

Fabiana Lucio de Oliveira

EFEITOS DA INTERAÇÃO DO ESTADO ALIMENTAR E DA AÇÃO ESTROGÊNICA
SOBRE O SISTEMA OCITOCINÉRGICO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de mestre em
Ciência.

Área de concentração: Fisiologia
Orientador: Dr. Celso Rodrigues Franci

Ribeirão Preto
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luzia e José Fabrício pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, nunca medindo esforços para a realização dos meus objetivos pessoais e acadêmicos.
Vocês são meus alicerces!

*"O importante da educação é o conhecimento não dos fatos, mas dos valores".
Dean William R. Inge*

AGRADECIMENTOS

À Deus que me proporcionou chegar até aqui, me dando sempre inspiração, capacidade, sabedoria, paciência e coragem.

"Reze como se tudo dependesse de Deus e trabalhe como se tudo dependesse de você". Cardeal Shellman

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, pela orientação, paciência e ensinamentos. Obrigada por respeitar os meus tropeços, angústias e desesperos, sempre me proporcionando reflexões que me levaram ao crescimento.

"Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina". - Cora Coralina

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Aldo Lucion e Prof. Dr^a Lucila Leico pelas sugestões e avaliação deste trabalho.

À minha irmã Luciana Lucio pelo carinho e amor. Que essa amizade dure para sempre!

À minha vó Ana pelo amor e orações extremamente necessárias!

À minha amiga Vanessa Penachio por toda a amizade, cumplicidade e carinho durante todos esses anos. A distância apenas serve para mostrar que nossa amizade é eterna e indestrutível.

"Todas as grandezas do mundo não valem um bom amigo". Voltaire

As minhas amigas de longe: Fernanda Marcuz, Franciele Sonccine, Janice Ramos, Elisângela Coutinho, Lílian Ghiseline e Leila Dias.

"Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos". Elmer Litterman

Aos amigos de casa: André, Augusto e especialmente ao Ernane por todas as dicas e sugestões neste trabalho. Meninos: obrigada pela amizade, paciência, convivência e por entender ou não as minhas "manias" por limpeza e organização.

Aos companheiros de laboratório: Leandro, Guillermo, Cármem, Bruno, Fábio e ao ex-aluno do laboratório Waldecy, pela ajuda com as imunos e programas de computador.

As amigas e ex-companheiras de laboratório Fernanda Lima e Claudia Caligioni pela amizade, pelos muitos momentos de alegria "ao vivo" ou "on line", por todas as dicas, conselhos, críticas e momentos tão agradáveis logo quando cheguei nesse laboratório. Vocês fazem muita falta aqui!

"A gente não faz amigos, reconhece-os" - Vinícius de Moraes

Aos amigos do departamento de Fisiologia: Lys, Ligia, Renata, Lílian, Andréia, Cadu, Daniela, Silvia, (pelas dicas e esclarecimentos prestados), Daniel, Marcio, Matheus, Renato, Cristiane, Marcelão, Cleyde e aos novatos: Fernanda, Jão, Marina e Ricardo.

Aos funcionários da secretaria: Elisa, Cláudia, Carlos e Fernando pelo atendimento simpático e ajuda na parte burocrática.

À Dra. Janete Anselmo-Franci, docente do departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto - USP pela disponibilização do microscópio de fluorescência e o sistema de imagem essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Rubens Fernando de Melo e Rogério Rosário Azevedo pelo apoio técnico.

À CAPES, FAPESP e CNPQ pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.

Goethe

RESUMO

O aumento da osmolalidade plasmática ativa mecanismos de sede bem como mecanismos inibidores do consumo adicional de soluto e indutores da excreção de sódio mediada, principalmente, pela ocitocina (OT) e pelo peptídeo natriurético atrial (ANP). A osmolaridade plasmática aumenta em consequência da alimentação, provocando elevação diretamente proporcional da concentração plasmática de ocitocina (OT) e de vasopressina (AVP). A OT liberada para a circulação sistêmica, estimula a excreção renal de sódio, diretamente e indiretamente por induzir a liberação de ANP pelo coração.

Os esteróides ovarianos também podem influenciar o balanço de líquidos indiretamente, bem como agir diretamente em neurônios OT e AVP do hipotálamo. Vários estudos verificaram a presença de ER- β em neurônios OT do PVN e SON. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a ativação dos neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON na presença de esteróides gonadais e de estímulo osmótico.

Nossos estudos mostram que animais tratados com estrógeno e realimentados após jejum de 48 horas tiveram diminuição da ativação dos neurônios OT do PVN e SON. O efeito inibitório do estrógeno nos neurônios OT pode também ter influenciado a secreção de OT. Os animais tratados com estrógeno tiveram concentração plasmática de OT menor quando comparado dos animais tratados com veículo. Assim, parece existir uma interação do sistema ocitocinérgico, com a condição estrogênica e a osmolalidade.

Palavras-chaves: ocitocina, receptores para estrógeno, osmolalidade, imunofluorescência.

ABSTRACT

Increased plasma osmolality triggers thirst and additional solute intake inhibitor mechanisms as well as induces salt excretion through oxytocin (OT) and atrial natriuretic peptide (ANP) release. Blood osmolality increases as a consequence of food intake; such an increase evokes augmentation of plasma OT and ANP. Plasma OT, direct and indirectly, induces heart ANP release, which, in turn, stimulates sodium renal excretion. The ovarian steroids can indirectly influence the balance of body fluids and directly acting upon hypothalamic OT and AVP neurons, as well. Some studies have shown the expression of ER- β in the PVN and SON OT neurons.

In this study, we aimed to verify the activity of PVN and SON OT neurons under the following conditions: presence or absence of gonadal steroids; ad libitum feeding, fasting for 48 h our refed after 48 h fasting.

Our results show decreased activity of OT neurons in the PVN and SON in estrogen-treated animals, which were refed after 48-hour of fasting. Estrogen inhibitory effect on OT neurons may have also influenced OT release. Plasma OT in estrogen-treated animals was lower than their vehicle-treated counterparts. Thus, it appears to take place the interaction of the OT system with estrogenic condition and osmolality.

Keywords: Oxytocin, estrogen receptors, osmolality, immunofluorescence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OT	Ocitocina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AVP	Vasopressina
SFO	Órgão subfornicial
OVL	Órgão vascular da lâmina terminal
AP	Área postrema
AV3V	Região ântero-ventral do terceiro ventrículo
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SON	Núcleo supra-óptico do hipotálamo
SNC	Sistema nervoso central
PeM	Núcleo periventricular
AC	Núcleo comissural anterior
GH	Hormônio do crescimento
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
LH	Hormônio luteinizante
PRL	Prolactina
RNAm	RNA mensageiro
ER	Receptor de estrógeno
ERE	Elemento responsivo ao estrógeno
ml	Mililitro
i.m.	Intramuscular
µg	Micrograma
E₂	Estrógeno
i.s.c.	Injeção subcutânea
µl	microlitro
M	Molar
mm	Milímetros
OVX	Ovariectomizada
mOsm/Kg	Miliosmol por quilograma
FOS-IR	FOS imunorreativo
OT-IR	Ocitocina imunorreativa
NMDA	N-metil-D-Aspartato
HNS	Explante do sistema Hipotálamo-neurohipófise
NR	Subunidade do receptor NMDA
SP1	Fator específico do promotor
RNA(hn)	RNA heteronuclear

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.2. Esquema Experimental	29
3.3. Coleta de sangue	31
3.4. Determinação da osmolalidade	31
3.5. Dosagem de ocitocina	31
3.6. Perfusão e preparação do tecido para imuno-histoquímica	32
3.7. Imuno-histoquímica	33
3.8. Aquisição das imagens	34
3.9. Contagem dos neurônios	34
3.10. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Experimento I	37
4.1.1 Osmolalidade Plasmática	37
4.2. Experimento II	38
4.2.1. Controle dos anticorpos	38
4.2.2. Ativação dos neurônios OT e expressão da proteína FOS – dupla marcação	39
4.2.3. Expressão da proteína FOS	49
4.2.4. Expressão da proteína FOS e marcação para OT (dupla marcação)	52
4.3. Experimento III	55
4.3.1. Dosagem Hormonal	55
5. DISCUSSÃO	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

A homeostase hidro-eletrolítica é indispensável para condições adequadas de sobrevivência dos organismos. Dessa forma, o volume, a osmolalidade e a composição dos líquidos corporais devem ser mantidos dentro de limites estreitos de variações.

O sódio, o principal soluto extracelular, é o mais efetivo em criar um gradiente osmótico que permite o movimento de água entre os compartimentos intra e extracelulares. O balanço de sódio é mantido em parte por mudanças no apetite ao sódio e natriurese, regulados osmoticamente (Bourque e Oliet, 1997).

Em condições de hiperosmolalidade, não estão ativados apenas os mecanismos de sede e de redução da excreção urinária de água mediada pela vasopressina (AVP), mas também os mecanismos que inibem o consumo adicional de soluto e induzem a excreção de sódio mediada, principalmente, pela ocitocina (OT) e pelo peptídeo natriurético atrial (ANP) (Antunes-Rodrigues e cols., 1997; McCann e cols., 1989).

Para que os sinais gerados por alterações da osmolalidade possam ser integrados no sistema nervoso central (SNC), é necessária a presença de receptores (osmorreceptores), células capazes de detectar variações na osmolalidade. Embora seja aceito que neurônios magnocelulares sejam osmossensíveis (Bourque, 1989; Mason, 1980), há estudos demonstrando que esses neurônios requerem aferências de outras estruturas, denominadas órgãos circumventriculares, para responder de forma apropriada a mudanças osmóticas (Leng e cols., 1989; Honda e cols., 1990). Essas estruturas centrais são desprovidas de barreira hematoencefálica, e por isso, são capazes de detectar variações na osmolalidade plasmática. Elas estão localizadas ao redor do sistema ventricular e três delas estão envolvidas na homeostase dos líquidos corporais: órgão subfornicial

(SFO), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e área postrema (AP) (Skott, 2003). A lâmina terminal é uma estrutura que contém o SFO, o OVLT e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO).

A região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) inclui a parte ventral do MnPO, o OVLT e porções periventriculares do terceiro ventrículo. Essas estruturas juntamente com o SFO contêm neurônios sensíveis às variações de osmolalidade plasmática e do líquido cefalorraquidiano.

Estudos neuroanatômicos e eletrofisiológicos demonstraram que a região AV3V e as conexões com o SFO apresentam projeções diretas para células magnocelulares ocitocinérgicas e vasopressinérgicas dos núcleos paraventriculares (PVN) e supra-ópticos (SON) (Anderson e cols., 1990; Hatton, 1990; Oldfield e cols., 1991,1992). Além disso, essas regiões integram sinais endócrinos provenientes da circulação periférica como angiotensina II, relaxina e ANP (Mendelsohn e cols., 1984; Osheroff e Phillips, 1991).

Lesão da região AV3V diminui a resposta de neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos ao estímulo osmótico, enquanto que as respostas de sucção e parto permanecem inalteradas (Cunningham e Sawchenko, 1991). Dessa forma, essa região é necessária para a resposta neurosecretória das células ocitocinérgicas e vasopressinérgicas do PVN e SON, após estímulo osmótico (Cunningham e Sawchenko, 1991).

O aumento da osmolalidade plasmática causa elevação diretamente proporcional da concentração plasmática de OT, induzindo a excreção de sódio e cloreto (Balment e cols., 1980) e um dos estímulos efetivos para a secreção de AVP é o aumento de cerca de 2% da osmolalidade (Sladek e Armstrong, 1985).

A OT é classicamente conhecida por suas ações no trabalho de parto e na ejeção de leite. Dale (1906) foi o primeiro a observar a contração uterina em gatas ao injetar endovenosamente extratos hipofisários. Em 1911, Ott e Scott demonstraram que extratos neuro-hipofisários aumentavam o fluxo de leite em cabras lactantes. Em 1940, Scharrer e Scharrer demonstraram que a OT era produzida no hipotálamo e foi o primeiro hormônio cerebral a ser identificado e purificado, caracterizando o cérebro como órgão endócrino (Du Vigneaud e cols., 1953; Du Vigneaud, 1955).

A OT é um nonapeptídeo com peso molecular de 1007 KDa e possui uma meia-vida na circulação sistêmica de aproximadamente 5-10 minutos. Uma vez lançada na circulação, é transportada na forma livre, sendo rapidamente degradada pelas endopeptidases, o que justifica sua meia-vida muito curta.

O PVN e SON concentram a maior densidade de neurônios ocitocinérgicos magnocelulares e parvocelulares do SNC. No entanto, aproximadamente um terço dos neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do sistema magnocelular pode ser encontrado fora do PVN e SON (Rhodes e cols., 1981). O núcleo magnocelular periventricular (PeM) e o núcleo comissural anterior (AC), também denominado porção magnocelular anterior (Swanson e Kuypers, 1980), são dois desses grupos, compostos quase que exclusivamente por neurônios ocitocinérgicos. Esses grupos são denominados neurosecretórios acessórios, embora muitas vezes sejam incluídos no PVN. Também, foi descoberta a presença de OT e AVP em neurônios do sistema neurosecretório parvocelular (Vandesande e cols., 1977).

Os neurônios magnocelulares projetam seus axônios essencialmente para a neuro-hipófise, onde ramificam-se em milhares de terminais neurosecretórios (Nordmann, 1977; Scharrer e Scharrer, 1940). Já os neurônios parvocelulares estão

presentes em vários núcleos do PVN que enviam projeções para a camada externa da eminência mediana (Vandesade e cols., 1977; Lechan e cols., 1982), tronco cerebral (Swanson e Sawchenko, 1983) e para áreas olfatórias e límbicas (Buijs e Swaab, 1997; Sofroniew e Schrell, 1981). As projeções de OT para a camada externa da eminência mediana (Lechan e cols., 1982) influenciam a secreção de hormônios da adeno-hipófise tais como: hormônio do crescimento (GH), hormônio adrecorticotrófico (ACTH), hormônio luteinizante (LH) e prolactina (PRL) (Samson e cols., 1986; Lumpkin e cols., 1987; McCann, 1991; Franci e cols., 1993).

A OT liberada para a circulação sistêmica, além das ações classicamente descritas como a contração uterina e ejeção de leite, possui entre outras ações periféricas, a de estimular a excreção renal de sódio, diretamente (Verbalis e cols., 1991) e indiretamente por estimular a liberação de peptídeo natriurético atrial pelo coração (McCann e cols., 1994; Gutkowska e cols., 1997). A OT exerce ação natriurética em concentrações plasmáticas fisiológicas que parece ser mediada por receptores específicos para OT presente nos rins (Verbalis e col., 1991).

Outras ações da OT começaram a ser estudadas quando pesquisadores verificaram sua depleção na neuro-hipófise em ratos privados de água ou submetidos à sobrecarga salina (Jones e Pickering, 1996); aumento de sua concentração plasmática após privação de água (Dogterom e cols., 1977); e também pela presença de neurônios OT em ratos machos (Swaab e col., 1975). Além da ação natriurética direta ou indireta da OT, há evidências para a ação da OT central na modulação do apetite ao sódio (Antunes-Rodrigues e cols., 1986; Stricker e Verbalis, 1987) e também foi verificado que a administração central de OT induz ativação de proteína FOS em regiões envolvidas no controle da ingestão alimentar (Olson e cols., 1993).

A osmolalidade plasmática também aumenta em consequência da alimentação, pela ingestão de sódio (Bloom e cols., 1975; Houpt e cols., 1983; Burlet e cols., 1992) e essa ingestão envolve um comportamento regulatório complexo no qual interagem mecanismos de controles inibitórios e excitatórios (Cunningham e Sawchenko, 1991).

Dessa forma, a OT estudada inicialmente como um hormônio relacionado às funções reprodutivas, está sendo identificada também como hormônio relacionado ao controle hidro-eletrolítico. Há uma série de estudos mostrando alterações no balanço hidro-eletrolítico em diferentes fases do ciclo reprodutivo, incluindo o homem e o rato.

Os esteróides ovarianos também podem influenciar o balanço de líquidos indiretamente, modulando sistemas hormonais que regulam tanto o consumo quanto a excreção de água, como é o caso do sistema hipotálamo-neuro-hipofisário, bem como agir diretamente em neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do hipotálamo.

Durante o ciclo estral de ratas, observou-se uma variação no consumo de água e de alimentos. Durante o proestro e estro, o consumo de água e alimento diminui. No metaestro e diestro, quando as concentrações plasmáticas de estrógeno e progesterona estão relativamente baixas, este padrão é revertido. Além disso, tem sido demonstrado em ratas que o fluxo urinário, a concentração de sódio na urina e a taxa de excreção de sódio são menores no estro, quando comparados ao diestro (Forsling e Peysner, 1988; Crocker e Hinsull, 1972).

Alguns estudos têm mostrado a variação do conteúdo de OT no PVN, SON, na neuro-hipófise, da concentração no sangue porta-hipofisário e na circulação sistêmica durante o ciclo estral, com o aumento de atividade ocitocinérgica no

proestro (Crowley e cols., 1978; Sarkar e Gibbs, 1984; Greer e cols., 1986; Windle e Forsling, 1993). A expressão de RNAm de OT em neurônios magnocelulares do PVN (Van Tol e cols., 1988) aumenta no início da puberdade e diminui após castração (Miller e cols., 1989), sugerindo uma possível ação do estrógeno na sua expressão. A administração de estrógeno estimula a liberação periférica de OT, aumenta a atividade elétrica e altera a organização estrutural de corpos celulares e dendritos de neurônios ocitocinérgicos (Amico e cols., 1981; Negoro e cols., 1973; Caldwell e cols., 1988).

A regulação dos neurônios OT não é somente influenciada pelo estrógeno, mas também pela associação de estrógeno e progesterona (Amico e cols., 1995). Estudos em ratos demonstraram que o tratamento com estrógeno e progesterona aumenta a concentração de RNAm de OT no PVN (Amico e cols., 1997; Thomas e Amico, 1996). Porém, o tratamento apenas com estrógeno é suficiente para aumentar a expressão de RNAm no hipotálamo, sugerindo que, apesar da progesterona aumentar o efeito, o estrógeno é o ligante essencial (Chung e cols., 1991).

Em nosso laboratório mostrou-se que a concentração de OT aumenta na manhã do proestro e permanece elevada até a manhã do estro (Caligioni e Franci, 2002). Nesse mesmo estudo, em ratas ovariectomizadas, o tratamento com estrógeno apenas ou estrógeno e progesterona potencializaram a resposta da secreção de OT à injeção intraperitoneal de salina hipertônica. Dessa forma, parece que a secreção de OT depende de estrógeno, tanto em condições fisiológicas bem como em situações de desequilíbrio da homeostase.

Embora admita-se a ação dos esteróides gonadais nos neurônios ocitocinérgicos, não se sabe ainda como essa regulação acontece exatamente.

O primeiro estudo que descreve a distribuição de receptores para estrógeno no cérebro, usando autoradiografia *in vivo* com estradiol radiomarcado (H^3) foi realizado na década de 70 (Stumpf, 1970; Pfatt e Keiner, 1973; Stumpf e cols., 1975), detectando áreas ligadas ao estrógeno no SON e PVN.

Rhodes e cols., (1981) usando a dupla marcação de autoradiografia *in vivo* com imunocitoquímica mostraram que neurônios OT e AVP concentravam estrógeno radiomarcado. Essa foi a primeira evidência de que o estrógeno podia regular diretamente esses peptídeos, no entanto com o uso de anticorpos específicos para receptor de estrógeno, observou-se que poucas células imunorreativas ao estrógeno estavam presentes no PVN e SON (Cintra e cols., 1986; Sar e Parikh, 1986; Axelson e Van Leeuwen, 1990). Esses achados causaram dúvidas em relação ao estudo de estrógeno ligado e questionaram se o estrógeno de fato modula diretamente a expressão do gene da OT.

A clonagem do primeiro receptor para estrógeno (ER), denominado ER- α foi feita em 1986 (Green e cols., 1986) e a do segundo subtipo, denominado ER- β , foi em 1996 (Kuiper e cols., 1996), o qual foi clonado a partir de tumor da próstata de ratos. Esses receptores estão presentes em diversas áreas do cérebro, incluindo a área preóptica medial, núcleo arqueado, núcleo ventromedial e amígdala corticomedial (Simerly e cols., 1990; Shughrue e cols., 1997). Existem relatos da presença de ER- α no PVN, porém eles não foram colocalizados em neurônios OT (Suzuki e Handa, 2005). Recentemente, demonstrou-se a presença de ER- α na porção parvocelular anterior e periventricular em uma pequena população de neurônios com hormônio liberador de tireotrofinas (TRH) de ratas intactas sem a definição da fase do ciclo estral. Entretanto, não foi observada ER- α no SON em nenhum local analisado (Suzuki e Handa, 2005).

Pode existir, em ratos, uma possível regulação indireta do estrógeno nos neurônios OT por via do ER- α , considerando que há projeções de neurônios que se ligam ao estrógeno localizados na MPOA e na OVLT para o SON, onde há expressão de ER- α (Voisin, Simonian e Herbison, 1997)

Vários estudos mostraram a presença de ER- β e de seu RNAm em neurônios OT (Simonian e Herbison, 1997; Suzuki e Handa, 2005; Somponpun e Sladek, 2003; Hrabovszky e col., 1998; Shughrue e col., 1996), Mas em relação ao SON os estudos são contraditórios. Há expressão elevada do ER- β em regiões isentas ou com muito pouco ER- α , como o PVN e SON (Shughrue e cols., 1996; Osterlund e cols., 2000; Shughrue e Merchenthaler, 2001), em ambos neurônios parvocelulares e magnocelulares (Shughrue e cols., 2002).

Em ratas castradas, há estudos mostrando que o tratamento com estrógeno promove a diminuição significativa da expressão de ER- β no PVN (Suzuki e Handa, 2004), mas há também outros estudos que não verificaram a variação da expressão do ER- β dependente da concentração de esteróides gonadais circulantes (Greco e col., 2001). Esses dados contraditórios podem ser devido a diferentes doses de estrógeno administradas a ratas ovariectomizadas.

Estudos feitos em ratos machos mostraram que as variações na osmolalidade também regulam a expressão de ER- β , onde a hiperosmolalidade diminui a expressão de RNAm e a proteína para ER- β em neurônios magnocelulares (Somponpun e Sladek, 2003).

Na possibilidade do ER- β poder regular peptídeos neuroendócrinos, vários estudos têm examinado o efeito do estrógeno na expressão de genes de neuropeptídeos hipotalâmicos. Numerosos estudos têm suportado a idéia do estrógeno poder influenciar diretamente o gene de OT e essa regulação é complexa.

O estrógeno aumenta o RNAm de OT especificamente em neurônios do PVN (Amico e cols., 1995; Thomas e cols., 1995), assim como o estrógeno pode aumentar similarmente o RNAm de AVP no PVN (Patchev e cols., 1995).

Esses achados juntamente com a descoberta de um elemento responsivo ao estrógeno (ERE) funcional na região promotora do gene de OT em ratos (Ivell e Richter, 1984) sugerem que o estrógeno pode agir diretamente em neurônios OT para regular a transcrição gênica. Estudos de cotransfecção de células com ER- β e ERE, demonstraram que o estrógeno age sobre o ER- β , podendo ativar o gene de transcrição de uma maneira dose-dependente (Kuiper e cols., 1998).

Muitos estudos têm tratado ratas ovariectomizadas com estrógeno por vários dias ou semanas para avaliar as mudanças na expressão do gene de OT, mas esses estudos têm demonstrado falhas nas informações se o estrógeno age diretamente nos neurônios OT ou indiretamente por interneurônios ou outras regiões do cérebro. Há trabalhos mostrando que o estrógeno não tem efeito significativo na concentração de OT no PVN (Van Tol e cols., 1988; Crowley e cols., 1993), outros estudos demonstraram que o estrógeno é capaz de atenuar o RNAm de OT no PVN em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (Shughrue e cols., 2002). A razão para essas diferenças é desconhecida. É possível que o sistema ocitocinérgico responda de forma diferente a diferentes concentrações de estrógeno, que pode envolver ações diretas e indiretas.

Baseado nessas informações, torna-se pertinente a melhor compreensão de como o estrógeno modula os neurônios OT no PVN e SON, frente ao estímulo osmótico induzido pela alimentação.

2. OBJETIVOS

Considerando a variação da secreção de ocitocina em resposta a estímulos osmóticos e em relação ao estado estrogênico, o objetivo geral deste trabalho foi analisar a interação da ação estrogênica e do estado alimentar na atividade de neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON de ratas ovariectomizadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a expressão de FOS em neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo, em estado alimentar *ad libitum*, jejum por 48 horas e realimentação por duas horas após jejum de 48 horas; e
2. Avaliar concentração plasmática de ocitocina nas mesmas condições experimentais referidas no item anterior.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do Biotério Central do Campus da USP-Ribeirão Preto, com peso entre 160 - 180g, mantidas em fotoperíodo de 12/12 horas, temperatura aproximada de 22° C e água e ração *ad libitum*, (exceto no período de 48 horas nos grupos submetidos ao jejum). Os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP durante todo o experimento. Para analisar os efeitos de esteróides ovarianos, as ratas em metaestro foram anestesiadas por injeção intraperitoneal de Tribromoetanol 2,5% (1 ml/100g de peso corporal) e ovariectomizadas bilateralmente através de incisões laterais de 1-2 cm, pelas quais os ovários e as porções uterinas superiores foram expostas para remoção do ovário. Os animais receberam uma dose (0,2 ml/animal, i.m.) profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, FONTOURA-WYETH S.A.). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, Protocolo N° 026/2007.

Após 13 dias, os animais foram submetidos à terapia hormonal substitutiva com estrógeno ou somente com o veículo.

Os animais foram divididos em 3 grupos, os quais foram divididos em dois subgrupos cada um:

I) Grupo *Ad libitum*:

Estes animais receberam terapia hormonal substitutiva de estrógeno ou veículo por 3 dias às 9 horas da manhã e no dia do experimento, às 15 horas, foi feita a coleta de sangue seguido de perfusão.

II) Grupo Jejum:

Estes animais receberam terapia substitutiva de estrógeno ou veículo por 3 dias às 9 horas da manhã, no dia 2 às 15 horas foram submetidos ao jejum por 48 horas até o dia do experimento, quando foi realizada a coleta de sangue seguido de perfusão.

III) Grupo realimentado:

Estes animais receberam terapia substitutiva de estrógeno ou veículo por 3 dias às 9 horas da manhã, no dia 2 as 13 horas, esses animais foram submetidos ao jejum por 48 horas até às 13 horas do dia do experimento, quando eles foram realimentados.

3.2. Esquema Experimental

Os animais foram divididos em seis grupos, como esquematizados abaixo:

GRUPO	- 3 dias	- 2 dias	- 1 dia	Dia do experimento
1	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	Coleta de sangue e perfusão (15 h)
2	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂ Jejum a partir das 15 h	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	Coleta de sangue e perfusão (15h)
3	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂ Jejum a partir das 13 h	i.s.c. (9h) 10 µg - E ₂	Realimentação às 13 h por 2 h Coleta de sangue e perfusão (15 h)
4	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	Coleta de sangue e perfusão (15 h)
5	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	i.s.c. (9h) veículo (óleo) Jejum a partir das 15h	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	Coleta de sangue e perfusão (15 h)
6	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	i.s.c. (9h) veículo (óleo) Jejum a partir das 13h	i.s.c. (9h) veículo (óleo)	Realimentação às 13 h por 2 h Coleta de sangue e perfusão (15 h)

i.s.c. = injeção subcutânea; E₂ = Cipionato de estradiol (10 ug / 0,1 ml / animal – Laboratórios Pfizer - Brasil) ou veículo= óleo de milho (Mazola®).

3.3. Coleta de sangue

Após os tratamentos específicos, no dia do experimento, os animais foram anestesiados às 15 horas com Tribromoetanol 2,5% (1 ml/100g de peso corporal – Aldrich, USA). Após a abertura da cavidade abdominal, o sangue foi coletado diretamente da veia porta antes do início da perfusão, centrifugado a 3000 rpm, sob refrigeração a 4° C, por 15 minutos. O plasma foi separado e devidamente acondicionado em freezer à temperatura de -20° C para as dosagens de osmolalidade e ocitocina.

3.4. Determinação da Osmolalidade

A osmolalidade plasmática foi determinada por ponto de congelamento através do osmômetro FISKE MARK3 OSMOMETER (Fiske Associates, Norwood, Massachusetts, USA).

3.5. Dosagem de ocitocina

Previamente ao radioimunoensaio procedeu-se a extração de ocitocina do plasma utilizando-se acetona e éter de petróleo conforme descrição a seguir:

Alíquotas de 250 µl de plasma foram pipetadas em tubos numerados aos quais foram adicionados 500 µl de acetona (Vetec, Brasil) à 4°C. Após agitação por 1 minuto e centrifugação (16,1 g), os conteúdos sobrenadantes foram vertidos em outros tubos igualmente numerados, seguindo-se a adição de 1 ml de éter de petróleo (Analyticals - Carlo Erba, Brazil) à 4°C. Após agitação de 1 minuto, a fase superior foi aspirada e a fase inferior foi liofilizada e armazenada a -20°C até o momento do radioimunoensaio.

O material liofilizado, previamente extraído do plasma, foi descongelado e ressuspenso em solução tamponada num volume correspondente a 40 % do volume de plasma utilizado, ou seja, 100 μ L.

A dosagem de OT foi realizada por radioimunoensaio de duplo anticorpo. O anticorpo específico para OT utilizado foi o produzido em coelho pelo laboratório da Dra. Mariana Morris (Wright State University, USA). A anti-gamaglobulina para precipitação da reação do radioimunoensaio foi produzida em ovelha pelo Laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). A reação de precipitação com anti-gamaglobulina foi facilitada pela utilização de uma solução de polietileno glicol 5 %. O padrão utilizado (OT – 8152) foi adquirido da Peninsula Laboratories (Califórnia, USA). O hormônio iodinado foi cedido pelo Laboratório do Prof. Dr. José Antunes Rodrigues (FMRP- USP).

3.6. Perfusão e preparação do tecido cerebral para imuno-histoquímica

Os animais foram perfundidos com 80 ml de tampão Fosfato salina (PBS) 0,01 M, pH 7,4 e em seguida com 320 ml de solução de paraformaldeído 4% em tampão Fosfato 0,1 M. Após a perfusão, o cérebro foi retirado imediatamente e imerso em solução de paraformaldeído 4% por 2 horas e em seguida transferido para uma solução de sacarose 30% até a saturação do tecido. Após a crioproteção o material foi congelado em isopentano por 30 segundos e mantido à temperatura de -70° C até ser cortado e processado para imuno-histoquímica. Secções coronais de 14 μ m foram feitas tendo como referência o Atlas estereotáxico Sawson (1992) e montadas em lâminas gelatinizadas.

3.7. Imuno-histoquímica

As secções foram inicialmente lavadas com PBS 0,1 M por 25 minutos e, em seguida incubadas em solução de PBS + glicina 0,1 M, por 10 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito incubando as secções por 1 hora em solução de PBS 0,1M + BSA (soro albumina bovina) 1% + triton 0,2%.

Para imunolocalização de OT e FOS, os tecidos foram incubados com o anticorpo policlonal produzido em coelho, específico contra a proteína FOS (SC 52, Santa Cruz Biotechnologies - USA) na diluição de 1:500, conjuntamente com o anticorpo monoclonal produzido em camundongo, específico contra OT (gentilmente cedido pelo Dr. Harold Gainer, National Institute of Health, Bethesda-MD, USA) na diluição 1:2000, por aproximadamente 16 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, após as lavagens com PBS, as secções foram incubadas com segundo anticorpo por uma hora em TFS com Anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo produzidas em jumento, conjugadas com AlexaFluor 594 e com AlexaFluor 488 (Molecular Probe, USA) respectivamente, usadas como anticorpos secundários.

Todas as lâminas após o processo imuno-histoquímico foram lavadas com PBS por 25 minutos e por último, passadas na água destilada para retirar o excesso de sal, e então cobertas com lamínulas usando Fluoromount-G (Eletron Microscopy Science, Hatfield, PA) como meio de montagem.

Controle da imuno-histoquímica: Em todos os experimentos, foram realizados controles negativos, com a omissão dos anticorpos primários e secundários, para confirmar a especificidade dos anticorpos utilizados.

3.8. Aquisição das imagens

As secções foram examinadas em microscópio para fluorescência Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss, Germany) e as imagens capturadas por câmera digital (Carl Zeiss, Germany)

As secções cerebrais contendo neurônios marcados positivamente para FOS e OT ou ambas (dupla marcação) foram adquiridas e classificadas em regiões de acordo com o Atlas Estereotáxico Sawson (1992) e fotografadas bilateralmente.

3.9. Contagem de neurônios

A contagem de células marcadas foi feita manualmente com base em critérios de contagem, levando em consideração a intensidade da coloração nuclear e citoplasmática, visualização no mesmo plano e delimitação dos componentes celulares. Para essa contagem foi utilizado o programa computacional Image J® (programa computacional disponibilizado gratuitamente pelo National Institute of Health, USA - <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Para cada animal, uma amostra de cada região cerebral de interesse, PVN ou SON, foi adquirida. A delimitação dos núcleos estudados foi realizada com base nas coordenadas descritas por Swanson (1992).

O PVN foi analisado em duas sub-áreas distintas, partindo da região rostral em direção à caudal: porção magnocelular anterior (MA: -0,83 mm em relação ao bregma) e porção magnocelular medial (MM: -1,53 mm em relação ao bregma). O SON foi analisado em toda sua extensão com amostras a partir de sua porção anterior (-0,83 mm em relação ao bregma).

Em cada fotomicrografia foi contado o número de neurônios que expressaram marcação para FOS, OT ou marcação FOS/OT no PVN ou SON e em seguida, foi calculada a média aritmética do número de neurônios marcados em 2-3 secções bilaterais de cada região cerebral estudada.

3.10. Análise Estatística

Os resultados da osmolalidade, da dosagem hormonal e das contagens neuronais foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância (two-way - ANOVA) seguida de pós-teste para comparações múltiplas (Bonferroni test). O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I

4.1.1. Osmolalidade Plasmática

A osmolalidade plasmática dos animais tratados com veículo realimentados ($318,1 \pm 1,36$ mOsm/KgH₂O) foi significativamente maior que a dos animais *ad libitum* ($305,4 \pm 1,6$) e dos animais em jejum por 48 horas ($301,6 \pm 1,4$ mOsm/KgH₂O). A osmolalidade dos animais tratados com estrógeno realimentados ($320 \pm 3,83$ mOsm/KgH₂O) também foi significativamente maior quando comparados com os animais *ad libitum* ($309,7 \pm 1,98$ mOsm/KgH₂O) e dos animais em jejum ($302 \pm 3,22$ mOsm/KgH₂O). Porém, não houve diferença significativa em função dos tratamentos (veículo ou estrógeno). A figura 1 mostra a osmolalidade plasmática, expressa em mOsm/Kg e a figura 2 mostra a variação percentual da osmolalidade plasmática dos grupos jejum e realimentados em comparação aos animais *ad libitum* (controle).

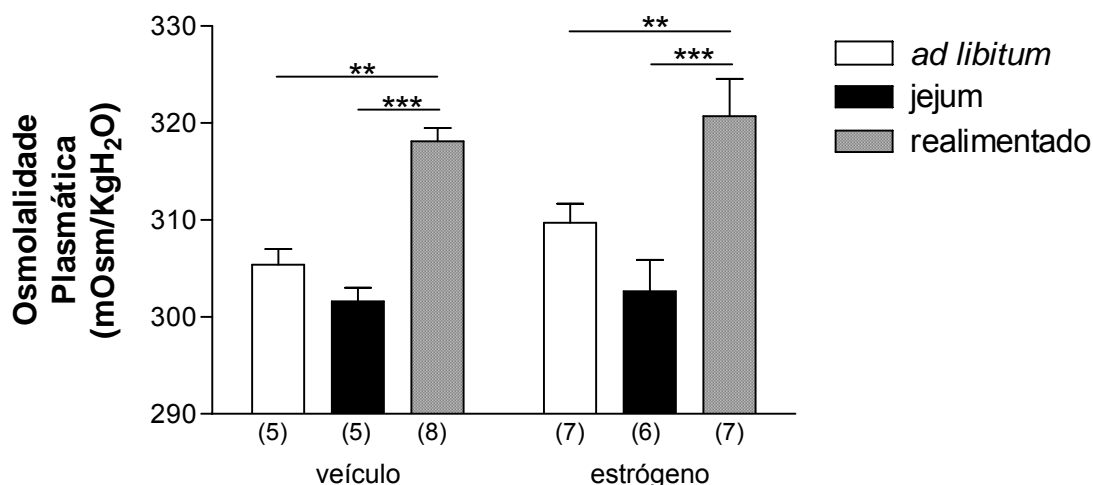


Figura 1: Osmolalidade Plasmática (mOsm/Kg H₂O) nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo *ad libitum* e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo jejum.

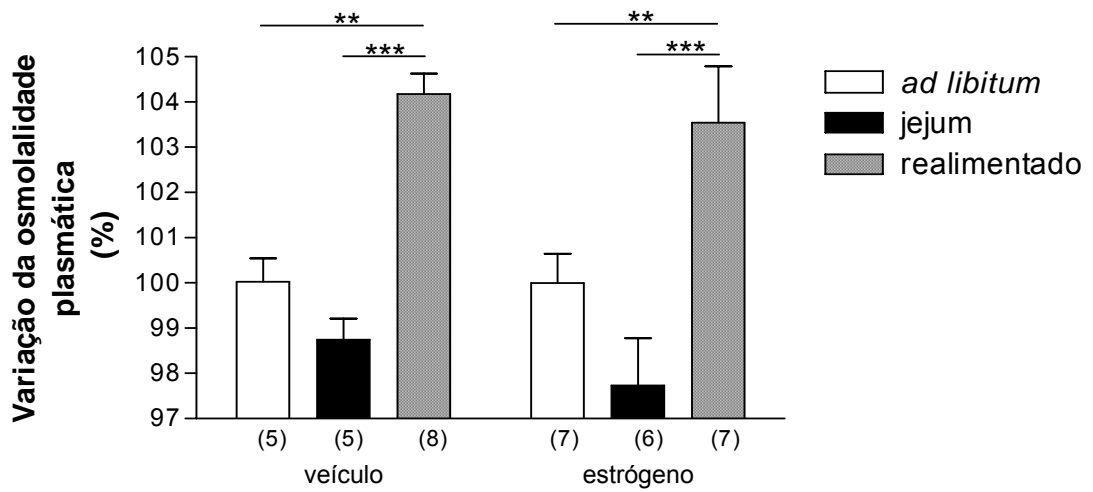


Figura 2: Variação percentual (%) osmolalidade plasmática nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo *ad libitum* e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo jejum.

4.2. Experimento II

4.2.1. Controle dos anticorpos

Foi realizado o controle dos anticorpos com omissão do primeiro anticorpo para OT e FOS:



Figura 3: Validação do anticorpo secundário para OT e FOS. Em A: fotomicrografia de secções coronais (14 μ m) do núcleo paraventricular magno medial (MM) mostrando a ausência de marcação para OT; e em B: mostrando a ausência de marcação para FOS.

4.2.2. Ativação de neurônios OT e expressão da proteína FOS – dupla marcação

O estudo de dupla marcação mostrou que houve ativação, expressa por FOS, dos neurônios OT no PVN e SON de ratas OVX tratadas com veículo ou estrógeno, submetidas à realimentação por duas horas após jejum de 48 horas, por outro lado, nos animais OVX com acesso à alimentação submetidos *ad libitum* ou ao jejum, tratados com estrógeno ou veículo, não houve essa dupla marcação, como pode ser observado nas figuras 4, 6 e 8.

A figura 4 mostra secções coronais da porção magnocelular anterior (MA) do PVN de ratas OVX tratadas com estrógeno ou veículo nas condições *ad libitum*, de jejum (48 horas) e de realimentação, com processamento para imunofluorescência para OT e FOS.

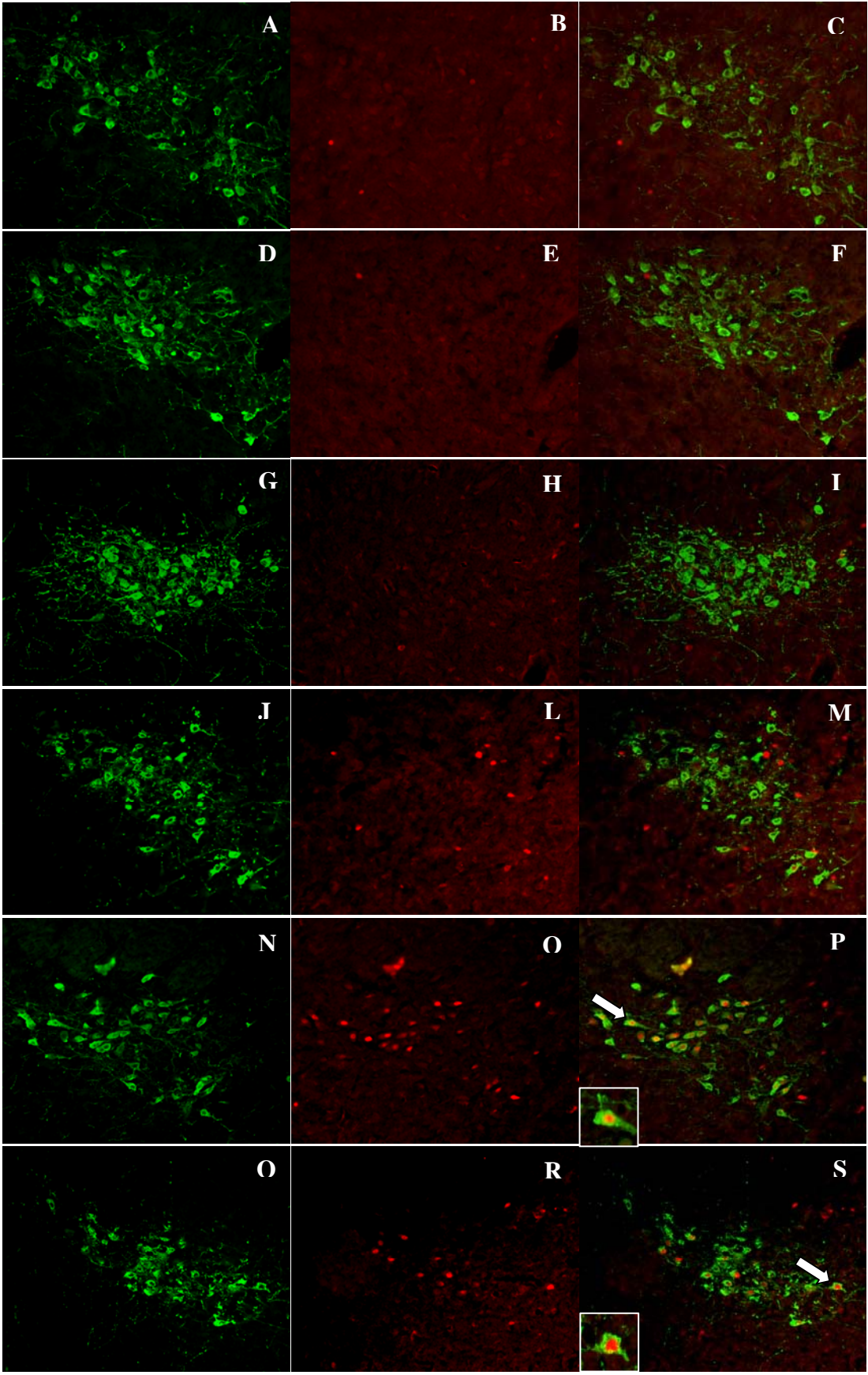


Figura 4: Fotomicrografias mostrando IR– OT/FOS em secções coronais (14 µm) do núcleo magnocelular anterior (MA) do PVN. A, B e C: OVX tratadas com veículo e alimentação *ad libitum*; D, E e F: OVX tratadas com estrógeno e com alimentação *ad libitum*; G, H e I: OVX tratadas com veículo e submetidas ao jejum; J, L e M: OVX tratadas com estrógeno submetidas ao jejum; N, O e P: OVX tratadas com veículo e realimentadas; Q, R e S: OVX tratadas com estrógeno e realimentadas. C, F, I, M, P e S são superposição das duas imagens à esquerda, sendo que a dupla marcação (setas brancas) está presente apenas em P e S. Fluorescência verde corresponde a expressão de OT e a vermelha a expressão de FOS. (aumento de 20x).

Na figura 5 encontram -se os valores de porcentagem de neurônios ativados na porção magnocelular anterior (MA) do PVN. Os animais OVX com alimentação *ad libitum*, tratados com veículo ou estrógeno ($0,0 \pm 0,0$ %), assim como aqueles OVX em jejum tratados com veículo ($0,0 \pm 0,0$ %) ou estrógeno ($0,57 \pm 0,38$ %) não expressaram a proteína FOS ou não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos outros grupos. Já os animais OVX submetidos ao jejum e tratados com veículo ($43,25 \pm 6,88$ %) expressaram dupla marcação, com diferença significativa ($p < 0,001$) em relação aos tratados com veículo com alimentação *ad libitum* ou submetidos ao jejum, e também em relação aos animais OVX realimentados e tratados com estrógeno ($12,0 \pm 5,36$ %).

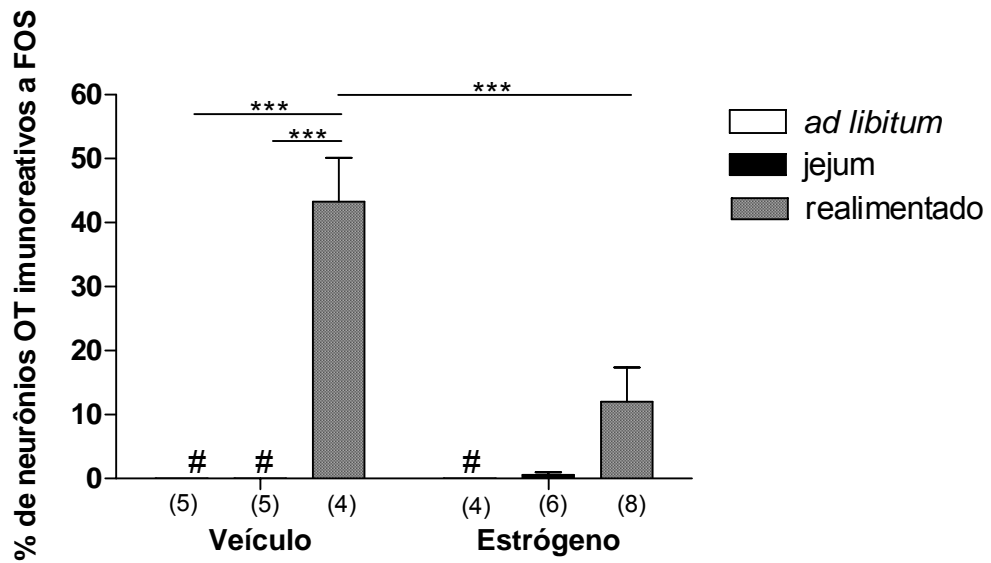


Figura 5: Porcentagem de neurônios OT imunoativos a FOS na porção MA do PVN. Os valores estão expressos como médias \pm EPM. *** $p < 0,001$. # ausência de dupla marcação.

A figura 6 mostra secções coronais da porção magnocelular medial (MM) do PVN de ratas OVX tratadas com estrógeno ou veículo com alimentação *ad libitum*, submetidos ao jejum (48 horas) ou realimentada, com processamento de imunofluorescência para OT e FOS.

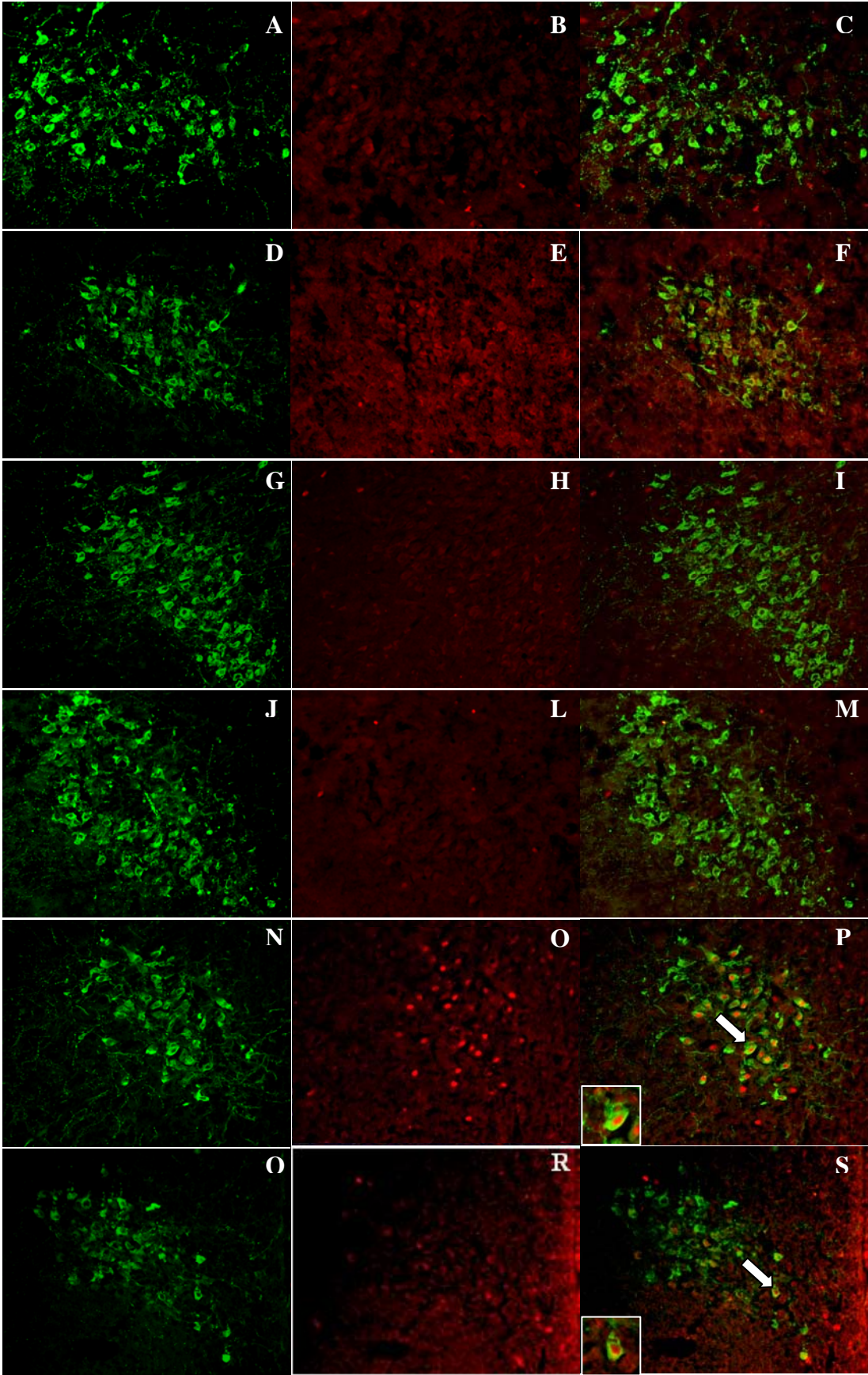


Figura 6: Fotomicrografias de secções coronais (14 µm) mostrando I κ R– OT/FOS do núcleo magnocelular medial (MM) do PVN. A, B e C: OVX tratadas com veículo e com alimentação *ad libitum*; D, E e F: OVX tratadas com estrógeno e com alimentação *ad libitum*; G, H e I: OVX tratadas com veículo submetidos ao jejum; J, L e M: OVX tratadas com estrógeno submetidas ao jejum; N, O e P: OVX tratadas com veículo e realimentadas; Q, R e S: OVX tratadas com estrógeno realimentadas. As fotos C, F, I, M, P e S são superposição das duas imagens, sendo que a dupla marcação (setas brancas) está presente apenas em P e S. Fluorescência verde expressão de OT, e a fluorescência vermelha é a expressão de FOS (aumento de 20x).

A figura 7 mostra os valores de porcentagem de neurônios ativados na porção magnocelular medial (MM) do PVN. Os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com veículo ou estrógeno tiveram aumento na dupla marcação. Houve aumento significativo do número de duplas marcações nos animais realimentados tratados com veículo ($45,67 \pm 9,13$ %) quando comparados com os animais com alimentação *ad libitum* ($0,39 \pm 1,26$ %) e os animais em jejum ($0,00 \pm 0,00$ %) do mesmo tratamento e também em relação aos animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com estrógeno ($3,00 \pm 1,89$ %; $p < 0,001$).

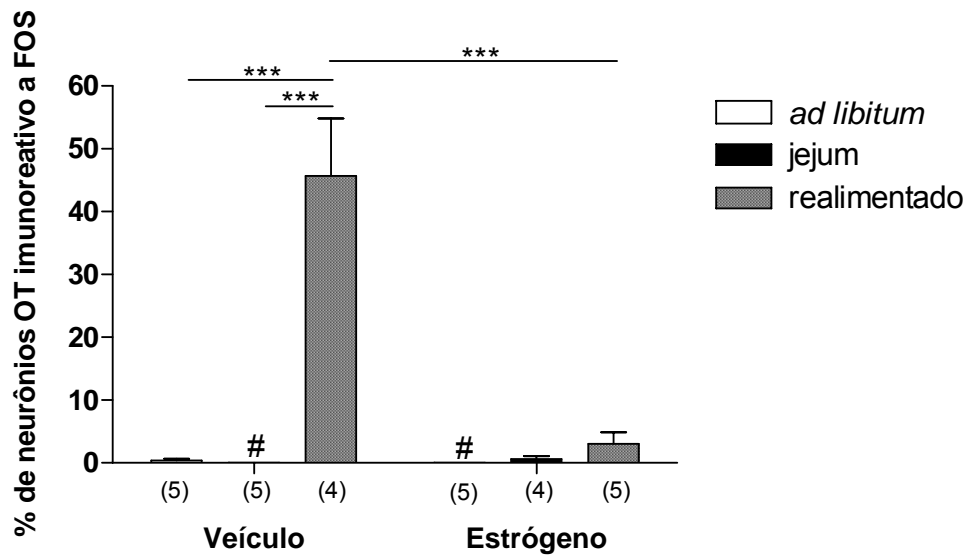


Figura 7: Porcentagem de neurônios OT imunorreativos a FOS na porção MM do PVN. Os valores estão expressos como médias \pm EPM. *** $p < 0,001$. # ausência de dupla marcação.

A figura 8 mostra secções coronais do SON de ratas OVX tratadas com estrógeno ou veículo com alimentação *ad libitum*, submetidos ao jejum (48 horas) ou submetidos ao jejum e realimentadas, com processamento de imunofluorescência para OT e FOS.

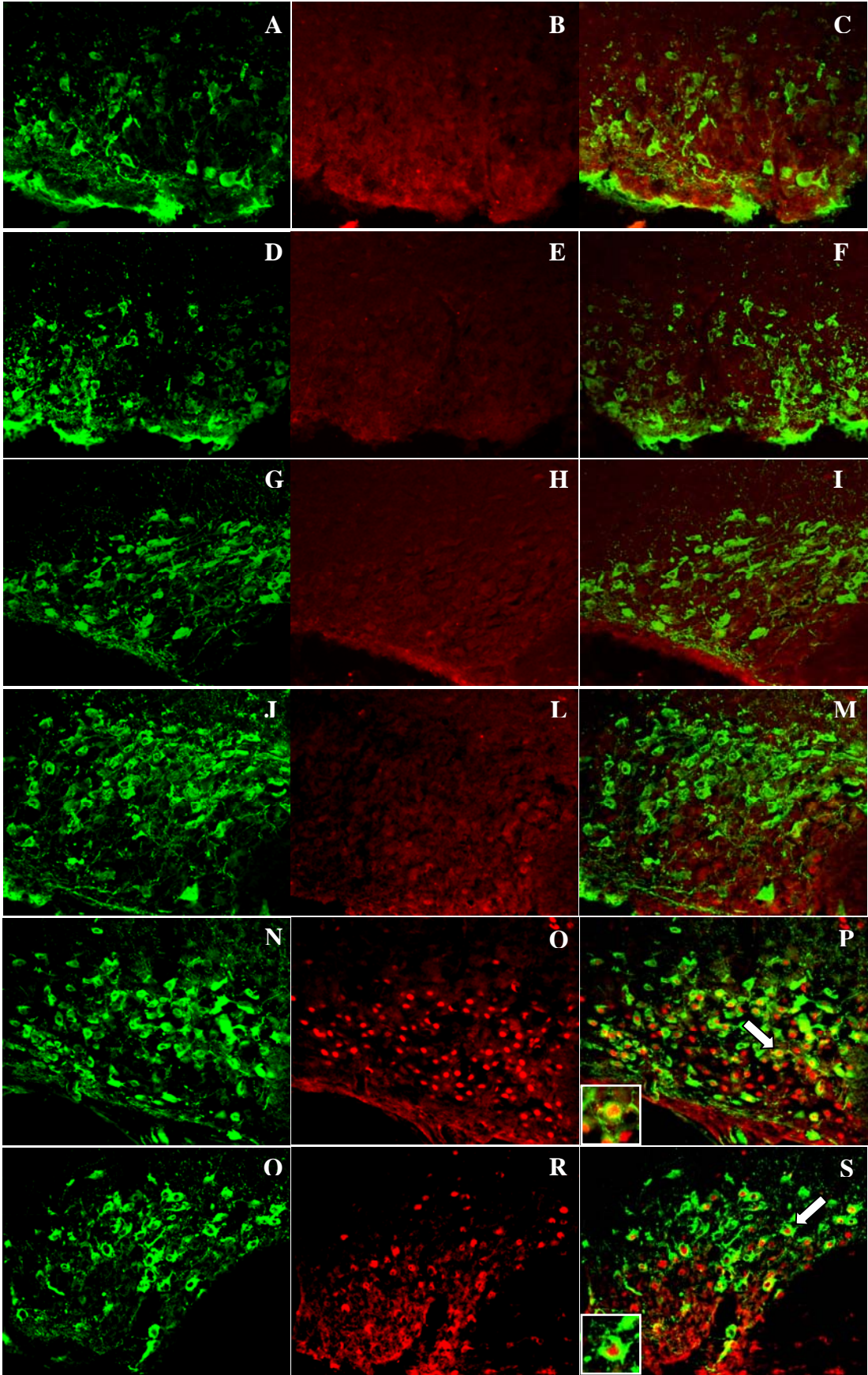


Figura 8: Fotomicrografias de secções coronais (14 μm) mostrando IR–OT/FOS do núcleo magnocelular anterior (MA) do PVN. A, B e C: OVX tratadas com veículo e com alimentação *ad libitum*; D, E e F: OVX tratadas com estrógeno e com alimentação *ad libitum*; G, H e I: OVX tratadas com veículo submetidas ao jejum; J, L e M: OVX tratadas com estrógeno submetidas ao jejum; N, O e P: OVX tratadas com veículo e realimentadas; Q, R e S: OVX tratadas com estrógeno realimentadas. C, F, I, M, P e S são superposição das duas imagens compostas, sendo que a dupla marcação (setas brancas) está presente apenas em P e S. Fluorescência verde expressão de OT, fluorescência vermelha é expressão de FOS (aumento de 20x).

A figura 9 mostra os valores de porcentagem de neurônios ativados no SON. Os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados, tratados com veículo ou estrógeno tiveram aumento nas duplas marcações. Os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados, tratados com veículo ($52,60 \pm 7,76$ %) apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,001$) do número de duplas marcações em relação aos animais OVX com alimentação *ad libitum* ($0,90 \pm 0,90$ %) ou submetidos ao jejum ($0,24 \pm 0,24$ %) do mesmo tratamento e também em relação aos animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com estrógeno ($24,63 \pm 6,23$ %). Houve também diferença significativa entre os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados, tratados com estrógeno ($24,63 \pm 6,23$ %) e os animais OVX com alimentação *ad libitum* ou submetidos ao jejum do mesmo tratamento.

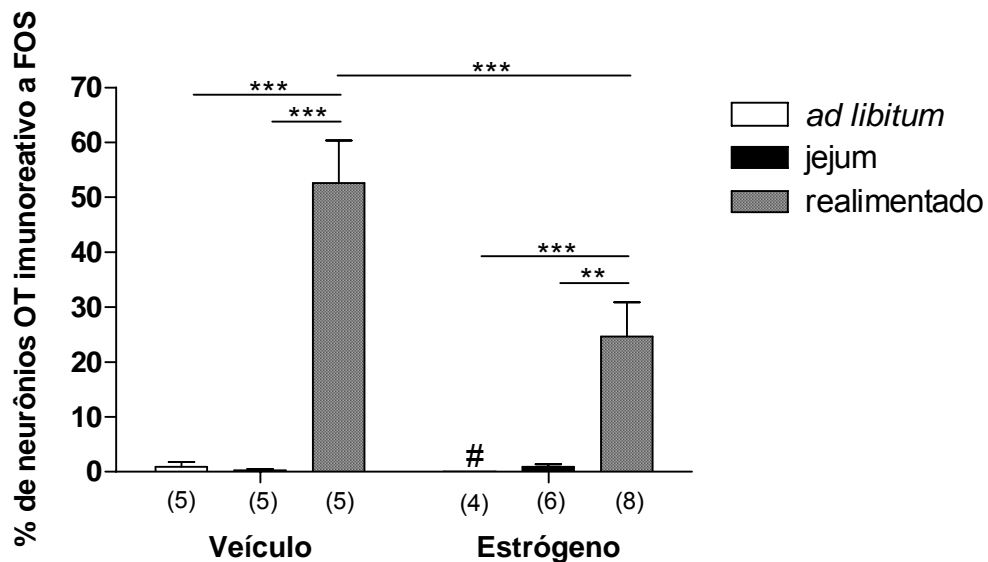


Figura 9: Porcentagem de neurônios OT imunorreativos a FOS no núcleo supraóptico. Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$. # ausência de dupla marcação.

Na figura 10 temos fotomicrografias obtidas de microscópio confocal de secções coronais de 14 μ m da porção magnocelular anterior do PVN de rata OVX realimentada tratada com veículo.

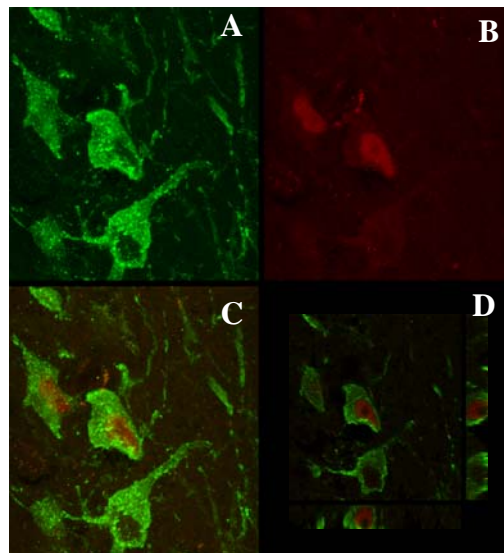


Figura 10: Micrografias obtidas de microscópio confocal de secções coronais de 14 μ m da porção magnocelular anterior do PVN de rata OVX realimentada tratada com veículo. A: imunofluorescência para OT; B: imunofluorescência para FOS; C: sobreposição das imagens A e B; D: fotomicrografia de microscópio confocal.

4.2.3. Expressão da proteína FOS

Na figura 11 encontra-se expresso o número de neurônios FOS-IR na porção magnocelular anterior (MA) do PVN, indicando aumento na ativação da proteína FOS nos animais OVX submetidos ao jejum e realimentados em ambos tratamentos veículo e estrógeno. Pode-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados, tratados com veículo ($28,5 \pm 2,38$) e tratados com estrógeno ($10,63 \pm 3,71$). Houve também diferença significativa ($0,40 \pm 0,40$) entre ratas OVX submetidas ao jejum e realimentados ($25,50 \pm 2,38$), tratados com veículo. Não foi observada essa diferença nos animais tratados com estrógeno.

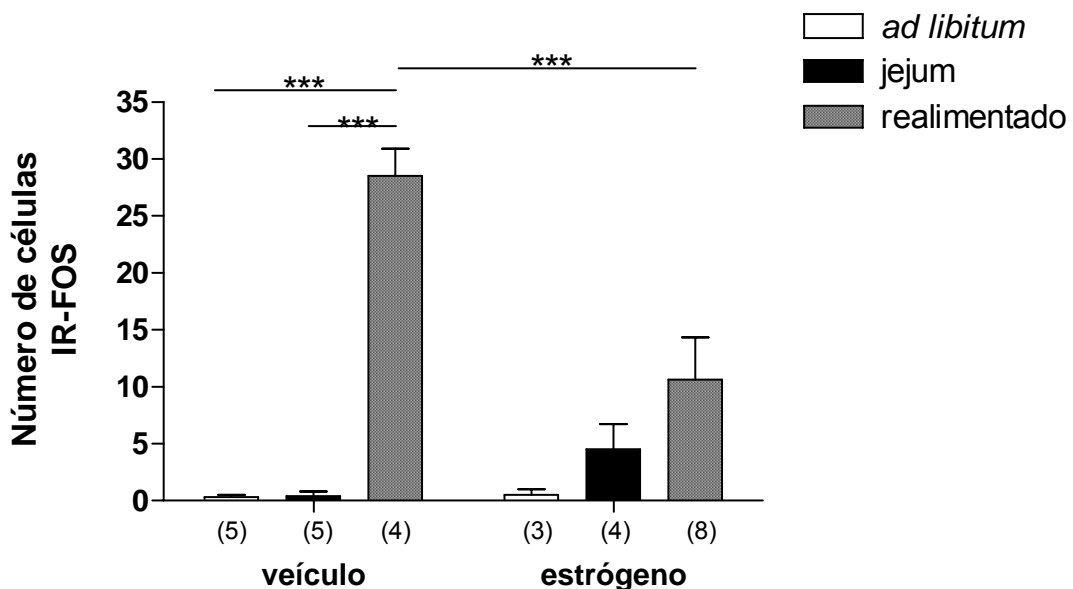


Figura 11: Número de células marcadas com FOS na porção magnocelular anterior do PVN. Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$.

A figura 12 representa o número de neurônios IR-FOS na porção magnocelular medial do PVN. Os dados mostram que tanto os animais OVX tratados com veículo quanto os tratados com estrógeno tiveram expressão de FOS, mas esta foi significativamente maior nos animais tratados com veículo ($55,67 \pm 1,42$) que nos animais tratados com estrógeno ($12 \pm 6,34$). Também observou-se uma diferença entre os animais OVX submetidos ao jejum ($0,80 \pm 0,58$) e realimentados ($55,67 \pm 1,42$) tratados com veículo. Não foi observada essa diferença nos animais tratados com estrógeno.

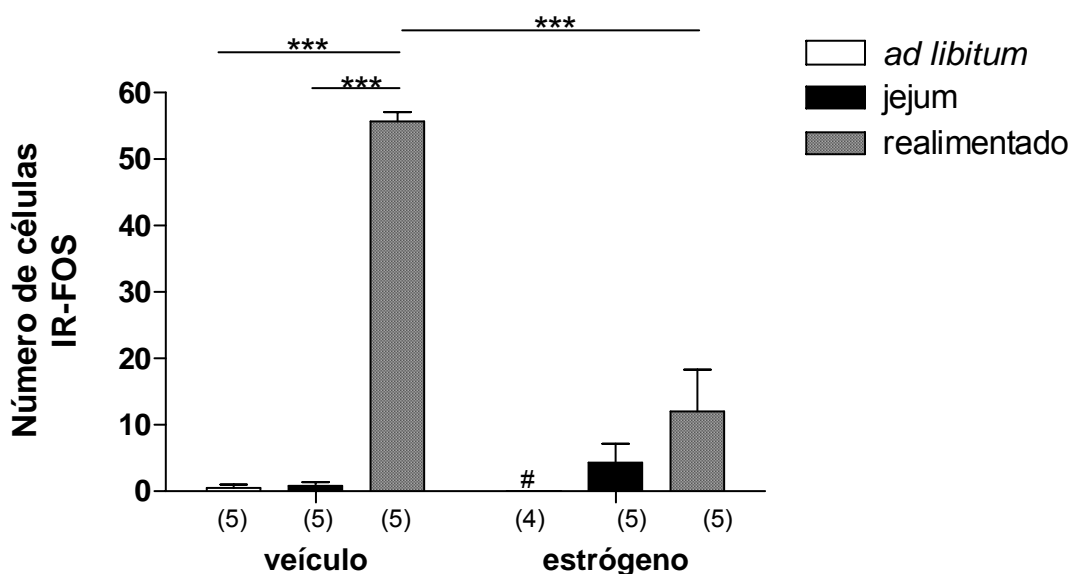


Figura 12: Número de células marcadas com FOS na porção magnocelular medial do PVN. Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$. # ausência de marcação.

A figura 13 mostra o número de neurônios IR-FOS no núcleo supraóptico (SON) do hipotálamo. Os dados revelam que os animais OVX submetidos ao jejum e tratados com veículo realimentados ($80,86 \pm 8,65$) tiveram expressão de FOS

significativamente maior ($p < 0,001$) que a dos animais OVX com alimentação *ad libitum* ($0,10 \pm 0,10$) e dos animais OVX submetidos ao jejum ($0,0 \pm 0,0$) do mesmo tratamento, bem como a dos animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com estrógeno ($47,31 \pm 6,66$). Houve também, diferença entre os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com estrógeno e os animais OVX com alimentação *ad libitum* ($0,0 \pm 0,0$) e os animais OVX submetidos ao jejum ($4,40 \pm 1,28$) do mesmo tratamento.

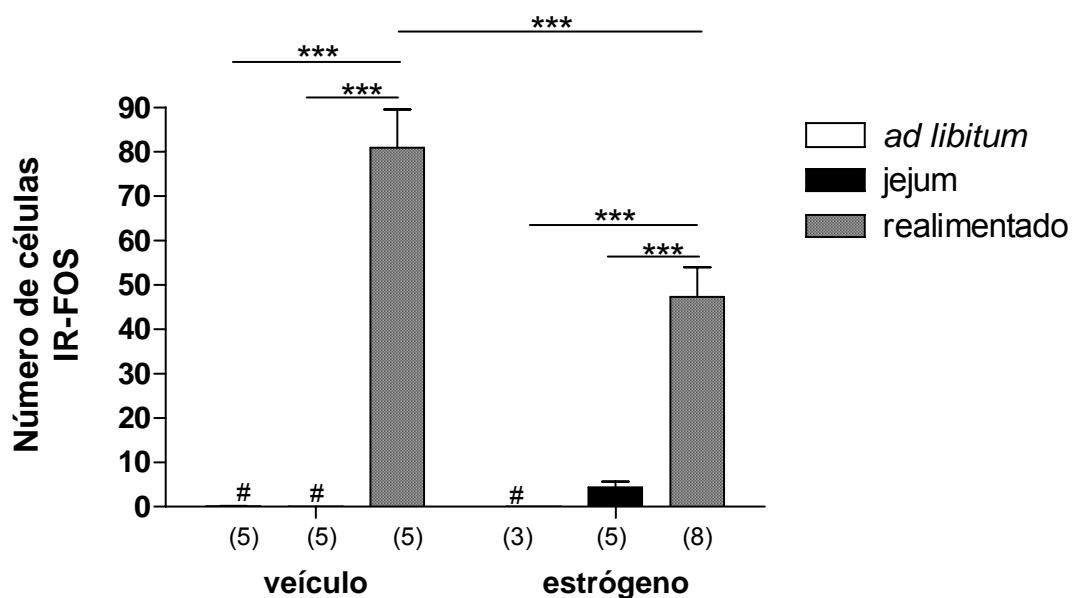


Figura 13: Número de células marcadas com FOS no SON. Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$. # ausência de marcação.

Na Tabela 1 está representado o percentual de células IR-FOS-OT no PVN e SON dos animais OVX realimentados tratados com veículo ou estrógeno.

Tabela 1: Valores percentuais de neurônios duplamente marcados em relação ao número total de neurônios IR-FOS nas porções magnocelular anterior (MA), magnocelular medial (MM) e núcleo supraóptico (SON) do hipotálamo de animais OVX submetidos ao jejum e realimentados.

	Veículo (%)	Estrógeno (%)
MA	63	29
MM	59	21
SON	47	28

4.2.4. Expressão da proteína FOS e marcação para OT (dupla marcação)

Na figura 14 encontra-se a porcentagem de neurônios que expressaram FOS e OT na porção magnocelular anterior (MA) do PVN. Tanto os animais OVX com alimentação *ad libitum* ($0,0 \pm 0,0$) como os animais OVX submetidos ao jejum ($0,0 \pm 0,0$) tratados com veículo não expressaram a proteína FOS. O grupo OVX submetido ao jejum e realimentado, tratado com veículo ($63,0 \pm 9,42$) expressou dupla marcação (FOS/OT), com diferença significativa em relação aos grupos OVX com alimentação *ad libitum* ($0,0 \pm 0,0$) e OVX submetido ao jejum ($0,0 \pm 0,0$) do mesmo tratamento e também em relação ao grupo OVX submetido ao jejum e realimentado tratado com estrógeno ($28,7 \pm 8,08$). Nos animais tratados com estrógeno, podemos observar diferença significativa quando comparamos o grupo OVX submetidos ao jejum e realimentado com o grupo OVX com alimentação *ad libitum* ($0,0 \pm 0,0$; $p < 0,01$) e o grupo OVX submetido ao jejum ($0,60 \pm 0,60$; $p < 0,05$).

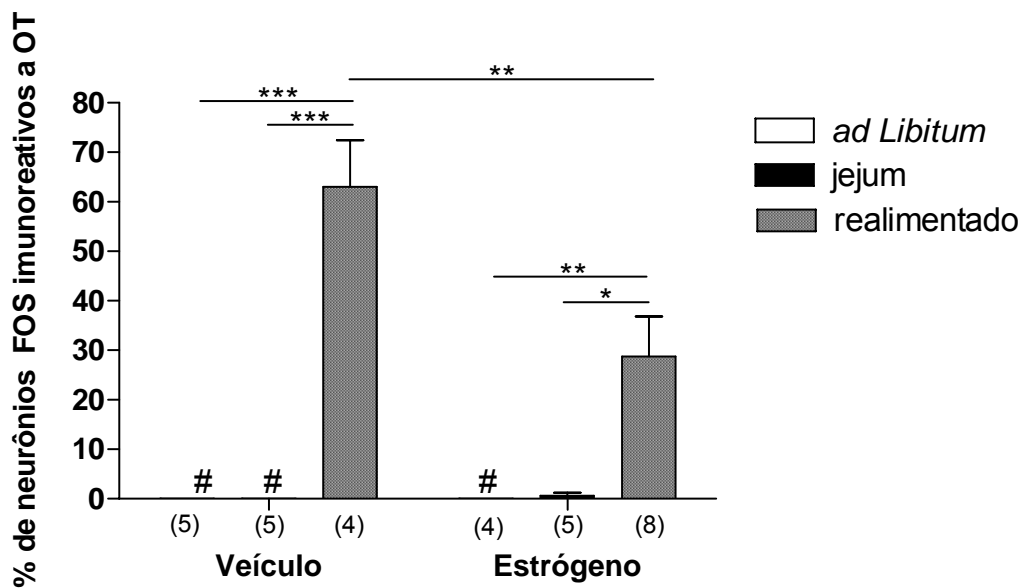


Figura 14: Porcentagem de neurônios OT imunorreativos à proteína FOS na porção magnocelular anterior do PVN (MA). Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$. # ausência de dupla marcação.

A figura 15 mostra a porcentagem de neurônios que expressaram FOS e OT na porção magnocelular medial (MM) do PVN. Pode-se observar que os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados, tratados com veículo tiveram aumento significativo ($p < 0,001$) na dupla marcação quando comparado com os animais OVX em alimentação *ad libitum* ($4,00 \pm 4,00$ %) ou submetidos ao jejum ($0,0 \pm 0,0$ %) do mesmo grupo. Houve também diferença significativa ($p < 0,001$) entre os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com veículo ($58,67 \pm 8,41$ %) e tratados com estrógeno ($21,40 \pm 8,97$ %). Os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados, tratados com estrógeno também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos animais OVX com alimentação *ad libitum* do mesmo tratamento.

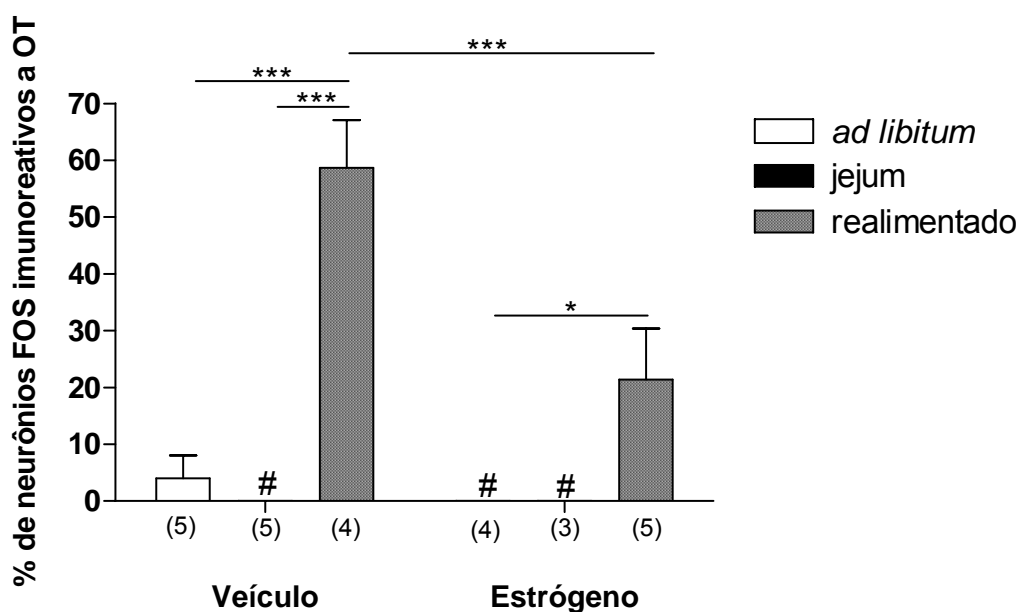


Figura 15: Porcentagem de neurônios OT imunorreativos à proteína FOS na porção magnocelular medial do PVN (MM). Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$. # ausência de dupla marcação.

No núcleo supraóptico (SON) do hipotálamo, os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados ($47,2 \pm 7,10$ %) tratados com veículo tiveram aumento significativo ($p < 0,001$) na dupla marcação de FOS e OT quando comparados com os grupos OVX com alimentação *ad libitum* ($0,0 \pm 0,0$ %) ou submetidos ao jejum ($0,0 \pm 0,0$ %) do mesmo tratamento (Figura 16). Houve também diferença significativa ($p < 0,01$) entre os animais OVX submetidos ao jejum e realimentados tratados com veículo e tratados com estrógeno ($27,5 \pm 5,30$ %). Entre os animais OVX tratados com estrógeno também houve diferença significativa entre os animais submetidos ao jejum e realimentados e os com alimentação *ad libitum* ($0,0 \pm 0,0$ %; $p < 0,001$) ou submetidos ao jejum ($5,16 \pm 3,29$ %; $p < 0,01$).

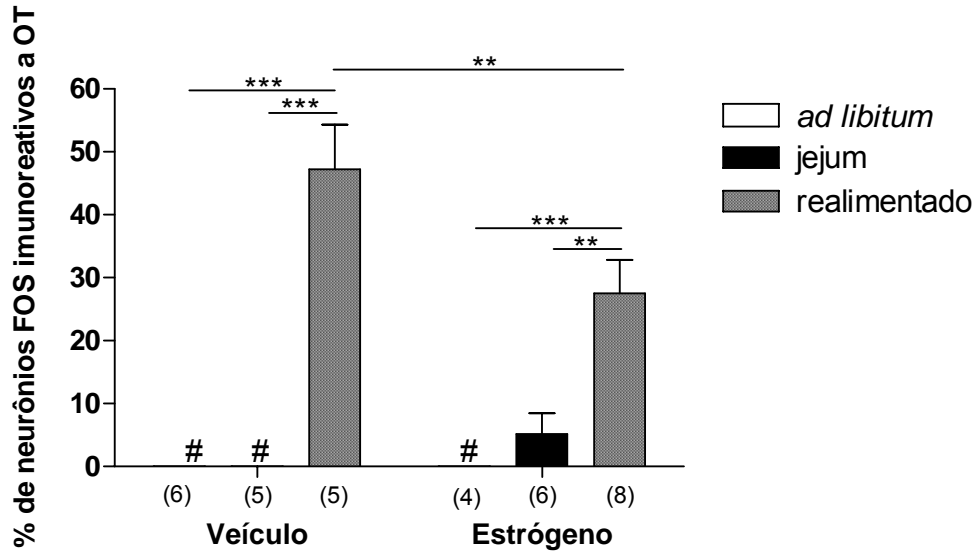


Figura 16: Porcentagem de neurônios OT imunorreativos a FOS no núcleo supraóptico. Os valores estão expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$. # ausência de dupla marcação.

4.3. Experimento III

4.3.1 Dosagem hormonal

Analisando a figura 17 podemos observar que não houve diferença significativa na concentração plasmática de OT dos animais OVX que tiveram alimentação *ad libitum* tratados com veículo ($22,72 \pm 3,06$ pg/ml) e os animais tratados com estrógeno ($20,19 \pm 4,32$ pg/ml). Também não foi observada diferença significativa entre os animais OVX que permaneceram em jejum por 48 horas tratados com veículo ($16,50 \pm 4,67$ pg/ml) e os animais OVX tratados com estrógeno ($12,50 \pm 2,21$). No entanto, o estímulo osmótico causado pela realimentação promoveu aumento significativo ($p < 0,001$) da concentração plasmática de OT nos animais OVX tratados com veículo ($50,72 \pm 9,05$ pg/ml) quando comparados com os animais OVX tratados com estrógeno ($21,61 \pm 2,85$ pg/ml).

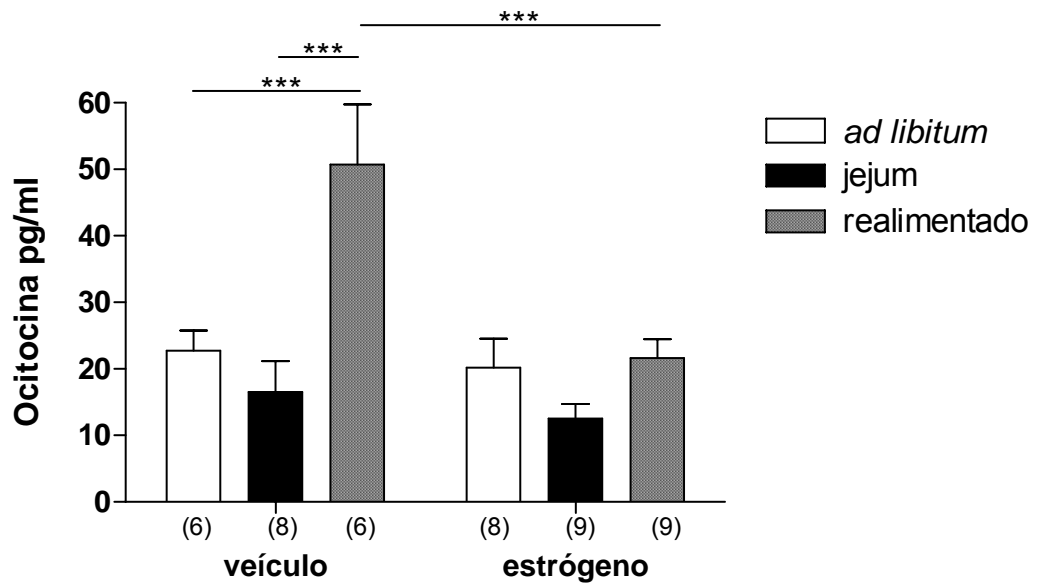


Figura 17: Concentrações plasmáticas de ocitocina em ratas OVX tratadas com veículo ou estrógeno com alimentação *ad libitum*, ou submetidos ao jejum por 48 horas e realimentadas ou não. Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

O PVN é um local de integração para elaborar várias respostas comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas à diferentes estímulos (Swanson e Sawchenko, 1983). Essas respostas fisiológicas são mediadas por núcleos distintos organizados intrinsecamente. Neste trabalho, analisando as fotomicrografias das porções magnocelulares anterior e medial do PVN bem como o SON dos animais OVX que permaneceram em jejum por 48 horas, não foi observada a expressão de FOS nos neurônios OT magnocelulares desses núcleos em nenhum dos tratamentos (veículo ou estrógeno). Dessa forma, em nosso modelo parece que os neurônios OT magnocelulares desses núcleos não participam das respostas ao jejum por 48 horas.

Está bem estabelecido na literatura que os neurônios magnocelulares dos núcleos PVN e SON produtores de OT projetam-se para a neuro-hipófise, de onde o hormônio é liberado para exercer ações na função reprodutiva (Russell e Leng, 1998) e na manutenção da homeostase hidro-eletrolítica, sendo também regulado por mudanças na osmolalidade plasmática (Balment e cols., 1980). Não foi observada diferença significativa nas concentrações plasmáticas de OT dos animais OVX em jejum por 48 horas, quando comparados com os animais *ad libitum* dos dois tratamentos. Há estudos mostrando que não há alteração do conteúdo de OT no PVN e SON de ratos que foram submetidos ao jejum por 48 horas (Burlet e cols., 1992). Assim, como mostram nossos resultados, a concentração plasmática de OT não é susceptível aos efeitos da privação de alimentos nesse modelo.

Para avaliar o efeito osmótico da realimentação na secreção de OT, foi realizada a dosagem da osmolalidade plasmática e os resultados mostraram aumento significativo na osmolalidade plasmática dos animais OVX realimentados quando comparados com os animais OVX, com alimentação *ad libitum* ou

submetidos ao jejum por 48 horas. Como já descrito na literatura, a realimentação pode aumentar a osmolalidade plasmática (Burlet e cols., 1992), no entanto não houve diferença entre os animais OVX tratados com veículo e os animais OVX tratados com estrógeno. Estes dados estão de acordo com estudos prévios de nosso laboratório, em que o estímulo osmótico por injeção intraperitoneal de salina hipertônica aumentou a osmolalidade plasmática, não havendo diferença entre animais tratados com veículo ou estrógeno (Caligioni e Franci, 2002). Nossos resultados também demonstraram que um aumento de aproximadamente de 4% na osmolalidade plasmática induzido pela realimentação, é o suficiente para ativar a resposta de neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON.

A implicação dos órgãos circunventriculares como o SFO no monitoramento da elevação da osmolalidade plasmática após desafio hiperosmótico ou após a alimentação tem sido sugerida (Starbuck e Fitts, 2002). A hipertonidade do líquido extracelular ativa o SFO e a região AV3V, que, por sua vez estimulam neurônios magnocelulares do PVN e SON causando liberação de OT pela neuro-hipófise (Cunningham e Sawchenko, 1991).

Neste estudo, verificamos a expressão da proteína FOS em neurônios magnocelulares ocitocinérgicos do PVN e SON em animais OVX submetidos à realimentação. A expressão de FOS tem sido utilizada de forma confiável para avaliar a atividade no cérebro em resposta à alimentação (Naimi e cols., 1997; Timofeeva e cols., 2002) e os neurônios OT e AVP desses núcleos são sensíveis a mudanças da osmolalidade plasmática e expressam FOS com o aumento da osmolalidade (Somponpun e Sladek, 2003).

Nosso estudo verificou a ativação de neurônios OT da porção magnocelular anterior e medial do PVN e do SON dos animais OVX, realimentados por duas horas

após jejum de 48 horas, nos dois tratamentos (veículo e estrógeno). Interessantemente, os animais tratados com estrógeno apresentaram uma menor expressão de proteína FOS em neurônios OT no PVN e SON.

A ação do estrógeno na regulação da secreção de ocitocina é complexa e ainda pouco conhecida. Sabe-se que concentrações fisiológicas de estrógeno estimulam a liberação de OT por dendritos de neurônios magnocelulares do SON (Wang, Ward e Morris, 1995), e estudos em nosso laboratório mostraram que a secreção de OT varia durante o ciclo estral, com aumento no proestro e na manhã do estro (Caligioni e Franci, 2002). Apesar de vários estudos mostrarem que o estrógeno pode regular muitos aspectos das funções de neurônios OT como, expressão de seu RNAm (Shughrue e cols., 2002), a síntese do peptídeo (Levin e Sawchenko, 1993), a atividade elétrica (Negoro e cols., 1973) e liberação de OT (Skowsky e cols., 1979), o fato de que o estrógeno possa regular diretamente o gene de transcrição de OT é altamente controverso.

Há muitas evidências demonstrando que os esteróides gonadais podem regular neurônios ocitocinérgicos por meio de seus receptores. Estudos prévios sugerem que o estrógeno regule diretamente a expressão gênica de OT no PVN e SON via ER- β (Simonian e Herbison, 1997; Suzuki e Handa, 2005; Shughrue e cols., 1996; Alves e cols., 1998; Hrabovszky e cols., 1998; Laflame e cols., 1998; Somponpun e Sladek, 2003), aumentando assim o conteúdo de RNAm de OT em neurônios do PVN (Amico e cols., 1995), e do SON e também a concentração plasmática de ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (Hrabovszky e cols., 1998). Além da ação genômica, estudos recentes têm mostrado ação rápida e não-genômica do estrógeno na regulação neuronal. A administração de estrógeno em células hipocâmpais e hipotalâmicas promove alterações rápidas na excitabilidade

das membranas (Wong e Moss, 1991; Mermelstein e cols., 1996; Qiu e cols., 2003). Esses efeitos não-genômicos ocorrem em segundos ou minutos e há evidências de serem mediados por receptores de estrógeno localizados na membrana (Kelly e Wagner, 1999). Assim, o estrógeno poderia regular neurônios ocitocinérgicos por ação genômica e ação não-genômica.

A presença de ER- β em neurônios OT está bem estabelecida na literatura (Simonian e Herbison, 1997; Suzuki e Handa, 2005; Shughrue e cols., 1996; Alves e cols., 1998; Hrabovszky e cols., 1998; Laflame e cols., 1998; Somponpun e Sladek, 2003), mas há dados conflitantes em relação ao SON. Um estudo com imunofluorescência em nosso laboratório, demonstrou que cerca de 60% de neurônios do SON são imunorreativos ao ER- β (Caligioni, 2007), bem como outros pesquisadores demonstraram a presença da proteína e RNAm para ER- β no SON (Hrabovszky e cols., 2004; Laflame e cols., 1998).

Assim, nossa hipótese era de que o tratamento com estrógeno poderia modular a ativação dos neurônios ocitocinérgicos, em resposta ao aumento da osmolalidade induzida pela realimentação, alterando assim o padrão de resposta. De fato, em nosso estudo, o tratamento com estrógeno em ratas ovariectomizadas reduziu a ativação dos neurônios ocitocinérgicos quando comparadas com os animais tratados com veículo. Desta forma, o estrógeno inibe a ativação dos neurônios ocitocinérgicos, frente ao estímulo osmótico neste modelo experimental. Shughrue e cols., (2002) demonstraram que, em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno, a expressão de RNAm para OT diminuiu no PVN após 6 horas da injeção subcutânea de estrógeno.

Somponpun e Sladek (2003) verificaram que em machos a expressão de ER- β é correlacionada negativamente com mudanças da osmolalidade plasmática, mas

essa regulação só ocorre em neurônios magnocelulares do PVN e SON que foram ativados em resposta ao estímulo osmótico. Apesar da expressão de RNAm para ER- β observada neste estudo ser correlacionada inversamente com a osmolalidade plasmática, é possível que outro mecanismo controle a expressão de ER- β . Um possível candidato é o próprio estrógeno, mas nesse estudo eles não correlacionaram a regulação da expressão de ER- β com a concentração de estrógeno, embora outros estudos tenham demonstrado que o estrógeno pode diminuir a expressão de RNAm para ER- β no PVN de ratos (Patisaul e cols., 1999, 2001). Há relatos de que em ratas castradas o tratamento com estrógeno promove uma diminuição na expressão de ER- β no PVN (Suzuki e Handa, 2004). Por outro lado, há estudos que não verificaram variação na expressão de ER- β dependente da concentração de esteróides gonadais circulantes (Greco e cols., 2001) ou da fase do ciclo estral (Caligioni, 2007).

A regulação do ER- β requer o monitoramento dos órgãos circunventriculares. Tanto o OVLT como o SFO contêm neurônios osmorreceptivos e enviam projeções diretas para o SON e PVN bem como projeções indiretas via MnPO. A lesão da região AV3V, destruindo assim o OVLT, porção ventral do MnPO e fibras de passagem do SFO, interrompe a liberação de AVP e OT pelos neurônios magnocelulares do PVN e SON em resposta ao aumento da osmolalidade e também interrompe a inibição da expressão de ER- β (Somponpun e cols., 2003). Isto suporta a hipótese que aferências osmoticamente sensíveis do AV3V são responsáveis pela expressão de ER- β durante a desidratação crônica e demonstram que as propriedades osmossensíveis intrínsecas dos neurônios magnocelulares não são suficientes para inibir a expressão de ER- β (Somponpun e cols., 2003).

A proteína de ER- β é localizada primeiramente nos núcleos dos neurônios magnocelulares. Assim, para exercer um papel inibitório, é necessário alterar a expressão gênica de OT e AVP. Os receptores de estrógeno (ER) alteram a expressão do gene por interação com elementos responsáveis ao estrógeno (ERE), regulando assim, diretamente a transcrição de genes sensíveis ao estrógeno. Tanto os genes promotores de OT como os de AVP contém elementos com potencial para regulação de estrógeno. As seqüências regulatórias do gene de OT incluem um elemento de resposta semelhante ao ERE (Mohr e Schmitz, 1991; Shapiro e cols., 2000).

Apesar de os genes de OT e AVP interagindo com os ERE serem os primeiros candidatos para a regulação da secreção dos hormônios, outros genes também podem ser responsáveis pelo efeito inibitório do ER- β na secreção do peptídeo. Por exemplo, a liberação de OT e AVP em resposta ao estímulo osmótico é dependente de transmissão glutamatérgica de neurônios do OVLT (Russell e cols., 1989; Hanamura e cols., 1992). Experimentos prévios, usando explantes do sistema hipotálamo-neurohipófise (HNS) demonstraram que o NMDA, agonista para o receptor NMDA, estimula a secreção de AVP e OT e o antagonista inibe significativamente sua liberação pelo estímulo osmótico (Swenson e cols., 1998; Somponpun e Sladek, 2002). A subunidade do receptor NMDA (NR) é regulada nos neurônios magnocelulares por estímulo osmótico. Os NRs funcionais consistem de subunidades chamadas de NR1 e NR2 (Al-Ghoul e cols., 1997). Estimulação osmótica aumenta a expressão de NR1 e altera a razão da expressão da subunidade NR2 (Decavel e Curras, 1997). A região promotora da subunidade NR1 e NR2 contém um local chamado de SP1 (Bai e Kusiak, 1993). O estrógeno age como um repressor da transcrição via complexo ER- β /SP1. Conseqüentemente, a

inibição da síntese da subunidade do NR pelo complexo ER- β /SP1 pode ser responsável pelo efeito inibitório do estrógeno na liberação de AVP e OT estimulada osmoticamente ou pelo NMDA.

A colocalização de ER- β predominante em neurônios AVP, sugere que a influência do estrógeno agindo via ER- β poderia ser mais pronunciada em neurônios AVP do que em neurônios OT. Entretanto, a genisteína, um fitoestrógeno com grande afinidade pelo ER- β previne a liberação de ambos OT e AVP induzido pelo NMDA em explantes de HNS. Também, a atenuação da expressão de ER- β em neurônios estimulados hiperosmoticamente ocorre em neurônios AVP, bem como neurônios OT. Assim, o impacto da inibição mediada pelo ER- β pode ocorrer em ambos os neurônios (Somponpun e Sladek, 2003).

Desta forma, de acordo com a literatura previamente citada nesse trabalho (Somponpun e cols., 2003; Swenson e cols., 1998) podemos inferir que nos animais OVX realimentados tratados com estrógeno, apesar de uma provável *downregulation* de ER- β devido à realimentação (estímulo osmótico), a ação inibitória do estrógeno foi capaz de reduzir a atividade de neurônios OT. Nos animais OVX tratados com veiculo, além da *downregulation* nos receptores ER- β , na ausência do estrógeno não ocorreu inibição de atividade de neurônios OT.

Adicionalmente, não podemos descartar a possível regulação indireta de estrógeno nos neurônios OT por via ER α , o qual é expresso em neurônios localizados no OVLT e na MPOA, de onde partem projeções par ao SON (Voisin, Simonian e Herbison, 1997).

Neste trabalho, aproximadamente a metade dos neurônios que expressaram a proteína FOS no PVN e SON foram imunorreativos a OT. Desta forma, outros neurônios do PVN e SON, não ocitocinérgicos, são ativados pela realimentação.

Entre estes, poderiam estar neurônios AVP, que sabidamente também participam da regulação hidro-eletrólítica (Skott, 2004; Timofeeva e cols., 2005). A expressão de FOS pode ocorrer em ambos os neurônios, AVP e OT após ingestão de sacarose hipertônica. O consumo de leite adoçado induz a expressão de heteronuclear RNA(hn) de AVP, mas não de RNA(hn) para OT em neurônios magnocelulares do PVN e SON (Naimi e cols., 1997). Dessa forma, a ativação de neurônios ocitocinérgicos depende da natureza do alimento.

O aumento da osmolalidade plasmática devido ao sódio e à glicose durante a alimentação (Bloom e cols., 1975; Houpt e cols., 1983) pode ser responsável pela ativação dos neurônios AVP e OT. Durante a alimentação, ações da AVP contribuem para a regulação do balanço de água, modificação na pressão sanguínea e o término da alimentação (Pittman e cols., 1982; Palkovits, 1984; Langhans e cols., 1991). No entanto, como a expressão de FOS foi menor nos animais OVX realimentados tratados com estrógeno e parte dos neurônios envolvidos podem ser vasopressinérgicos, o estrógeno poderia através de ER- β inibir também a liberação de AVP (Skowsky e cols., 1979, Skott, 2004). A presença de esteróides gonadais certamente não elimina o controle da liberação de AVP, mas poderia modulá-lo. O efeito inibitório do estrógeno via ER- β poderia modular a resposta.

O efeito inibitório do estrógeno mediado pelo ER- β na liberação de OT pode também ter influenciado a secreção plasmática de OT. Nossos resultados mostraram que os animais OVX realimentados tratados com estrógeno tiveram diminuição da concentração plasmática de OT quando comparados com os animais OVX realimentados tratados com veículo. Essa resposta está de acordo com a ativação neuronal observada nos animais realimentados. Numerosos estudos têm analisado

o efeito dos esteróides gonadais na concentração plasmática de OT, mas esses são inconclusivos, desde que mostram aumento ou diminuição da secreção e às vezes não alteração independentes de diferença de gênero, gonadectomia com ou sem reposição hormonal (Sladek e Somponpun, 2004).

Assim, a ação fisiológica da expressão de ER- β nos neurônios magnocelulares permanece sendo uma questão aberta. Ratos adultos e humanos liberam OT e AVP em resposta ao estímulo osmótico mesmo na presença de estrógeno ou testosterona circulantes. A *downregulation* da expressão de ER- β durante a hiperosmolalidade pode remover a influência inibitória, permitindo assim a liberação de AVP e OT em situações que requerem a secreção máxima. Mudanças na expressão do receptor poderiam alterar a responsividade das células-alvos e determinar a circunstância fisiológica nas quais os esteróides gonadais tornam-se importantes na regulação da função da célula (Somponpun e Sladek, 2003). Em estudos *in vitro*, a resposta ao estímulo osmótico é inibida pelos esteróides gonadais (Swenson e Sladek, 1997). Esta inibição também ocorreu *in vivo* como demonstrado pelos dados do presente estudo. Existem várias vias osmorregulatórias com aferências para o SON e PVN, com informações sobre outros parâmetros fisiológicos como pressão sangüínea e volume, e essas informações contribuem para a regulação da liberação dos hormônios pela neuro-hipófise em resposta aos distúrbios no balanço de eletrólitos e líquidos no organismo.

Assim, como o presente estudo visou pesquisar o efeito do estrógeno nos neurônios OT em resposta ao aumento da osmolalidade devido à realimentação, observamos que ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno apresentaram uma menor ativação dos neurônios OT induzida pela realimentação quando comparadas

com ratas ovariectomizadas tratadas com veículo. Desta forma, o conjunto dos nossos dados demonstram que o estrógeno exerce um efeito inibitório na atividade dos neurônios ocitocinérgicos frente ao aumento da osmolalidade promovida pela alimentação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GHOUL, W.M.; MEEKER, R.B.; GREENWOOD, R.S. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit m RNAs in vasopressin and oxytocin neuroendocrine cells. *Brain Res. Mol. Brain*, 44: 262-272, 1997.

ALVES, S.E.; LOPEZ, V.; McEWEN, B.S.; WEILAND, N.G. Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraóptico nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. 95: 3281-3286, 1998.

AMICO, J.A.; CROWLEY, R.S.; INSEL, T.R.; THOMAS, A.; O'KEEFE, J.A. Effect of gonadal steroids upon hypothalamic oxytocin expression. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 395: 23-25, 1995.

AMICO, J.A.; SEIF, S.M.; ROBINSON, A.G. Elevation of oxytocin and the oxytocin-associated neurophysin in the plasma of normal women during midcycle. *J Clin Endocrinol Metab.*; 53 (6): 1229-1232, 1981.

AMICO, J.A.; THOMAS, A.; HOLLINGSHEAD, D.J. The duration of estradiol and progesterone exposure prior to progesterone withdrawal regulates oxytocin mRNA levels in the paraventricular nucleus of the rat. *Endocr. Res.*, 23: 141-156, 1997.

ANDERSON, W.A.; BRUNI, J.E.; KAUFMANN, A. Afferente connections of rat's supraoptic nucleus. *Brain. Res. Bull.* 24 (2): 191-200, 1990.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; McCANN, S.M. The neuroendocrine control of ANP release. *Mol. Psychiatry*, 2: 359-367, 1997.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; McCANN, S.M.; SAMSON, W.K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. *Endocrinology*. 118: 1726-1729, 1986.

AXELSON, J.F.; VAN LEEUWEN, F.W.; Differential localization of estrogen receptors in various vasopressin synthesizing nuclei of the rat brain. *J. Neuroendocrinol.*, 2: 209-216, 1990.

BAI, G.; KUSIAK, J.W. Cloning and analysis of the flanking sequence of the rat N-methyl-D-aspartate receptor I (NMDARI) gene. *Biochim Biophys Acta.*, 1152: 197-200, 1993.

BALMENT, R.J.; BRIMBLE, M.J.; FORSLING, M.L. Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. *J. Physiol.*, 308: 439-449, 1980.

BLOOM, S.R.; EDWARDS, A.V.; HARDY, R.N.; MALINOWSKA, K.; SILVER, M. Cardiovascular and endocrine responses to feeding in the young calf. *J. Physiol.*, 253: 135-155, 1975.

BOURQUE, C.W. Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurons by hyperosmotic stimuli. *J. Physiol.*, 417: 263-277, 1989.

BOURQUE, C.W.; OLIET, S.H.R. Osmorreceptors in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.*, 59: 601-619, 1997.

BUIJS, R. M.; SWAAB, D.F. Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. *Cell Tissue Res.*, 2004: 355-365, 1997.

BURLET, A.J.; JHANWAR-UNIYAL, M.; CHAPLEUR-CHATEAU, M.; BURLET, C.R.; LEIBOWITZ, S.F. Effect of food deprivation and refeeding on the concentration of vasopressin and oxytocin in discrete hypothalamic sites. *Pharm. Bio. Behavior*, 43: 897-905, 1992.

CALDWELL, J.D.; JIRIKOWSKI, G.F.; GREER, E.R.; STUMPF, W.E.; PEDERSEN C.A. Ovarian steroids and sexual interaction alter oxytocinergic content and distribution in the basal forebrain. *Brain Res.*, 446 (2): 236-244, 1988.

CALIGIONI, C.S. Interação de ocitocina, do estrógeno e do hormônio liberador de gonadotrofinas no ciclo estral e na variação da osmolalidade. Tese apresentada para o departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Págs. 01 a 50, 2007.

CALIGIONI, C.S.; FRANCI, C.R. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. [*Life Sci.*](#), 71(24):2821-2831, 2002.

CHUNG, S.; MCCABE, J.; PFAFF, D. Estrogen influences on oxytocin mRNA expression in preóptica and anterior hypothalamus regions by in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.*, 307: 281-295, 1991.

CINTRA, A.; FUXE, K.; HARFSTRAND, A.; AGNATI, L.F.; MILLER, L.S.; GREENE, J.L. et al. On the cellular localization and distribution of estrogen receptor in the rat tel-diencephalus using monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Neurochem Int.*, 8: 587-595, 1986.

CROCKER, A.D.; HINSULL, S.M. Renal electrolyte excretion during the oestrus cycle in the rat. *J. Endocrinol.*, 55: xlii-xliii, 1972.

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

CROWLEY, R.S.; INSEL, T.R.; O'KEEFE, J.A.; AMICO, J.A. Cytoplasmic oxytocin and vasopressin gene transcripts decline postpartum in the hypothalamus of the lactating rat. *Endocrinol.*, 133: 2704-2710, 1993

CUNNINGHAM, E. T. JR.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci.*, 14: 406-410, 1991.

DALE, H.H. On some physiological actions of ergot. *J. Physiol. (Lond)*, 34: 163-206, 1906.

DECAVEL, C.; CURRAS, M.C. Increased expression of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in immunohistochemically identified magnocellular hypothalamic neurons during dehydration. *Neuroscience*, 78: 191-202, 1997.

DOGTEROM, J.; VAN WIMERSMA GREIDANUS, T.B.; SWAB, D.F. Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology*, 78: 204-209, 1977.

DU VIGNEAUD, V. Oxytocin, the principal oxytocic hormone of the posterior pituitary gland: its isolation, structure, and synthesis. *Experientia, Suppl.*, 2: 9-26, 1955.

DU VIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; TRIPPETT, S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J. Biol. Chem.*, 205: 949-957, 1953.

FORSLING, M.; PEYSNER, K. Pituitary and plasma vasopressin concentrations and fluid balance throughout the oestrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.*, 117: 397-402, 1988.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; KOZLOWSKI, G.P.; McCANN, S.M. Actions of endogenous vasopressin and oxytocin on anterior pituitary hormone secretion. *Neuroendocrinology*, 57: 693-699, 1993.

GRECO, B.; ALLEGRETTO, E.A.; TETEL, M.J.; BLAUSTEIN, J.D.; Coexpression of ER β with ER α and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology*, 142: 5172-5181, 2001.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J.M.; ARGOS, P.; CHAMBON, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058):134-9, 1986.

GREER, E.R.; CALDWELL, J.D.; JOHNSON, M.F.; PRANGE, A.J.; PEDERSEN, C.A. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Sci.*, 38 (25): 2311-2318, 1986.

GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; LAMBERT, C.; MUKADDAM-DAHER, S.; ZINGG, H.H.; MCCANN, S.M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11704-11709, 1997.

HANAMURA, M.; NUNEZ, D.J.; LENG, G.; EMSON, P.C.; KIYAMA, H. C-fos may code for a common transcription factor within the hypothalamic neural circuits involved in osmoregulation. *Brain Res.*, 572: 42-51, 1992.

HATTON, G.I. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurhypophyseal system. *Prog. Neurobiol.*, 34: 437-504, 1990.

HONDA, K.; NEGORO, H.; DYBALL, R.E.; HIGUCHI, T.; TAKANO, S. The osmoreceptor complex in the rat: evidence for interactions between the supraoptic and other diencephalic nuclei. *J. Physiol.*, 431: 225-241, 1990.

HOUPT, k.A.; BALDWIN, B.A.; HOUP, T.R.; HILLS, F. Humoral and cardiovascular responses to feeding in pigs. *Am. J. Physiol.*, 244, R279-R284, 1983.

HRABOVSKY, E.; KALLO, I.; HAJSZAN, T.; SHUGHRUE, P.J.; MERCHENTHALER, I.; LIPOSITS, Z. Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology*, 139: 2600-2604, 1998.

HRABOVSKY, E.; KALLO, I.; STEINHAUSER, A.; MERCHENTHALER, I.; COEN, C.W.; PETERSEN, S.L.; LIPOSITS, Z. Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *J. Comp. Neurol.*, 473: 315-333, 2004.

IVELL, R.; RICHTER, D. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2006-2010, 1984.

JONES, C.W.; PICKERING, B.T. Changes in the hormone content of the rat neurohypophysis induced by substituting 2 per cent saline for drinking water. *J. Endocrinol.*, 43: vi, 1969.

KELLY, M.J.; WAGNER, E.J. Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 10: 369-374, 1999.

KUIPER, G.G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5925-5930, 1996.

KUIPER, G.G.J.M.; SHUGHRUE, P.J.; MERCHENTHALER, I.; GUSTAFSON, J.A. The estrogen β subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.*, 19: 253-286, 1998.

LAFLAME, N.; NAPPI, R.E.; DROLET, G.; LABRIE, C.; RIVEST, S. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J. Neurobiol.*, 36: 357-378, 1998.

LANGHANS, W.; DELPRETE, E.; SCHARRER, E. Mechanisms of vasopressin's anorectic effect. *Physiol. Behav.*, 49: 169-176, 1991.

LECHAN, R.M.; NESTLER, J.L.; JACOBSON, S. The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin. (WGA) from the median eminence. *Brain Res.*, 245: 1-15, 1982.

LENG, G.; BLACKBURN, R.E.; DYBALL, R.E.; RUSSELL, J.A. Role of anterior perithird ventricular structures in the regulation of supraoptic neuronal activity and neuronal activity and neurohypophysial hormone secretion in the rat. *J. Neuroendocrinol.*, 1: 35-46, 1989.

LEVIN, M.C.; SAWCHENKO, P.E. Neuropeptide co-expression in the magnocellular neurosecretory system of the female rat: evidence for differential modulation by estrogen. *Neuroscience*, 54: 1001-1018, 1993.

LUMPKIN, M. D.; SAMSON, W.K.; McCANN, S.M. Arginine vasopressin as a thyrotrophin releasing hormone. *Science*, 235: 1070-1073, 1987.

MASON, W.T. Supraoptic neurons of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature*, 287: 154-157, 1980.

MCCANN, S.M. Neuroregulatory peptides. In. Brain Endocrinology, ed. Marcela Mota, Raven Press, New York, 1991.

McCANN, S.M.; FRANCI, C.R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Hormonal control of water and electrolyte intake and output. *ActaPhysiol. Scand.*, 136 (supl 583): 97-104, 1989.

MCCANN, S.M.; GUTKOWSKA, J.; FRANCI, C.R.; FAVARETTO, A.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Hypothalamic control of water and salt intake and excretion. *Braz J Med Biol Res.*, 27 (4): 865-884, 1994.

MENDELSON, F.A.; QUIRION, R.; SAAVEDRA, J.M.; AGUILERA, G.; CATT, K.J. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1575-1579, 1984.

MERMELSTEIN, PG.; BECKER, J.B.; SURMEIER, D.J. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.*, 16: 595-604, 1996.

MILLER, F.D.; OZIMEK, G.,; MILNER, R.J.; BLOOM, F.E. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (7): 2468-2472, 1989.

MOHR, E.; SCHMITZ, E. Funcional characterization of estrogen and glucocorticoid responsive elements in the rat oxytocin gene. *Brain Res. Mol. Brain. Res.*, 9: 293-298, 1991.

NAIMI, N.; RIVEST, S.; RACOTTA, I.; RICHARD, D. Neuronal activation of the hypothalamus magnocelular system in response to oropharyngeal stimuli in the rat. *J. Neuroendocrinol.*, 9: 329-340, 1997.

NEGORO, H.; VISESSUWAN, S.; HOLLAND, R.C. Unit activity in the paraventricular nucleus of female rats at different stages of the reproductive cycle and after ovariectomy, with or without oestrogen or progesterone treatment. *J Endocrinol.*, 59 (3): 545-558, 1973.

NORDMANN, J.J. Ultrastructural morphometry on the rat neurohypophysis. *J. Anat.*, 123: 213-218, 1977.

OLDFIELD, B.J.; HARDS, D.K.; MCKINLEY, M.J. Neurons in the median preóptica nucleus of the rat with collateral branches to the subfornical organ and nucleus. *Brain Res.*, 586 (1): 86-89, 1992.

OLDFIELD, B.J.; MISELIS, R.P.; MCKINLEY, M.J. Median preóptica nucleus projections to vasopressin containing neurons of the supraoptic nucleus in sheep. A light and microscopic study. *Brain Res.*, 542 (2): 193-220, 1991.

OLSON, B.R.; FREILINO, M.; HOFFMAN, G.E.; STRICKER, E.M.; SVED, A.F.; VERBALIS, J.G. c-Fos expression in rat brain and brainstem nuclei in response to treatments that alter food intake and gastric motility. *Mol. Cell. Neurosci.*, 4: 93- 106, 1993.

OSHEROFF, P.L.; PHILLIPS, H.S. Autoradiographic localization of relaxin binding sites in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6413-6417, 1991.

OSTERLUND, MK.; GUSTAFSSON, J.A.; KELLER, E.; HURD, Y.L. Estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: distinct distribution pattern to ERalpha mRNA. *J. Clin Endocrinol Metab.*, 85: 3840-3866, 2000.

OTT, I.; SCOTT, J.C. The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY*, 8: 48-49, 1911.

PALKOVITS, M. Role of the central nervous system neuropeptides in body fluid homeostasis. *J. Physiol. (Paris)*, 79: 428-431, 1984.

PATCHEV, V.K.; HAYASHI, S.; ORIKASA, C.; ALMEIDA, O.F. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB. J.* 9: 419-423, 1995.

PATISAUL, H.B.; DINDO, M.; WHITTEN, P.L.; YOUNG, L.J. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinology*, 142: 2946-2952, 2001.

PATISAUL, H.B.; WHITTEN, P.L.; YOUNG, L.J. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the rat brain: opposite effects of 17 beta-estradiol and phytoestrogen, coumestrol. *Brain Res. Mol. Res.*, 67: 165-171, 1999.

PITTMAN, Q.J.; LAWRENCE, D.; McLEAN, L. Central effects of arginine vasopressin on blood pressure in rats. *Endocrinology*, 110: 1058-1060, 1982.

PTAFF, D.; KEINER, M. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.*, 151: 121-158, 1973.

QIU, J., BOSCH, M.A.; TOBIAS, S.C.; GRANDY, D.K.; SCANLAN, T.S.; RONNEKLEIV, O.K.; KELLY, M.J. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase. *J. Neurosci.*, 23: 9529-9540, 2003.

RHODES, C.H.; MORRELL, J.I.; PFAFF, D.W. Distribution of estrogen-concentrating neurophysin-containing magnocellular neurons in the rat hypothalamus as demonstrated by a technique combining steroid autoradiography and immunohistology in the same tissue. *Neuroendocrinology*, 33: 18-23, 1981.

RHODES, C.H.; MORRELL, J.I.; PFAFF, D.W. Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: Distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J. Comp. Neurol.*, 198: 45-64, 1981.

RUSSELL, J.A.; BLACKBURN, R.E.; LENG, G. Ablation of the region anterior and ventral to the third ventricle (AV3V region) does not impede parturition in rats. *J. Endocrinol.*, 121: 109-115, 1989.

RUSSELL, J.A.; LENG, G. Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J. Endocrinol.*, 157: 343-359, 1998.

SAMSON, W.K.; LUMPKIN, M.D.; McCANN, S.M. Evidence of a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology*, 119: 554-560, 1986.

SAR, M., PARIKH, I. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J. Steroid Biochem.*, 24: 497-503, 1986.

SARKAR, D.K.; GIBBS, D.M. Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats. *Neuroendocrinology*. 39 (5): 481-483, 1984.

SCHARRER, E.; SCHARRER, B. Secretory cells within the hypothalamus. In: *The Hypothalamus and Central Levels of Autonomic Function*. Baltimore, MD: Williams e Wilkins, p.170-194, 1940.

SHAPIRO, R.A.; XU, C.; DORSA, D.M. Differential transcriptional regulation of rat vasopressin gene expression by estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology*, 141: 4056-4064, 2000.

SHUGHRUE, P.J.; DELLOVADE, T.L.; MERCHENTHALER, I. Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor- β . *Prog. Brain. Research*, 139: 15-29, 2002.

SHUGHRUE, P.J.; KOMM, B.; MERCHENTHALER, I. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*, 61: 678-681, 1996.

SHUGHRUE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurology*. 388: 507-525, 1997.

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

SIMERLY, R.B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M.; SWANSON, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.*, 294: 76-95, 1990.

SIMONIAN, S.X.; HERBISON, A.E. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.*, 9: 803:806, 1997.

SKOTT, O. Body sodium and volume homeostasis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285: R14-R18, 2003.

SKOTT, O. Estrogen receptors and central osmotic regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286: R445, 2004.

SKOWSKY, W.R.; SWAN, L.; SMITH, P. Effects of sex steroid hormones on arginina vasopressin in intact and castrated male and female rats. *Endocrinology*. 104: 105-108, 1979.

SLADEK, C.D.; ARMSTRONG, W. Osmotic control of vasopressin release. *Trends Neurosci.*, 166-169, 1985.

SLADEK, C.D.; SOMPONPUN, S.J. Oestrogen receptor β : role in neurohypophyseal neurons. *J. Neuroendocrinol.*, 16: 365-371, 2004.

SOFRONIEW, M. V.; SCHRELL, U. Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neuros. *Neurosci. Lett.*, 22: 211-217, 1981.

SOMPONPUN, S.; SLADEK, C. Osmotic regulation of estrogen receptor- β in rat vasopressin and oxytocin Neurosn. *J. Neurosci.*, 23: 4261-4269, 2003.

SOMPONPUN, S.J.; JOHNSON, A.K.; BELTZ, T.; SLADEK, C.D. Osmotic regulation of estrogen receptor- β expression in magnocellular vasopressin neuron requires the lamina terminalis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286: R465 – R473, 2003.

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

SOMPONPUN, S.; SLADEK, C. Role of estrogen receptor- β in regulation of vasopressin and oxytocin release *in vitro*. *Endocrinology*, 143: 2899-2904, 2002.

STARBUCK, E.M.; FITTS, D.A. Subfornical organ disconnection and FOS-like immunoreactivity in hypothalamic nuclei after intragastric hypertonic saline. *Brain Res.*, 951: 202-208, 2002.

STRICKER, E.M. AND VERBALIS, J.G. Central inhibitory control fo sodium appetite in rats: correlation with pituitary oxytocin secretion. *Behav. Neurosci.*, 101:560-567, 1987.

STUMPF, W.E. Estrogen-neurons and estrogen systems in the periventricular brain. *Am. J. Anat.*, 129: 207-218, 1970.

STUMPF, W.E.; SAR, M.; KEEFER, D.A. Atlas of estrogen target cells in rat brain. In: Stumpf WE, Grant LD (eds) *Anatomical Neuroendocrinol.* Karger, Basel, pp 104-119, 1975.

SUZUKI, S.; HANDA, R.J. Estrogen receptor-beta, but not estrogen receptor-alpha, is expressed in prolactin neurons of the female rat paraventricular and supraoptic nuclei: comparison with other neuropeptides. *J. Comp. Neurol.*, 484: 28-42, 2005.

SUZUKI, S.; HANDA, R.J. Regulation of estrogen receptor-beta expression in the female rat hypothalamus: differential effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology*, 145: 3658-3670, 2004.

SWAAB, D.F.; NIJVELDT, F.; POOL, C.W. Distribution of oxytocin and vasopressin in rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J. Endocrinol.*, 67: 461-462, 1975.

SWANSON, L.W.; KUYPERS, H.G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J. Comp. Neurol.*, 194(3): 555-570, 1980.

SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Ver. Neurosci.*, 6: 269-324, 1983.

SWANSON, L.W. *Brain Maps: Structure of the rat brain.* Amsterdam: Elsevier, 1992.

SWENSON, K.L.; BADRE, S.E.; MORSETT, D.J.; SLADEK, C.D. N-methyl-D-aspartic acid stimulation of vasopressin release: role in osmotic regulation and modulation by gonadal steroids. *J. Neuroendocrinol.*, 10: 679-685, 1998.

THOMAS, A.; AMICO, J. Sequential estrogen and progesterone (P) followed by P withdrawal increases the level of oxytocin messenger ribonucleic acid in the hypothalamic paraventricular nucleus of the male rat. *Life Sci.* 58: 1615-1620, 1996.

THOMAS, S.; CROWLEY, R.S.; AMICO, J.A. Effect of progesterone on hypothalamic oxytocin messenger ribonucleic acid levels in the lactating rat. *Endocrinology*, 136: 4188-4194, 1995.

TIMOFEEVA, E.; BARABOI, E.D.; RICHARD, D. Contribution of the vagus nerve and lamina terminalis to brain activation induced by refeeding. *Eur. J. Neuroscience*, 22: 1489-1501, 2005.

TIMOFEEVA, E.; PICARD, F.; DUCLOS, M.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. Neuronal activation and corticotrophin-releasing hormone expression in the brain of obese (fa/fa) and lean (fa/?) Zucker rats in response to refeeding. *Eur. J. Neurosci.*, 15: 1013-1029, 2002.

VAN TOL, H.H.; BOLWERK, E.L.; LUI, B.; BURBACH, J.P. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*, 122 (3): 945-951, 1988.

VANDESANDE, F.; DIERICKX, K.; DEMEY, J. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibers of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tiss. Res.*, 180: 443-452, 1977.

VERBALIS, J.G.; MANGIONE, M.P.; STRICKER, E.M. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology*, 128 (3): 1317-1322, 1991.

VOISIN, D.L.; SIMONIAN, S.X.; HERBISON, A.E. Identification of estrogen receptor-containing neurons projecting to the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience*, 78: 215-228, 1997.

WANG, H.; WARD, A.R.; MORRIS, J.F. Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience*, 68: 1179-1188, 1995.

WINDLE, R.J.; FORSLING, M.L. Variations in oxytocin secretion during the 4-day oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol.*, 136 (2): 305-311, 1993.

WONG, M.; MOSS, R.L. Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 beta-estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res.*, 543: 148-152, 1991.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)