic factors associated with leptin mRNA expression in pre- and postmenopausal women. **Steroids.** 69:425–430, 2004.

FITTS, D.A, TJEKES, D.S.; BRIGHT R.O. Salt appetite and lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. **Behav Neurosci,** 104:818-27, 1990.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. **Physiol Rev,** 78:583-686,1998.

FRANKMANN, S.P.; DORSA, P.M.; SAKAI, R.R.; SIMPSON, J.B. A single experience with hyperoncotic colloid dialysis persistently alters water and sodium intake. In: De-Caro G, Epstein AN, Massi M (Eds.), *The Physiology of Thirst and Sodium Appetite*, Plenum Press, New York, pp. 115-121, 1986.

GAMBLING, L.; DUNFORD, S.; WILSON, C.A.; MCARDLE, H. L.; BAINES, D.L. Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gamma ENaC subunit mRNA levels in female rat kidney **Kidney Int** 65: 1774-1781, 2004.

GAO, Q.; MEZEL, G.; NIE, Y.; RAO, Y.; CHOI, C.S.; BECHMANN, I.; LERANTH, C.; ALLERAND, D.; TORAN-PRIEST, C.A.; ROBERTS, J.L.; GAO, X.B.; MOBBS, C.; SHULMAN, G.I.; DIANO, S.; HORVATH, T.L. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals **Nature medicine.** 13:89–94, 2007.

GAVA, A.L.; FREITAS, F.P.; MEYRELLES, S.S.; GRACELLI, J.B. Gender-dependent effects of aging on the kidney **Braz J Med Biol Res** 44: 905-913, 2011.

GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic Estradiol Treatment Normalizes Body Weight and Test Meal Size in Ovariectomized Rats **Physiology & Behavior,** Vol. 67, No. 1, pp. 141–147, 1999

GRACELLI, J.B.; SOUZA-MENEZES, J.; BARBOSA, C.M.; ORNELLAS, F.S.; TAKIYA, C.M. ; ALVES, L.M. Role of estrogen and progesterone in the modulation of CNG-A1 and Na/K⁺- ATPase expression in the renal cortex. **Cell Physiol Biochem** 30: 160-172 ,2012.

GRACELI, J.B.; CICLINI, M.A.; BISSOLI, G.R.; MOYSES, M.R. Roles of estrogen and progesterone in modulating renal nerve function in the rat kidney, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 46: 521-527 2013.

GRAVES, N.S.; HAYES, H.; FAN, L.; CURTIS, K.S. Time course of behavioral, physiological and morphological changes after estradiol treatment of ovariectomized rats. **Physiol Behav**, 103(0):261-267,2011.

GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; JANUSZEWICZ, P.; CANTIN, M.; GENEST, J. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun**, 122(2):593-601, 1984.

FINDLAY, A.L.; FITZSIMONS, J.T. ; KUCHARZYK, J. Dependence of spontaneous and angiotensin-induced drinking in the rat upon the oestrous cycle and ovarian hormones. **J Endocrinol**. 82(2):215-25, 1979.

FRANCHINI, L.F.; JOHNSON, A.K.; DE OLMOS, J.; VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons, **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 282:235-243, 2002.

FRINDT, G.; PALMER, L.G. Regulation of epithelial Na⁺ channels by adrenal steroids: mineralocorticoid and glucocorticoid effects. **Am J Physiol Renal Physiol**, 302(1): 20–26, 2012.

FITZSIMONS JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev** 78: 583– 686, 1998.

FUNGFUANG, W.; NAKADA, T.; NAKAO, N.; TERADA, M.; YOKOSUKA, M.;GIZURARSON, S.; HAU, S.; MOON, C.~SAITO, T.R. Serum leptin concentrations, leptin mRNA expression, and food intake during the estrous cycle in rats **Lab Anim Res** 29(1):1-6, 2013.

HAANWINCKEL, M.A.; ELIAS, L.K.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(17):7902-7906, 1995.

HARTLEY, D.E.; DICKSON, S.L.; FORSLING, M.L. Plasma vasopressin concentrations and Fos protein expression in the supraoptic nucleus following osmotic stimulation or hypovolaemia in the ovariectomized rat: effect of oestradiol replacement. *J Neuroendocrinol* 16: 191–197, 2004.

HIROSAWA, M.; MINATA, M.; HARADA, K.H.; HITOMI, T.; KRUST, A.; KOIZUMI, A. Ablation of estrogen receptor alpha (ERalpha) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. *Biochemical and biophysical research communications*. 371:320–323, 2008.

HOFMEISTER, L.H.; PERISIC, S.; TITZE, J. Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? *Pflugers Arc*, 467(3):551-558, 2015.

JEFFERY, G.S.; PENG, K.C.; WAGNER, E.J. The role of phosphatidylinositol-3-kinase and AMP-activated kinase in the rapid estrogenic attenuation of cannabinoid-induced changes in energy homeostasis. *Pharmaceuticals* 4:630–651, 2011.

JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol*. 18(3):292-353, 1997.

JOHNSON, W.G.; CORRIGAN, S.A.; LEMMON, C.R.; BERGERON, K.B. CRUSCO, A.H. Energy regulation over the menstrual cycle. *Physiology & Behavior*. 56:523–527, 1994.

KISLEY, L. R.; SAKAI, R. R.; FLANAGAN-CATO, L. M. & FLUHARTY, S. J. Estrogen increases angiotensin II-induced c-Fos expression in the vasopressinergic neurons of the paraventricular nucleus in the female rat. *Neuroendocrinology*, 72:306-17, 2000.

KROHN, P.L. ; ZUCKERMAN, S. Water metabolism in relation to the menstrual cycle. *J. Physiol*. 88, 369–387, 1937.

KUENG, W.; WIRZ-JUSTICE, A.; MENZI, R.; CHAPPUIS-ARNDT, E. Regional brain variations of tryptophan, monoamines, monoamine oxidase activity, plasma free and total tryptophan during the estrous cycle of the rat. **Neuroendocrinology** 21:289–296, 1976.

LARAGH, J.H. Oral contraceptives - induced hypertension - nine years later. **Am J ObstetGynecol.** 1;126(1):141-7, 1976.

LEMALE, J.; BLOCH-FAURE, M.; GRIMONT, A.; ABIDA, B. IMBERT-TEBOUL, M. CRAMBERT, G. Membrane progesterin receptors alpha and gamma in renal epithelium. **Biochim Biophys Acta** 1783: 2234-2240, 2008.

LIN, K.C.; SAGAWA, N.; YURA, S.; ITOH, H.; FUJII, S. Simultaneous increases of leptin and gonadotropin-releasing hormone following exogenous estrogen administration in women with normally menstrual cycle. **Endocrine journal** 52:449–454, 2005.

LU, J.K.; LAPOLT, P.S.; NASS, T.E.; MATT, D.W.; JUDD, H.J. Relation of circulating estradiol and progesterone to gonadotropin secretion and estrous cyclicity in aging female rats. **Endocrinology** 116:1953–1959; 1985.

LU, Z. N. & BETHEA, L. C. Ovarian Steroid Regulation of 5-HT_{1A} Receptor Binding and G protein Activation in Female Monkeys. **Neuropsychopharmacology**, 27: 12-24, 2002.

MAFFEI, S.; DEL RY, S.; PRONTERA, C.; CLERICO, A. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women **Clinical Science**, 101, 447–453, 2001.

MARSTON, O.J.; GARFIELD, A.S.; HEISLER, L.K. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. **European journal of pharmacology.** 660:70–79, 2011.

MCKINLEY, M.J.; ALLEN, A.M.; MAY, C.N.; MCALLEN, R.M.; OLDFIELD, B.J.; SY, D.; MEMDELSON, F.A. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 28:990-2, 2001.

MECAWI, A.S.; VILHENA-FRANCO, T.; FONSECA, F.V.; REIS, L.C.; ELIAS, L.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. The role of angiotensin II on sodium appetite after low-sodium diet. **J Neuroendocrinol**, 25(3):281-91,2013 .

MECAWI, A. S.; LEPLETIER, A.; ARAUJO, I.G. FONSECA, F.V.; REIS, L.C. Oestrogenic influence on brain AT1 receptor signalling on thirst and salt appetite in osmotic-stimulated and sodium-depleted rats. **Exp. Physiol.** 93, 1002–1010. 2008.

MIYATA, S.; TSUJIOKA, H.; MASANOBU, I.; MATSUNAGA,W.; KURAMOTO,H.; KIYOHARA,T.; Time course of Fos e Fras expression in the hypothalamic supraoptic neurons during chronic osmotic stimulation *Molecular Brain Research* , 90:39-47, 2001.

MOHAMED, M.K.; RAHMAN, A.A. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats **European Journal of Endocrinology** 142 307–314, 2000.

MURATA, T.; NARITA, K.; HONDA, K.; MATSUKAWA, S.; HIGUCHI, T.Differential regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNAs in the rat uterus during pregnancy and labor: possible involvement of estrogen receptors in oxytocin receptor regulation. **Endocrine Journal**, 50(5):579-587, 2003.

MUSATOV, S.; CHEN, W.; PTAFF, D.W.; MOBBS, C.V.; YANG, X.J.; CLEGG, D.J.; KAPLIII, M.G.; OGAWA, S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2007.

NAKAJIMA, T.; TANIMOTO, Y.; TANAKA, M.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUSHI, T.; SATO, T. Neonatal estrogen receptor β is important in the permanent inhibition of epithelial cell proliferation in the mouse uterus. **Endocrinology**. May 28:en20151012. [Epub ahead of print]

NASCIMENTO, D.S. ; REIS, C.U.; GOLDENBERG, R.C.; ORTIGA-CARVALHO, T.M. PAZOMOURA,C.C.; GUGGINO, S.E. Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. **Pflugers Arch** 446: 593-599, 2003.

NODA, M. Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain **Exp Physiol**92.3:513–522,2007.

NOLAN, L.A. ; LEVY, A. Prolonged oestrogen treatment does not correlate with a sustained increase in anterior pituitary mitotic index in ovariectomized Wistar rats **Journal of Endocrinology** 200, 301–309, 2009.

NORGREN, R. Gustatory system. In: Paxinos, G. (ed). The rat Nervous System, 2nd. Ed. San Diego, Academic Press, p.751-71, 1995.

OELKERS, W.K.H. Effects of estrogen and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. **Steroids**61: 166– 171, 1996.

OIAN, P. TOLLAN, A.; FADNES, H.O. NODDELAND, H.; MALTAU, J.M. Transcapillary fluid dynamics during the menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol** 156: 952–955, 1987.

OLDFIELD, B.J.; MCKINLEY, M.J. Circunventricular organs. In: Paxinos, G. (ed). The rat Nervous System, 2 nd.ed. San Diego, **Academic Press**, p. 391-403, 1995.

PECHERE-BERTSCHI, A.; BURNIER, M. Gonadal steroids, salt-sensitivity and renal function **Curr Opin nephrol hypertens.** 16(1):16-21, 2007.

PIKE, R.L.; YAO, C. Increased sodium chloride appetite during pregnancy in the rat. **J Nutr.**101(2):169-75, 1971.

POPOVA, N.K. ;NAUMENKO, V.S.; CYBKO, A.S.; BAZOVKINA, D.V. Receptor-genes cross-talk: effect of chronic 5-HT(1A) agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin treatment on the expression of key genes in brain serotonin system and on behavior. **Neuroscience.** 2010 Aug 11;169(1):229-35.

PUERTA, M.; ROCHA, M.; GONZALEZ-COVADELA,S.; MCBENNETT, S.M.; ANDREWS, J.F. Changes in cytochrome oxidase activity in brown adipose tissue during oestrous cycle in the rat. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.** 139:433–437,1998.

REIS, L.C. Papel do sistema serotoninérgico na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico. **Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto**, 265p, 1993.

RICHTER, C.P.; BRAILEY, M.E. Water-intake and its relation to the surface área of the body. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**15, 570–578, 1929.

RIVERA, H.M.; SANTOLLO, J.; NIKONOVA, L.V.; ECKEL, L.A. Estradiol increases the anorexia associated with increased 5-HT_{2C} receptor activation in ovariectomized rats **Physiol Behav.**18; 105(2): 188–194, 2002.

RIVERA, H.M.; ECKEL, L.A. The anorectic effect of fenfluramine is increased by estradiol treatment in ovariectomized rats. **Physiology & Behavior.** 2005; 86:331–337, 2005.

ROCHA, M.; GRUESO, E.; PUERTA, M. The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. **The Journal of endocrinology.** 171:349–354, 2001.

ROEPKE, T.A.; MALYALA, A. BOSCH, M.A.; KELLY, M.J. RONNKLEIV, O.K. Estrogen regulation of genes important for K⁺ channel signaling in the arcuate nucleus. **Endocrinology.** 148:4937–4951, 2007.

ROEPKE, T.A.; BOSCH, M.A.; RICK, E.A.; LEE, B.; WAGNER, E.J.; SEIDLOVA-WUTTKE, D. WUTTKE, W.; SCANLAN, T.S. Contribution of a membrane estrogen receptor to the estrogenic regulation of body temperature and energy homeostasis. **Endocrinology.** 151:4926–4937, 2010.

ROSSI, D.V.; DAL, Y.; THOMAS, P. ; CARRASCO, G.A. ; DON CARLOS, L.L.; MUMA, N.A.; LI, Q. Estradiol-induced desensitization of 5-HT_{1A} receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptor-beta. **Psychoneuroendocrinology,** 35(7):1023-33, 2010.

SANTOLLO, J.; WILEY, M.D.; ECKEL, L.A. Acute activation of ER alpha decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.** 293:R2194–2201, 2007.

SANTOLLO, J.; TORREGROSSA, A.M. ECKEL, L.A. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. **Horm Behav.**60(1):86-93, 2011.

SANTOLLO, J.; DANIELS, D. Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. **Front Syst Neurosci**, 4:9:25, 2015.

SAR, M.; STUMPF, W.E. Simultaneous localization of [3H]estradiol and neurophysin I or arginine vasopressin in hypothalamic neurons demonstrated by a combined technique of drymount autoradiography and immunohistochemistry. **NeurosciLett**17: 179–184, 1980.

SCHULKIN, J. Sodium hunger: the search for a salty taste. Cambridge, **Cambridge University Press**, 1991.

SCUTERI, A.; BOS, A.J.; BRANT, L.J.; TALBOT, L.; LAKATTA, E.G.; FLEG, J.L. Hormone replacement therapy and longitudinal changes in blood pressure in postmenopausal women. **Ann Intern Med.**135(4):229–238, 2001.

SHI, H.; SORRELL, J.E.; CLEGG, D.J.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J. The roles of leptin receptors on POMC neurons in the regulation of sex-specific energy homeostasis. **Physiology & Behavior** 100:165–172, 2010.

SHUGHRUE, P.J; MERCHENTHALER, I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. **J Comp Neurol** 436: 64–81, 2001.

SIERRA-RAMIREZ. J.F.; LARA-RICALDEA, R.; LUJANC, M.; VELÁZQUEZ-RAMÍREZA, N.; GODÍNEZ- VICTORIA, M.; HERNÁNDEZ-MUNGUÍA.; PADILLAB,A.; GARZA-FLORESA, J.Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics after subcutaneousand intramuscular administration of medroxyprogesterone acetate (25 mg)and estradiol cypionate (5 mg) **Contraception** 84: 565–570, 2011.

SILVA, L.E.C.M; CASTRO, M.; AMARAL, F.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides **Braz J Med Biol Res**, 43(8) 759-766, 2010.

SINCHAK, K.; WAGNER, E.J. Estradiol signaling in the regulation of reproduction and energy balance. **Front Neuroendocrinol.** 33(4):342-63, 2012.

SLADEK, C.D.; SOMPONPUN, S.J. Estrogen receptors: their roles in regulation of vasopressin release for maintenance of fluid and electrolyte homeostasis. **Front Neuroendocrinol**, 29 (1): 114-127, 2008.

SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology.** 96(1):219-26, 1975.

SOMPOPUN, S.J.; SLADEK, C.D. Osmotic regulation of estrogen receptor-beta in rat vasopressin and oxytocin neurons. **J Neurosci** 23: 4261–4269, 2003.

SOMPONPUN, J. S. Neuroendocrine regulation of fluid and electrolyte balance by ovarian steroids: contributions from central oestrogen receptors. **J Neuroendocrinol**, 19(10):809-18, 2007.

STACHENFELD, N.S.; KEEFE, D.L.; TAYLOR, H.S. Responses to a saline load in gonadotropin-releasing hormone antagonistpretreated premenopausal women receiving progesterone or estradiol-progesterone therapy. **J Clin Endocrinol Metab** 90: 386-394, 2005.

STACHENFELD, N.S. DIPIETRO, L.; PALTER, S.F.; NADEL, E.R. Estrogen influences osmotic secretion of AVP and body water balance in postmenopausal women **Am J Physiol**, 274(1 Pt 2):R187-95, 1998.

STEPHENSON, L.A.; KOLKA, M.A. Plasma volume during heat stress and exercise in women. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol** 57: 373-381, 1988.

STONE, J.D.; CROFTON, J.T. SHARE, L. Sex differences in central cholinergic and angiotensinergic control of vasopressin release. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 263: R1030–R1034, 1992.

STRICKER, E.M.; THIELS, E.; VERBALIS, J.G. Sodium appetite in rats after prolonged dietary sodium deprivation: a sexually dimorphic phenomenon. **Am. J. Physiol.** 260, R1082–R1088, 1991.

SUSUKI, H.; BARROS, R.P.A.; SUGIYAMA, N.;KRISHNAN, B.C.;YADEN, B.C.; KIM, H.J.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Involvement of estrogen receptor b in maintenance of serotonergic neurons of the dorsal raphe **Molecular Psychiatry** 18: 674 -680, 2013.

THRASHER, T.N.; FREGLY, M.J. Effect of chronic treatment with an estrogen-progestogen combination on beta adrenergic-induced thirst. **Pharmacol Biochem Behav.** 8(2):177-83, 1978.

THUNHORST, R.L.; EHRLICH, K.J.; SIMPSON, J.B. Subfornical organ participates in salt appetite. **Behav Neurosci**, 104:637-42, 1990.

TOLLAN, A.; OIAN, P.; FADNES, H.O.; MALTAU, J.M. Evidence for altered transcapillary fluid balance in women with the pré-menstrual syndrome. **Acta Obstet Gynecol Scand**72: 238–242, 1993.

TOTH, M.J.; TCHERNOF, A.; SITES, C.K; POEHLMAN, E.T. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. **Int J Obes Relat Metab Disord.** 24:226–231, 2000.

TRITOS, N.A.; SEGAL-LIEBERMAN, G. VEZERIDIS, P.S.; MARATOS-FLIER, E. Estradiol-induced anorexia is independent of leptin and melanin-concentrating hormone. **Obesity research.** 12:716–724, 2004.

VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds. Methods of hormone radioimmunoassay, **Acad Press**, M:767-792, 1979.

VEGETO, E.; BELCREDITO, S.; ETTERI, S. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. **Proc Natl Acad Sci**100(16):9614–9619, 2003.

VERBALIS, J.G. BLACKBURN, R.E. HOFFMAN, G.E.; STRICKER, E.M. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviours. **Adv Exp Med Biol**, 395:209-25, 1995.

VERLANDER, J.; TRAN, T.M.; ZHANG, L.; KAPLAN, M.R. ; HEBERT, S.C. Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. **J Clin Invest** 101: 1661-1669, 1998.

VERNEY EB. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.** 135(878):25-106,1947.

VIJANDE, M.; COSTALES, M.; SCHIAFFINI, O. MARIN, B. Angiotensin-induced drinking: sexual differences. **Pharmacol Biochem Behav.** 8(6):753-5, 1978.

VILHENA-FRANCO,T.; MECAWI, A.S.; ELIAS, L.L.K; ANTUNES-RODRIGUES,J. Oestradiol potentiates hormone secretion and neuronal activation in response to hypertonic extracellular volume expansion in ovariectomised rats. **J Neuroendocrinol,** 23, 481-489,2011.

VOKES, T.J.; WEISS, N.M., SCHREIBER, J.; GASKILL, M.B.; ROBERTSON, G.L. Osmoregulation of thirst and vasopressin during normal menstrual cycle. **Am J Physiol Regulatory IntegrativeComp Physiol**254: R641–R647, 1988.

WANG, Z.Y.; YIN, L. Estrogen receptor alpha-36 (ER- α 36): A new player in human breast cancer. **Mol Cell Endocrinol.** doi: 10.1016/j.mce.2015.04.017. [Epub ahead of print]

WEIGT, C.; HERTRAMPF, T.; ZOTH, N.; FRITZMEIER, K.H.; DIEL, P. Impact of estradiol. ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity, **Molecular and cellular endocrinology** 351:227–238, 2012.

WOLF ,G. Refined salt appetite methodology for rats demonstrated by assessing sex differences. **J. Comp.Physiol.Psychol.** 96, 1016–1021, 1982.

XU, H.; QIN, S.; CARRASCO, G.A.; DAI, Y. FILARDO E.J.; PROSSNITZ, E.R.; BATTAGLIA, G. DONCARLOS, L.L. MUMA, N.A. Extra-nuclear estrogen receptor GPR30 regulates serotonin function in rat hypothalamus. **Neuroscience.** 158:1599–1607, 2009.

10.0 Anexos

Parâmetros (Médias±SEM)	Dia -1	Dia 0
Peso corporal	232,3±11,2	235,8±10,6
Ingestão de água (ml/100 g)	6,7± 2,2	7,2±1,3
Ingestão de salina (ml/100 g)	8,5±4,1	6,5±3,7
Ingestão de alimento (g/100 g)	6,7±0,8	6,9±0,9
Volume urinário (ml/100 g)	8,0±3,7	6,8±2,5
Osmolalidade urinária (mOsm/kg H ₂ O)	1146±264,3	1137±152,1

Tabela 12. Dados das ratas intactas antes da ovariectomia sob condições basais (n=16)

