**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

Fabiana Lucio de Oliveira

**Expressão de receptores para estrógeno e atividade de
neurônios vasopressinérgicos em ratas ovariectomizadas sob
estimulação osmótica**

Ribeirão Preto
2012

Fabiana Lucio de Oliveira

**Expressão de receptores para estrógeno e atividade de
neurônios vasopressinérgicos em ratas ovariectomizadas sob
estimulação osmótica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia
Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lucio-Oliveira, F

Expressão de receptores para estrógeno e atividade de neurônios vasopressinérgicos em ratas ovariectomizadas sob estimulação osmótica.

Ribeirão Preto, 2011.

107p; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Franci, Celso Rodrigues

1. Vasopressina 2. Estrógeno
3. Jejum 4. Realimentação

Fabiana Lucio de Oliveira

**Expressão de receptores para estrógeno e atividade de
neurônios vasopressinérgicos em ratas ovariectomizadas sob
estimulação osmótica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo,
como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências
Área de Concentração: Fisiologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Instituição: IB - UFRGS

Assinatura:_____

Prof. (a) Dr. (a) Paula Condé Lamparelli Elias

Instituição: HCFMRP - USP

Assinatura:_____

Prof. (a) Dr. (a) Evelin Capellari Cárnio

Instituição: EERP – USP

Assinatura:_____

Prof. (a) Dr. (a) Lucila Leico Kagohara Elias

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____

Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____

Ribeirão Preto, 29 de Março de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

*Aos meus pais **Luzia** e **José Fabrício** que não mediram esforços para que eu pudesse alcançar os meus objetivos, muitas vezes deixando de lado seus próprios sonhos;*

*A minha irmã **Luciana** que sempre esteve presente em todas as etapas da minha vida, sempre com sua amizade e amor.*

Obrigada por todo apoio, amor e orações que foram extremamente necessárias.

Sem vocês nada em minha vida teria significado.

Muito obrigada. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus todo o meu agradecimento e gratidão por toda inspiração, capacidade, sabedoria e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, pela orientação, pela transmissão de conhecimentos, convivência acadêmica, oportunidade oferecida e paciência. Obrigada por respeitar os meus erros que me fizeram refletir e que contribuíram com o meu crescimento acadêmico e pessoal ao longo dos anos de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Gilberto Sanvitto, Profa. Dra. Paula Elias, Prof. Dra. Evelin Capellari e Prof. Dra. Lucila Leico pelas sugestões e avaliação deste trabalho.

Aos meus queridos amigos e companheiros: Rafael Prado, André Dagostin, Marina Durand, Fernanda Machado, Ernane Uchôa, Iracema Gomes e Lys. Obrigada pela amizade, convivência, paciência e pelas trocas de ideias.

Aos amigos do departamento pelos momentos de amizade, aprendizado, conversas no corredor e risadas.

As amigas de casa: Milena, Juliana e Andréia. Meninas, muito obrigada pela convivência, amizade e momentos tão especiais compartilhados.

Aos amigos de laboratório: Bruno, Larissa, Luana, Procópio e, especialmente, ao Guilherme que sempre esteve muito disposto em me ajudar nos programas estatísticos. Obrigada pela amizade.

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

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

A CAPES, FAPESP e CNPQ pelo auxílio financeiro.

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

RESUMO

A homeostase hidro-eletrolítica é controlada por informações sobre volume e a concentração dos íons dos líquidos corporais. Alterações da osmolalidade são detectadas por receptores presentes em diversas regiões do SNC, entre as quais os órgãos circunventriculares. Alterações conformacionais nestas células ativam neurônios localizados nos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo, que secretam ocitocina (OT) e vasopressina (AVP). A osmolalidade plasmática aumenta em consequência da alimentação, o que induz a secreção de OT e AVP. Os esteróides ovarianos podem influenciar o balanço de líquidos, modulando sistemas hormonais que regulam tanto o consumo quanto a excreção de água, ou agindo diretamente em neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do hipotálamo. No entanto, esta ação não é ainda entendida. É possível que esses sistemas respondam de forma diferente às variações de estrógeno, talvez por ação direta através de receptores de estrógeno tipo β em neurônios OT e AVP do PVN e SON, e por ação indireta através de receptores de estrógeno tipo α em órgãos circunventriculares. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação do estradiol na modulação da secreção de AVP em resposta ao estímulo osmótico induzido pela realimentação após jejum. Para tanto, foi realizada a determinação da concentração plasmática de AVP, a análise da ativação de neurônios AVP, o conteúdo protéico de ER β no PVN e no SON bem como a ativação neuronal pela expressão de FOS e a expressão de ER α nos órgãos circunventriculares de animais ovariectomizados tratados com estradiol ou veículo. Os resultados mostram que a realimentação após jejum de 48 horas aumenta a expressão de FOS e a expressão da proteína de ER β no PVN e SON, a expressão de FOS nos órgãos circunventriculares estudados e a concentração plasmática de AVP. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Houve uma inibição da expressão de ER α nos órgãos circunventriculares estudados. Aparentemente, o estradiol não participa da elaboração de uma resposta frente ao estímulo osmótico induzido pela realimentação e não interfere na ativação de neurônios AVP e na secreção desse hormônio para circulação sanguínea.

Palavras-chave: Vasopressina, estradiol, realimentação, jejum.

ABSTRACT

The hydroelectrolyte homeostasis is controlled by information on volume and concentration of ions in the body fluids. Osmolality changes are detected by receptors in various regions of the CNS, including the circumventricular organs. Conformational changes of these cells activate neurons located in the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nucleus of the hypothalamus, which secrete oxytocin (OT) and vasopressin (AVP). Feeding increases the plasma osmolality which induces the secretion of AVP and OT. Ovarian steroids may influence the balance of fluids modulating hormonal systems that regulate both consumption and excretion of water or acting directly on oxytocinergic and vasopressinergic neurons of the hypothalamus. However, this action is not clearly understood. It is possible that these systems respond differently to the estrogen changes perhaps by direct action through estrogen receptor type β in AVP and OT neurons of the PVN and SON, and by indirect action through estrogen receptor type α in circumventricular organs. The objective of this study was to evaluate the participation of estrogen in the modulation of AVP secretion in response to osmotic stimulus induced by refeeding after fasting. For this purpose, we performed the determination of plasma AVP, the analysis of the activation of AVP neurons, the protein content of ER β in the PVN and SON as well as activation by neuronal expression of FOS and the expression of ER α in the circumventricular organs in estrogen-primed and -unprimed ovariectomized animals. The results show that refeeding after fasting for 48 hours increases the expression of FOS and ER β protein in the PVN and SON, the expression of FOS in the circumventricular organs studied and plasma AVP. However, there was no significant difference between treatments with estrogen or vehicle. There was an inhibition of ER α expression in the circumventricular organs studied. Apparently, estrogen does not participate in the preparation of a response to the osmotic stimulus induced by refeeding and it does not interfere in the activation of AVP neurons or the secretion of this hormone to the bloodstream.

Keywords: Vasopressin, estrogen, refeeding, fasting.

*"... É preciso força
Pra sonhar e perceber
Que a estrada vai
Além do que se vê."
Marcelo Camelo*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Osmolalidade (mOsm/KgH ₂ O) nos diferentes grupos experimentais.....	31
Figura 2: Variação percentual (%) da osmolalidade nos diferentes grupos experimentais.....	32
Figura 3: Concentração plasmática de Vasopressina de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo ou estradiol.....	33
Figura 4: Número de neurônios vasopressinérgicos (AVP) nas porções (A) magnocelular medial - PaMM, (B) magnocelular lateral – PaML e (C) supraóptico – SON de animais ovariectomizados tratados com veículo ou estradiol.....	35
Figure 5: Número de neurônios imunorreativos a FOS nas porções (A) magnocelular medial (PaMM), (B) magnocelular lateral (PaML) e (C) supraóptico (SON) de animais ovariectomizados tratados com veículo ou estradiol.....	38
Figure 6: Porcentagem de neurônios vasopressinérgicos (AVP) imunorreativos à proteína FOS nas porções (A) magnocelular medial (PaMM), (B) magnocelular lateral (PaML) e (C) supraóptico(SON) de animais ovariectomizados tratados com veículo ou estradiol.....	41
Figura 7: Fotomicrografias de secções coronais (14µm) mostrando neurônios AVP/FOS dos núcleos magnocelular medial (PaMM), magnocelular lateral (PaML) e núcleo supraóptico (SON) do hipotálamo de ratas OVX realimentadas com ração padrão ou alimento sem sódio tratadas com veículo ou estradiol.....	42

Figura 8: Análise semi- quantitativa da expressão <i>ERβ</i> 54 (KDa) e β -tubulina (55 KDa) no PVN (A) e no SON (B) por <i>western blotting</i>	44
Figura 9: Número de neurônios FOS-ir (A), receptor para estrógeno- tipo α (<i>ERα</i>) (B) e coexpressão de FOS/ <i>ERα</i> (C) no OVLT de animais tratados com veículo ou estradiol.....	46
Figure 10: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS, receptor para estrógeno- tipo α (<i>ERα</i>) e a colocalização FOS/ <i>ERα</i> em cortes coronais (20 μ m) do OVLT.....	47
Figura 11: Número de neurônios FOS-ir (A), receptor para estrógeno- tipo α <i>ERα</i> (B) e coexpressão de FOS/ <i>ERα</i> (C) na porção ventral do MnPO de animais tratados com veículo ou estradiol.....	49
Figure 12: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS, receptor para estrógeno- tipo α (<i>ERα</i>) e a colocalização FOS/ <i>ERα</i> em cortes coronais (20 μ m) da porção ventral do MnPO.....	50
Figura 13: Número de neurônios FOS-ir (A), receptor para estrógeno- tipo α (<i>ERα</i>) (B) e coexpressão de FOS/ <i>ERα</i> (C) na porção dorsal do MnPO de animais tratados com veículo ou estradiol.....	52
Figure 14: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS, receptor para estrógeno- tipo α (<i>ERα</i>) e a colocalização FOS/ <i>ERα</i> em cortes coronais (20 μ m) da porção dorsal do MnPO.....	53
Figura 15: Número de neurônios FOS-ir no SFO de animais tratados com veículo ou estradiol.....	54
Figure 16: Fotomicrografia ilustrando o SFO (20 μ m) de ratos tratados com veículo ou estradiol.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP: Peptídeo natriurético atrial

AP: Área postrema

AV3V: Região ântero-ventral do terceiro ventrículo

AVP: Vasopressina

CVO: Órgãos circunventriculares

EPM: Erro padrão da média

ER α : Receptor de estrógeno tipo α

ER β : Receptor de estrógeno tipo β

HNS: Sistema hipotálamo-neuro-hipófise

MnPO: Núcleo preóptico mediano

OT: Ocitocina

OVLT: Órgão vascular da lâmina terminal

OVX: Ovariectomizada

PaML: Porção magnocelular lateral do PVN

PaMM: Porção magnocelular medial do PVN

PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo

SFO: Órgão subfornicial

SNC: Sistema nervoso central

SON: Núcleo supraóptico do hipotálamo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	09
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1) Animais	21
2) Delineamento Experimental.....	21
2.1) Experimento I	22
2.2) Experimento II	22
2.3) Experimento III	23
3) Procedimentos Experimentais	23
Coleta de sangue	23
Determinação da Osmolalidade.....	23
Perfusão e preparação do tecido cerebral para imunoistoquímica.....	24
Imunoistoquímica	24
Aquisição das imagens.....	25
Contagem de neurônios	25
Dosagem hormonal	25
Extração e dosagem de Vasopressina.....	25
Western Blotting para receptores ER β no PVN e SON.....	26
Análise Estatística	28
RESULTADOS	30
Osmolalidade.....	31
Dosagem hormonal de AVP plasmática por RIE.....	32
Imunoistoquímica para AVP e FOS	33
Número de neurônios AVP	33
Expressão da proteína FOS	36
Expressão da proteína FOS em neurônios AVP (colocalização)	39
Determinação do conteúdo protéico de ER β no PVN e SON.....	43
Imunoistoquímica para ER α e FOS - OVLT	45
Imunoistoquímica para ER α e FOS – MnPO porção ventral	48
Imunoistoquímica para ER α e FOS – MnPO porção dorsal	51
Imunoistoquímica para FOS – SFO	54
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	81

A manutenção do volume e da osmolalidade dos líquidos corporais é indispensável para a homeostase do organismo. Nesta condição, o volume total dos líquidos corporais e a concentração dos íons permanecem relativamente constantes. O sódio, principal soluto extracelular, é o elemento mais efetivo para criar um gradiente osmótico, que permita o movimento de água entre os compartimentos intra e extracelular. O balanço é mantido em parte por mudanças no apetite ao sódio e na natriurese, reguladas osmoticamente (Bourque e Oliet, 1997).

As alterações de volume, osmolalidade e especificamente de sódio são detectadas por receptores, que detectam variação de osmolalidade ou concentração de sódio (osmo/sódio receptores) e estão presentes em diversas regiões do sistema nervoso central (SNC), principalmente no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornicial (SFO) e área postrema (AP) (Arima e cols., 1998). Estas estruturas desprovidas de barreira hematoencefálica, chamadas órgãos circunventriculares (CVO), estão relacionadas com diversas respostas autonômicas e comportamentais geradas por alterações do volume e/ou da osmolalidade do plasma (Bourque e Oliet, 1997). A região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) desempenha função crucial na detecção das alterações de volume e de osmolalidade. Ela inclui a parte ventral do núcleo preóptico mediano (MnPO), o OVLT e áreas periventriculares do terceiro ventrículo. Essas estruturas juntamente com o SFO contêm neurônios sensíveis às variações de osmolalidade do plasma e do líquido cefalorraquidiano. A implicação de CVO, como o SFO, no monitoramento da elevação da osmolalidade plasmática após desafio hiperosmótico ou após a alimentação tem sido sugerida (Starbuck e Cols, 2002). Alterações conformacionais nestas células ativam neurônios localizados nos núcleos supra-ópticos (SON) e paraventriculares (PVN) que secretam vasopressina (AVP) (Oliet e Bourque, 1993). Além disso, essas regiões integram sinais endócrinos provenientes da circulação periférica como angiotensina II, relaxina e peptídeo natriurético atrial (ANP) (Mendelsohn e cols., 1984; Osheroff e Phillips, 1991). Embora alguns neurônios magnocelulares apresentem a capacidade de resposta intrínseca quando expostos a um ambiente hipertônico, sabe-se que lesão da região AV3V diminui a resposta de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos ao

estímulo osmótico, mas mantém inalteradas as respostas no parto e na sucção mamilar para a secreção ocitocinérgica (Cunningham e Sawchenko, 1991; Bourque, 1994).

A estimulação local do SON e a sistêmica após lesão da região AV3V mostram que a integridade das aferências provenientes desta região é essencial para respostas a estímulos osmóticos periféricos (Ludwing e cols., 1996).

Um dos estímulos efetivos para a secreção de AVP em ratos é o aumento de cerca de 2% da osmolalidade (Sladek e Knigge, 1977). Com o aumento da osmolalidade também é desencadeado o mecanismo de sede e o de redução da excreção urinária de água mediada pela vasopressina (Antunes-Rodrigues e cols., 2005) e elevação diretamente proporcional da concentração plasmática de OT provocando a excreção de sódio e cloreto (Balment e cols., 1980).

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) eis que essa ingestão envolve um comportamento regulador complexo, na qual interagem mecanismos de controle inibitórios e excitatórios (Cunningham e Sawchenko, 1991). Durante a alimentação ações da AVP contribuem para a regulação do balanço de água, a modificação na pressão sanguínea e o término da ingestão alimentar (Pittman e cols., 1982; Palkovits, 1984; Langhans e cols., 1991).

A AVP e OT são hormônios sintetizados por neurônios parvocelulares e magnocelulares do hipotálamo. Terminais de neurônios magnocelulares encontram-se na neuro-hipófise, de onde os hormônios são liberados para a circulação sistêmica. Os axônios destes neurônios partem em direção à neuro-hipófise organizando-se em dois grupos: um grupo medial (MM) que apresenta predomínio de neurônios ocitocinérgicos e um grupo lateral (ML), principalmente vasopressinérgico, com formato arredondado (Hatton e cols., 1976). Além disso, tem sido descrita a existência de neurônios ocitocinérgicos na porção externa do grupo ML, formando uma borda ao redor da porção vasopressinérgica. Ambos os hormônios também são sintetizados em neurônios do sistema neurosecretório parvocelular de núcleos hipotalâmicos (Vandesande e cols., 1977).

A AVP é conhecida por suas ações antidiurética e vasoconstritora aumentando a permeabilidade dos dutos coletores renais à água e, conseqüentemente, aumentando a sua reabsorção de água. Este mecanismo ocorre quando a AVP se liga ao seu receptor do subtipo V2, localizado na membrana apical da célula tubular renal, fosforilando canais de água do tipo aquaporina 2 (Yamamoto e cols., 1995). A presença desses canais aumenta a permeabilidade à água permitindo assim o movimento da água livre dos dutos coletores para as células tubulares, passando para o sangue pela presença de aquaporinas do tipo 3 e 4 que são expressas na membrana basolateral (Klusmann e cols., 2000). A hipovolemia e a hiperosmolalidade do líquido extracelular aumentam a secreção de AVP e OT em ratos (Share, 1988; Oliet e Bourque, 1993; Smith e Day, 2003).

A OT é um nonapeptídeo cujas principais ações inicialmente descritas foram relacionadas ao trabalho de parto e à ejeção de leite. Dale (1906) foi o primeiro a observar a contração uterina ao injetar endovenosamente extratos hipofisários em gatas. Em 1910, Ott e Scott mostraram 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 este foi o primeiro hormônio cerebral a ser identificado e purificado, caracterizando o cérebro como órgão endócrino (Du Vigneaud e cols., 1953; Du Vigneaud, 1955). Adicionalmente às ações clássicas descritas, a OT é secretada em resposta ao estímulo osmótico (Morris e cols., 1994) e participa do controle do balanço hidro-eletrolítico de duas maneiras: por ação natriurética, diretamente mediada por receptores específicos, presentes nos rins (Verbalis e cols., 1991) e, indiretamente, pela estimulação da liberação de ANP pelo coração (McCann e cols., 1994; Gutkowska e cols., 1997) e por inibição do apetite ao sódio (Stricker e Verbalis, 1996).

Entretanto, uma diminuição de 3% a 6% da osmolalidade plasmática reduz a secreção de AVP e OT, mesmo em presença de uma redução de volume plasmático de 30%, mostrando ser o estímulo osmótico preponderante sobre as alterações de volume, nestas condições experimentais (Stricker e Verbalis, 1986). Em humanos, a redução de 6% no volume sanguíneo ou de aproximadamente 10% no volume plasmático, induzida pela injeção de furosemida, é suficiente para aumentar a secreção de AVP (Kimura e cols.,

1976). Tem sido demonstrado que a AVP pode promover reabsorção de água em algumas regiões do cérebro e agir como um coadjuvante importante em processos fisiopatológicos de formação de edema cerebral (Niermann e cols., 2001).

Adicionalmente a seus efeitos periféricos, a AVP e a OT também atuam centralmente para o controle do equilíbrio hidrossalino. Quando injetadas centralmente, a AVP aumenta a ingestão de água (Szczepanska-Sadowska e cols., 1982) e a OT diminui a ingestão de sal (Stricker e Verbalis, 1996). O efeito inibitório da OT no apetite ao sódio foi demonstrado por trabalhos realizados em camundongos com deleção para o gene da OT que apresentam aumento do apetite ao sódio em comparação com camundongos normais, após privação hídrica (Puryer e cols., 2001).

Várias substâncias podem exercer controle sobre a secreção de AVP e OT, dentre as quais os hormônios gonadais. Os esteróides ovarianos podem influenciar o balanço de líquidos agindo diretamente em neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do hipotálamo ou indiretamente, modulando sistemas hormonais que regulam tanto o consumo quanto a excreção de água ou o próprio sistema hipotálamo-neuro-hipofisário. Durante o ciclo estral de ratas observou-se variação no consumo de água e de alimentos. Durante 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 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, em ratas (Crocker e Hinsull, 1972; Forsling e Peysner, 1988). Estudos em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno por vários dias ou semanas, para avaliar a expressão do gene de AVP e OT, não conseguiram demonstrar se o estrógeno age diretamente em neurônios AVP e OT ou indiretamente através de interneurônios ou de outras regiões do cérebro.

Alguns autores mostraram que o estrógeno não tem efeito significativo sobre o conteúdo de AVP e OT no PVN (Van Tol e cols., 1988), porém, outros pesquisadores demonstraram que o tratamento com estrógeno é capaz de reduzir o RNAm de OT, no PVN de ratas previamente ovariectomizadas (Shughrue e cols., 2002) ou aumentar o RNAm para OT (Amico e cols., 1995) e

AVP (Patchev e cols., 1995) no PVN. Desta forma, o estrógeno poderia atuar em neurônios OT e AVP, modulando a atividade dos mesmos (Suzuki e Handa, 2005). A ação dos esteróides gonadais em neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos é admitida, porém, não devidamente entendida. É possível que os sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico respondam de forma diferente às variações de estrógeno envolvendo ações diretas e indiretas.

Os primeiros estudos sobre distribuição de receptores para estrógeno no cérebro utilizaram autoradiografia com estradiol radiomarcado (H^3) *in vivo* (Stumpf, 1970; Ptaff e Keiner, 1973; Stumpf e cols., 1975) e detectou áreas de ligação para estrógeno no SON e PVN. Rhodes e cols., (1981) usaram a dupla marcação de autoradiografia *in vivo* com imuno-histoquímica para mostrar que neurônios AVP e OT concentravam estrógeno radiomarcado, indicando uma possível ação direta do estrógeno para regular a secreção desses peptídeos.

A clonagem do primeiro subtipo de receptor para estrógeno (ER), denominado ER- α , foi feita em 1986 (Green e cols., 1986) e, a do segundo subtipo, a partir de tumor da próstata de ratos, denominado ER- β , em 1996 (Kuiper e cols., 1996). Existem relatos de expressão de ER- α no PVN, somente em neurônios TRH, mas não no SON (Suzuki e Handa, 2005). Não se pode descartar uma possível regulação indireta do estrógeno nos neurônios AVP e OT em ratos via ER- α , considerando que neurônios do MnPO e do OVLT com expressão desses receptores projetam-se para o SON (Voisin e cols., 1997). A expressão de ER- β em neurônios AVP e OT está bem estabelecida na literatura (Hrabovszky e cols., 1998; Laflame e cols., 1998; Somponpun e Sladek, 2003; Suzuki e Handa, 2005). Em ratas castradas, o tratamento com estrógeno diminuiu significativamente a expressão de ER- β no PVN e SON (Suzuki e Handa, 2004). Outro estudo demonstra que não houve alteração nessa expressão (Greco e cols., 2001). Esse conflito de resultados pode ser devido à diferença das doses de estrógeno administradas.

Somponpun e Sladek (2003) verificaram que a expressão de ER- β em machos está correlacionada negativamente com mudanças da osmolalidade plasmática, mas somente em neurônios magnocelulares do PVN e SON ativados em resposta ao estímulo osmótico. Porém, não se pode descartar que outros fatores controlem a expressão de ER- β , entre os quais o próprio estrógeno. Esse estudo não correlacionou a expressão de ER- β com a

concentração de estrógeno, mas outros estudos demonstraram que o estrógeno diminuiu a expressão de RNAm para ER- β no PVN de ratos (Patisaul e cols., 2001; Suzuki e Handa, 2004). Outros estudos não verificaram variação na expressão de ER- β em função da concentração de esteróides gonadais circulantes (Greco e cols., 2001) ou da fase do ciclo estral (Caligioni, 2005).

Para que ocorra a regulação da expressão de ER- β no PVN e SON é necessária a integridade da região AV3V. Tanto o OVLT como o SFO contém neurônios osmorreceptivos e enviam projeções diretas ao SON e PVN bem como projeções indiretas via MnPO. A lesão da região AV3V, destruindo o OVLT, a porção ventral do MnPO e as fibras de passagem do SFO, bloqueia a liberação de AVP e OT pelos neurônios magnocelulares do PVN e SON em resposta ao aumento da osmolalidade e impedindo também a inibição da expressão de ER- β (Somponpun e cols., 2004).

A proteína de ER- β é localizada primeiramente nos núcleos dos neurônios magnocelulares. Assim, para esse receptor exercer uma ação inibitória, é necessário alterar a expressão gênica de AVP e OT. 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 de OT como de AVP, possuem em suas regiões promotoras elementos com potencial para regulação de estrógeno (Simonian e Herbison, 1997; Alves e cols., 1998; Shapiro e cols., 2000; Somponpun e Sladek, 2003).

Apesar da regulação gênica de AVP e OT através de ERE serem os primeiros candidatos para a regulação da secreção dos hormônios, outros fatores também podem ser responsáveis por essa secreção dos peptídeos. Por exemplo, a liberação de AVP e OT em resposta ao estímulo osmótico, depende de transmissão glutamatérgica de neurônios do OVLT (Russell e cols., 1989; Hanamura e cols., 1992). Experimentos prévios, usando explantes do sistema hipotálamo-neuro-hipófise (HNS), demonstraram que o agonista para o receptor NMDA estimula, enquanto o antagonista inibe significativamente a secreção de AVP e OT, induzida pelo estímulo osmótico (Swenson e cols., 1998; Somponpun e Sladek, 2002). A subunidade do receptor NMDA (NR) nos neurônios magnocelulares é regulada por estímulo osmótico. A NR funcional consiste de subunidades chamadas de NR1 e NR2 (Al-Ghoul e cols., 1997). A

estimulação osmótica aumenta a expressão de NR1 e altera a razão da expressão em relação à 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. Consequentemente, 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 predominante de ER- β em neurônios AVP sugere que a influência do estrógeno nestes receptores poderia ser mais pronunciada em neurônios AVP do que em neurônios OT. Entretanto, a genisteína, um fitoestrógeno com afinidade grande pelo ER- β , preveniu a liberação de AVP e OT em explantes de HNS, induzida pelo NMDA. Também, a atenuação da expressão de ER- β em neurônios estimulados hiperosmoticamente ocorre tanto em neurônios AVP, como em neurônios OT. Assim, o impacto da inibição mediada pelo ER- β pode ocorrer em ambos os neurônios (Somponpun e Sladek, 2003).

A ação fisiológica de ER- β em neurônios magnocelulares permanece uma questão aberta. Ratos adultos e humanos liberam AVP e OT em resposta ao estímulo osmótico, mesmo na presença de estrógeno ou testosterona circulante. A regulação da redução na expressão de ER- β (*downregulation*), durante a hiperosmolalidade, pode remover a influência inibitória, permitindo assim a liberação de AVP e OT em situações que requerem a secreção máxima desses hormônios. 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 para regulação da função da célula (Somponpun e Sladek, 2003). Em estudos *in vitro* a resposta ao estímulo osmótico foi inibida pelos esteróides gonadais (Swenson e Sladek, 1997). Esta inibição também ocorreu *in vivo* como foi demonstrado em nosso laboratório (Lucio-Oliveira e Franci, 2011). Existem vias osmorregulatórias, com aferências para o SON e PVN, que sinalizam 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.

Pouco é conhecido sobre os mecanismos ou vias pelas quais o estrógeno regula a atividade de neurônios AVP e OT e as mudanças no balanço de líquidos e eletrólitos associados aos diferentes estágios da função reprodutiva. Alterações na expressão de ERs podem modificar a ação dos esteróides gonadais por amplificar ou diminuir o efeito do aumento dos ligantes (Greco e cols., 2001; Patisaul e cols., 2001; Somponpun e Sladek, 2003; Suzuki e Handa, 2004).

Assim, tendo como base essas informações sobre a secreção de AVP e OT e as evidências do controle estrogênico sobre a secreção desses hormônios, tornou-se necessária a busca por um melhor entendimento de como se realiza esse controle. Utilizando a realimentação como modelo experimental, com o objetivo de aumentar a osmolalidade, analisou-se o efeito do tratamento com estradiol na atividade dos neurônios magnocelulares que secretam AVP no PVN e SON ativados por aumento da osmolalidade.

OBJETIVOS

Considerando os estudos sobre a variação da secreção de vasopressina em resposta aos estímulos osmóticos e as evidências sobre a possível modulação do estradiol nessa secreção: o objetivo geral foi estudar como o estradiol pode modular a secreção de AVP em resposta ao estímulo osmótico; os objetivos específicos deste trabalho foram avaliar:

1. a expressão de FOS em neurônios vasopressinérgico do PVN e SON em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo, em estado alimentar *ad libitum*, jejum por 48 horas e realimentação com ração padrão (estímulo osmótico agudo) ou realimentação sem sódio, por duas horas após jejum de 48 horas;
2. o conteúdo protéico do receptor $ER\beta$ nos núcleos PVN e SON em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo, em estado alimentar *ad libitum*, jejum por 48 horas e realimentação com ração padrão (estímulo osmótico agudo) ou realimentação sem sódio, por duas horas após jejum de 48 horas;
3. a expressão do receptor $ER\alpha$ e a expressão de FOS no OVLT, MnPO (porções dorsal e ventral) e SFO, após estímulo osmótico induzido pela realimentação em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo;
4. a concentração plasmática de vasopressina nas condições experimentais referidas nos itens anteriores.

MATERIAL E MÉTODOS

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, água e ração *ad libitum* (a ração foi suspensa 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. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP (Protocolo Nº 018/2008).

Após o período de adaptação 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. Os animais receberam uma dose (0,2 ml/animal, i.m.) profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, Fontorua-Wyeth S.A.) e uma dose de analgésico Flunixin meglumina (Benamine) 50 µg (0,1 ml/ animal, i.m.). Após duas semanas, os animais foram submetidos à terapia hormonal com estradiol (cipionato de estradiol -10 ug/0,1 ml/animal) ou veículo (óleo de milho).

2) Delineamento Experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

I) Grupo *Ad libitum*:

Estes animais receberam terapia hormonal com estradiol ou veículo por 3 dias, às 9 horas e tiveram alimentação e água *ad libitum* durante todo o experimento. No dia do experimento, às 15 horas, foi realizada a coleta de sangue seguida de perfusão para fixação do cérebro

II) Grupo Jejum:

Estes animais receberam terapia com estradiol ou veículo por 3 dias, às 9 horas, e no segundo dia, a partir das 15 horas, foram submetidos ao jejum por 48 horas, somente com água *ad libitum*, até o dia do experimento, quando foi realizada a coleta de sangue seguida de perfusão para fixação do cérebro.

III) Grupo realimentado com ração padrão:

Estes animais receberam terapia com estradiol ou veículo por 3 dias, às 9 horas, e no segundo dia, a partir das 13 horas, foram submetidos ao jejum por 48 horas, somente com água *ad libitum*, até às 13 horas do dia do experimento, quando tiveram acesso à realimentação por 2h. A realimentação foi realizada para induzir o aumento da osmolalidade de forma natural. Às 15 horas foi realizada a coleta de sangue seguida de perfusão para fixação do cérebro.

IV) Grupo realimentado com alimento sem sódio:

Estes animais receberam terapia com estradiol ou veículo por 3 dias, às 9 horas, e no segundo dia, a partir das 13 horas, foram submetidos ao jejum por 48 horas, somente com água *ad libitum*, até às 13 horas do dia do experimento, quando tiveram acesso à realimentação com alimento sem sódio por 2h. Às 15 horas foi realizada a coleta de sangue seguida de perfusão para fixação do cérebro.

Estes grupos foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:

2.1) Experimento I

Avaliação da expressão de FOS em neurônios vasopressinérgicos do PVN e SON em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo

Protocolo Experimental: No dia do experimento as ratas foram anestesiadas e o sangue coletado para determinação da osmolalidade plasmática. Em seguida houve perfusão para a fixação do tecido cerebral e a realização posterior dos procedimentos imunoistoquímicos.

2.2) Experimento II

Avaliação do conteúdo protéico de ER β nos núcleos PVN e SON do hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo

Protocolo Experimental: No dia do experimento as ratas foram decapitadas e o sangue coletado para determinação de osmolalidade e de vasopressina plasmáticas. Os cérebros foram imediatamente armazenados

para posterior análise. As estruturas hipotalâmicas PVN e SON foram retiradas por meio da técnica de microdissecção para análise do conteúdo protéico de ER β . A dosagem de vasopressina foi realizada por radioimunoensaio.

2.3) Experimento III

Avaliação da expressão de ER α e FOS nos núcleos OVLT, MnPO (porções dorsal e ventral) e SFO de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo

Protocolo Experimental: No dia do experimento as ratas foram anestesiadas e o sangue coletado para a determinação de osmolalidade plasmática. Em seguida houve perfusão para a fixação do tecido cerebral e a realização posterior dos procedimentos imunoistoquímicos.

3) Procedimentos Experimentais

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. No grupo dos animais decapitados o sangue foi coletado diretamente do tronco. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm, sob refrigeração à 4° C, por 20 minutos. O plasma foi separado e devidamente acondicionado em congelador à temperatura de -20° C para determinação de osmolalidade e de vasopressina plasmáticas.

Determinação da Osmolalidade

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

Perfusão e preparação do tecido cerebral para imunoistoquímica

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 armazenado à temperatura de -70° C até ser seccionado e processado para imunoistoquímica.

As delimitações dos núcleos cerebrais de interesse foram baseadas em atlas estereotático (Swanson, 1992). Foram realizados cortes coronais de 20 µm e montados em lâminas gelatinizadas. O PVN foi analisado em duas sub-áreas distintas: porção magnocelular medial e porção magnocelular lateral. O SON foi analisado em toda sua extensão.

Imunoistoquímica

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 realizado pela incubação das secções por 1 hora, em solução de PBS 0,1M + BSA (soro albumina bovina) 1% + triton 0,2%.

Para a imunocolocalização de FOS e AVP, 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 para AVP (gentilmente cedido pelo Dr. Harold Gainer, National Institute of Health, Bethesda-MD, USA) na diluição 1:1000, por aproximadamente 16 horas à temperatura ambiente. Para a identificação de FOS e ERα, 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 para ERα (DAKO, Denmark) na diluição 1:100, por aproximadamente 72 horas em câmara fria. Em seguida, após as lavagens com PBS, as secções foram incubadas por

uma hora em PBS com Anti-IgG de coelho e Anti-IgG de camundongo produzidas em jumento, conjugadas com Alexa-Fluor 594 e com Alexa-Fluor 488 (Invitrogen/Molecular Probe, USA) respectivamente, usadas como anticorpos secundários.

Após o processamento imunoistoquímico as lâminas foram lavadas com PBS por 25 minutos e a seguir, passadas na água destilada para retirar o excesso de sal, e então foram cobertas com lamínulas usando Fluoromount-G (Eletron Microscopy Science, Hatfield, PA) como meio de montagem.

Aquisição das imagens

As secções foram examinadas em microscópio para fluorescência Leica e as imagens capturadas por câmera digital Leica DC 200 (Carl Zeiss, Germany). As secções cerebrais contendo neurônios marcados positivamente para AVP/FOS ou ER α /FOS foram adquiridas e classificadas em regiões de acordo com o Atlas Estereotáxico (Sawnsen, 1992) e fotografadas bilateralmente.

Contagem de neurônios

A contagem de células marcadas foi realizada manualmente com base em critérios de contagem considerando 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/>).

Dosagem hormonal

Extração e dosagem de Vasopressina

Previamente ao radioimunoensaio foi realizada a extração de vasopressina do plasma utilizando-se acetona e éter de petróleo conforme descrição a seguir:

Alíquotas de 250 μ l de plasma foram pipetadas em tubos numerados aos quais foram adicionados 500 μ l 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 liofilizada e armazenada a -20°C até o momento do radioimunoensaio.

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

A dosagem de AVP foi realizada por radioimunoensaio de duplo anticorpo. O anticorpo utilizado específico para AVP utilizado foi adquirido comercialmente (Bachen-Península Lab, USA). A anti-gamaglobulina para precipitação da reação nos radioimunoensaios foi o produzido 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 %. Os padrões utilizados (AVP- 8103) foram adquiridos comercialmente (Bachen-Península Lab, USA).

Western Blotting para receptores ERβ no PVN e SON

Preparação dos homogeneizados

Os tecidos microdissecados do PVN e SON foram homogeneizados individualmente em solução tampão para inibição das proteases, contendo Tris-HCl 20mM (pH 7.5), EDTA 1mM, MgCl₂ 5mM, DTT 1mM, PMSF 1mM e aprotinina 20ug/mL, com a utilização de um sonicador, ultrasonic na amplitude de 44%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 10.000 rpm por 15 minutos e a fração sobrenadante foi coletada.

A quantidade de proteína de cada amostra foi determinada por meio de técnica espectrofotométrica (Bradford, 1976) como referência para aplicação no gel de eletroforese, na quantidade de 30 µg de proteína por amostra.

SDS-PAGE Eletroforese

Tanto o gel de separação (de gradiente linear de concentração de 12%) quanto o de concentração foram feitos de acordo com descrição prévia (Laemmli, 1970). A cada amostra aplicada foi adicionado um tampão (q.s.p. 20µl), constituído por Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), SDS (dodecil sulfato de sódio) 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,01%. Essas

amostras foram colocadas em água fervente por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo antes de serem aplicadas no gel. Marcadores de peso molecular foram ensaiados nas laterais do gel.

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, sob corrente constante de + 0,12 mA por 3 horas com o procedimento posterior de eletrotransferência. As proteínas do gel foram transferidas à temperatura de 4°C e umidade mantida, para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, USA) de 0,45 µm, pela passagem de uma corrente de 350 mA durante 1:30 horas em tampão de transferência contendo glicina 400 mM, Tris 25 mM e 50 ml de isopropanol em 1 litro de solução.

A membrana de nitrocelulose foi corada com solução de *Ponceau*, para a confirmação de transferência das proteínas para esta membrana e, em seguida, lavada com água *milliq* até desaparecer toda marcação promovida pela solução de *Ponceau*. Depois a membrana foi incubada, durante 2 horas, em solução de PBS 0,1M contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) e 0,1% de Tween (PBS-T), sob agitação leve à temperatura de 4°C para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após esta incubação as membranas correspondentes ao PVN e SON foram lavadas uma vez em PBS somente para retirar o excesso de bloqueador e, em seguida, incubada com anticorpo primário contra receptor de estrógeno tipo β , produzido em camundongo (Novocastra, USA), na diluição de 1:1000 em tampão PBS-T com 1% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil), por 24 horas a 4°C sob agitação leve. Após incubação a membrana foi lavada 5 vezes com PBS-T, sendo uma lavagem rápida, uma de 15 minutos e três de 5 minutos.

Logo em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário HPR anti-mouse (Dako, Denmark) em PBS-T com 1% de leite desnatado na diluição de 1:7500 durante 2 horas sob temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 5 vezes em PBS-T e incubada por 30 segundos sob agitação leve, com o reagente *SuperSignal® West Femto Trial Kit* (Thermo Scientific, USA). Em seguida a membrana foi colocada em um cassete e revelada em um filme fotográfico (Kodak, USA).

Após a revelação da membrana para identificação do ER- β , as membranas foram lavadas em PBS-T e em seguida passaram por um

protocolo de “*stripping*” para recuperação da membrana com o uso do tampão *Restore Western Blot, Stripping Buffer* (Therm Scientific, USA). Logo em seguida, a membrana foi incubada, durante 2 horas, em solução de PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil), sob agitação leve à temperatura de 4°C para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, as membranas foram lavadas em PBS-T e incubadas com anticorpo primário anti-tubulina (Sigma, USA) produzido em camundongo na diluição de 1:2500 em tampão PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado por 24 horas a 4°C sob agitação. Após incubação a membrana foi lavada em PBS-T e incubada com anticorpo secundário HPR anti-mouse (Dako, Denmark) em PBS-T com 1% de leite desnatado na diluição de 1:7500 durante 2 horas sob temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 5 vezes em PBS-T e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente sob agitação leve, com reagentes do Kit ECL de revelação por quimioluminescência (Amershan, USA). Em seguida a membrana foi colocada em um cassete e revelada em um filme fotográfico (Kodak, USA).

As bandas relativas ao ER- β (~54 KDa) e tubulina (~55 KDa) encontradas em *Western Blotting* foram quantificadas por meio de unidades arbitrárias. As comparações foram feitas pela relação entre os animais tratados e seus respectivos controles (Programa de análise Image J).

Análise Estatística

Quanto às respostas das variáveis: concentração hormonal, concentração de proteína, número de neurônios e osmolalidade foram analisadas inicialmente através de histograma e gráfico de normalidade para observar o ajuste na distribuição normal. Confirmando este pressuposto, foi utilizada a metodologia de análise de variância (ANOVA), que se baseia em dividir a variância total de uma determinada resposta (variável dependente) em duas partes,: a primeira devida ao modelo de regressão (no caso, entre os grupos) e a segunda devida aos resíduos (erros) (dentro dos grupos). Quanto maior for a primeira em relação à segunda, maior é a evidência da diferença entre as médias dos grupos comparados (Montgomery, 2001).

Em concordância com o desenho experimental, as variáveis respostas foram analisadas através de ANOVA de 2 fatores (terapia hormonal e estado

alimentar) e expressas graficamente como médias $\pm$ erro padrão da média. Para as comparações entre as médias foram utilizados contrastes ortogonais baseados na distribuição *t* de *student*. O nível de significância adotado foi fixado em 5%. Estes procedimentos foram realizados através do *software* estatístico SAS® 9.0, utilizando a PROC ANOVA e a PROC GLM e sob orientação do CEMEQ (Centro de Métodos Quantitativos) FMRP-USP.

RESULTADOS

Protocolo experimental 1: Avaliação da expressão de FOS em neurônios vasopressinérgicos do PVN e SON em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo.

1.1) Osmolalidade

A osmolalidade plasmática dos animais realimentados com ração padrão tratados com estradiol ($312 \pm 1,5$) ou veículo ($313 \pm 1,9$) foi significativamente maior que a dos animais alimentados *ad libitum* ($303 \pm 1,7$) e ($303 \pm 1,6$), em jejum ($301 \pm 1,2$) e ($299 \pm 1,1$) ou realimentados com alimento sem sal ($305 \pm 1,8$) e ($305 \pm 1,2$) respectivamente, ($F_{3,160} = 26,29$ $p < 0.0001$). Porém, entre os animais realimentados não houve diferença significativa em função dos tratamentos (estradiol ou veículo). A figura 1 mostra a osmolalidade plasmática, expressa em mOsm/Kg e a figura 2 mostra a variação percentual da osmolalidade plasmática dos grupos experimentais.

Figura 1: Osmolalidade (mOsm/KgH₂O) nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação aos grupos *ad libitum*, jejum e realimentação sem sódio do mesmo tratamento. # $p < 0,05$ em relação ao grupo jejum dos animais tratados com veículo. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Figura 2: Variação percentual (%) da osmolalidade nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ em relação aos grupos *ad libitum*, jejum e realimentação sem sódio do mesmo tratamento. # $P < 0,05$ em relação ao grupo jejum dos animais tratados com veículo. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Os resultados mostraram aumento significativo na osmolalidade plasmática dos animais OVX realimentados tratados com estradiol ou veículo quando comparados aos animais OVX alimentados *ad libitum*, submetidos ao jejum ou realimentados com alimento sem sódio. A realimentação aumentou a osmolalidade. No entanto, não houve diferença entre os animais OVX tratados com estradiol ou veículo.

1.2) Dosagem hormonal de AVP plasmática por RIE

Analisando a figura 3, observamos um aumento na concentração plasmática de AVP dos animais OVX realimentados com ração padrão tratados com veículo ou estradiol (respectivamente $6,7 \pm 1,0$ e $6,1 \pm 0,6$ pg/ml) quando comparados aos animais dos grupos alimentado *ad libitum* (respectivamente $2,0 \pm 0,2$ e $2,0 \pm 0,2$ pg/ml), em jejum (respectivamente $2,1 \pm 0,2$ e $2,3 \pm 0,2$ pg/ml) e realimentado com alimento sem sódio (respectivamente $2,2 \pm 0,3$ e $1,9 \pm 0,5$ pg/ml) $F_{3,100}=43,73$, $p < 0.0001$. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos (veículo e estradiol).

Figura 3: Concentração plasmática de Vasopressina de ratas ovariectomizadas tratadas com veículo ou estradiol. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs. alimentado *ad libitum*, em jejum, realimentado com alimento sem sódio. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

1.3) Imunoistoquímica para AVP e FOS

a) Número de neurônios AVP

A figura 4 demonstra o número de neurônios AVP expressos no PVN e SON. No gráfico 4A, na porção magnocelular medial do PVN, observamos que os animais tratados com veículo e realimentados com ração padrão após jejum, tiveram um número maior de neurônios AVP ($59,6 \pm 6,7$) quando comparados aos animais *ad libitum* ($35,3 \pm 2,1$) ($p = 0.017$) do mesmo tratamento. No mesmo gráfico, verificamos ainda que no grupo dos animais tratados com estradiol, os animais realimentados com ração padrão tiveram o número maior de neurônios AVP ($63 \pm 7,3$) quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* ($38,8 \pm 2,9$) ou em jejum por 48 horas ($41,8 \pm 4,7$) ($F_{3,62} = 58,83$ $p = 0.724$).

Na porção PaML (figura 4B), nós observamos que os animais tratados com veículo e realimentados com ração padrão após jejum ($59,4 \pm 5,4$) e os realimentados com alimento sem sódio ($58,5 \pm 7,52$) tiveram um aumento no número de neurônios AVP quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* ($38,5 \pm 4,9$) $p < 0.05$. No grupo dos animais tratados com estradiol, observamos que os animais realimentados com ração padrão tiveram um aumento no número de neurônios AVP ($66,6 \pm 5,5$) comparados aos animais em jejum ($43,3 \pm 1,8$) $F_{3,60} = 4,19$, $p < 0.006$.

A figura 4C mostra que os animais tratados com veículo e realimentados com alimento sem sódio tiveram um aumento no número de neurônios AVP ($76,7 \pm 7,7$) quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* ($57,8 \pm 4,92$) ($p < 0.018$) do mesmo tratamento. Analisando os animais tratados com estradiol, notamos que os animais realimentados com ração padrão e os realimentados com alimento sem sódio tiveram um aumento no número de neurônios AVP (respectivamente $77,2 \pm 3,8$ e $80,4 \pm 3,5$) quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* ($55,4 \pm 3,1$) e em jejum ($55,1 \pm 4$) $F_{3,61} = 8,19$, $p < 0.005$. Não houve diferença entre os tratamentos, veículo e estradiol em nenhuma porção do PVN e no SON.

Figura 4: Número de neurônios vasopressinérgicos (AVP) nas porções (A) magnocelular medial - PaMM, (B) magnocelular lateral – PaML e (C) supraóptico – SON de animais ovariectomizados tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média±EPM. * vs grupo alimentado *ad libitum* do mesmo tratamento. # vs grupo em jejum por 48 horas do mesmo tratamento. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

b) Expressão da proteína FOS

Na figura 5 encontra-se expresso o número de neurônios imunorreativos a FOS nas porções PaMM, PaML do PVN e SON. Na porção PaMM (figura 5A) o número de FOS-ir nos animais OVX realimentados com ração padrão tratados com veículo ou estradiol (respectivamente $81,8 \pm 12,5$ e $72,1 \pm 16,4$) foi significativamente maior do que nos animais alimentados *ad libitum* (respectivamente $0,8 \pm 0,4$; $0,8 \pm 0,7$) e nos animais em jejum por 48 horas (respectivamente $0,5 \pm 0,2$ e $1,5 \pm 0,8$) $F_{3,62}=56,94$, $p<0.05$. Observamos ainda, que os animais tratados com veículo e realimentados com ração padrão tiveram um aumento na marcação de FOS ($81,8 \pm 12,5$) quando comparados aos animais realimentados com alimento sem sódio ($39,2 \pm 10,5$) do mesmo tratamento.

A figura 5B mostra que o número de neurônios FOS-ir na porção PaML do PVN de animais OVX realimentados com ração padrão tratados com veículo ou estradiol (respectivamente $76,9 \pm 11,7$ e $65,0 \pm 8,5$) é maior quando comparado aos animais alimentados *ad libitum* (respectivamente $0,7 \pm 0,4$ e $1 \pm 0,5$), em jejum (respectivamente $1,5 \pm 0,2$ e $2,3 \pm 1,5$) ou realimentados com alimento sem sódio (respectivamente $33,8 \pm 6,6$ e $30,4 \pm 5,2$) $F_{3,60}=58,17$, $p<0.05$. Nota-se também que nos animais realimentados com alimento sem sódio, tratados com veículo ou estradiol, a marcação neuronal para FOS (respectivamente $33,8 \pm 6,6$ e $30,4 \pm 5,2$) foi significativamente maior quando comparada à marcação dos animais *ad libitum* (respectivamente $0,7 \pm 0,4$ e $1 \pm 0,5$) e em jejum (respectivamente $1,5 \pm 0,2$ e $2,3 \pm 1,5$), respectivamente. Em ambas as porções do PVN, não houve diferença entre os tratamentos com veículo ou estradiol.

No SON (figura 5C) observamos o mesmo padrão de ativação. Os animais OVX realimentados com ração padrão, tratados com veículo ou estradiol tiveram um número maior de neurônios marcados para FOS (respectivamente $129,7 \pm 14,3$ e $98,4 \pm 11$) quando comparados aos animais dos grupos alimentado *ad libitum* (respectivamente $3,2 \pm 1,15$ e $2,2 \pm 1,7$), em jejum (respectivamente $4 \pm 0,8$ e $6,1 \pm 4,3$) ou realimentado com alimento sem sódio (respectivamente $76,6 \pm 15$ e $54,1 \pm 8,9$) $F_{3,61}=76,95$, $p<0.05$ respectivamente.

Também foi observado que os animais realimentados com alimento sem sódio dos dois tratamentos, veículo e estradiol, as marcações para FOS (respectivamente $76,6 \pm 15$ e $54,1 \pm 8,9$) foram significativamente maiores do que em animais alimentados *ad libitum* (respectivamente $3,2 \pm 1,15$ e $2,2 \pm 1,7$) ou em jejum (respectivamente $4 \pm 0,8$ e $6,1 \pm 4,3$), respectivamente. Semelhante ao PVN não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Figure 5: Número de neurônios imunorreativos a FOS nas porções (A) magnocelular medial (PaMM), (B) magnocelular lateral (PaML) e (C) supraóptico (SON) de animais ovariectomizados tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média±EPM. * vs grupo alimentado *ad libitum* e em jejum do mesmo tratamento. α vs. grupo realimentado com alimento sem sódio do mesmo tratamento. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

c) Expressão da proteína FOS em neurônios AVP (colocalização)

As figuras 6 e 7 mostram a dupla marcação para FOS e AVP em neurônios do PVN e SON. Essa colocalização foi nula ou próxima de zero nos animais dos grupos alimentado *ad libitum* e em jejum por 48 horas de ambos os tratamentos e em todas as regiões estudadas. Analisando a figura 6A observamos uma colocalização maior de FOS/AVP na porção PaMM do PVN dos animais OVX realimentados com ração padrão tratados com veículo ou estradiol (respectivamente $47,6 \pm 9,1$ e $41,7 \pm 8,46$) em comparação aos animais dos grupos alimentado *ad libitum* (respectivamente 0 ± 0 e 0 ± 0), em jejum (respectivamente $0,4 \pm 0,5$ e $1,6 \pm 1,3$) e realimentados com alimento sem sódio (respectivamente $12,2 \pm 4,7$ e $10 \pm 2,0$) $F_{3,62}=52,05$, $p<0.05$. Notamos também que os animais realimentados com alimento sem sódio tiveram uma ativação neuronal maior quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* ou em jejum. No entanto, não houve diferença entre os animais tratados com veículo ou estradiol.

A figura 6B mostra ativação neuronal na porção PaML do PVN. Observamos o mesmo padrão de marcação da porção PaMM, em que os animais OVX realimentados com ração padrão tratados com veículo ou estradiol tiveram uma maior marcação neuronal AVP/FOS ($54 \pm 6,2$ e $34 \pm 6,1$) quando comparados aos animais dos grupos alimentado *ad libitum* (respectivamente 0 ± 0 e 0 ± 0), em jejum (respectivamente $0,5 \pm 0,5$ e $1,0 \pm 1,0$) ou realimentados com alimento sem sódio (respectivamente $25,2 \pm 7,2$ e $16,5 \pm 4,1$) $F_{3,60}=40,83$, $p<0.05$. Observamos também que os animais realimentados com alimento sem sódio tiveram uma ativação neuronal maior quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* ou em jejum. Notamos que houve diferença significativa entre os tratamentos para os animais OVX realimentados com ração padrão em que os animais tratados com estradiol ($34 \pm 6,1$) tiveram uma menor ativação neuronal quando comparados aos animais tratados com veículo ($54 \pm 6,2$) $F_{1,60}=4,76$, $p0.03$.

No SON (figura 6C) a ativação neuronal foi semelhante ao PVN, em que os animais realimentados com ração padrão, tratados com veículo ou estradiol tiveram uma ativação neuronal maior (respectivamente, $65,7 \pm 5,6$ e $49,4 \pm 6,2$)

quando comparados aos animais dos grupos alimentado *ad libitum* (respectivamente 0 ± 0 e $0,71 \pm 0,7$), em jejum (respectivamente $2,4 \pm 0,9$ e $6,2 \pm 5,6$) ou realimentado com alimento sem sódio (respectivamente $35,7 \pm 6,5$ e $27,4 \pm 4,4$) $F_{3,61}=79,84$, $p<0.05$. Foi observada também diferença significativa entre os animais OVX realimentados com alimento sem sódio e os animais dos grupos alimentado *ad libitum* ou em jejum por 48 horas. No entanto, não foi observada diferença entre os tratamentos em nenhuma condição alimentar $F_{1,61}=3,13$, $p=0.059$.

Figure 6: Porcentagem de neurônios vasopressinérgicos (AVP) imunorreativos à proteína FOS nas porções (A) magnocelular medial (PaMM), (B) magnocelular lateral (PaML) e (C) supraóptico (SON) de animais ovariectomizados tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média ± EPM. * vs grupo alimentado *ad libitum* e em jejum do mesmo tratamento. α vs. grupo realimentado com alimento sem sódio do mesmo tratamento. & vs. grupo realimentado com ração padrão tratado com estradiol. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Figura 7: Fotomicrografias de secções coronais (14µm) mostrando neurônios AVP (verde) e FOS (vermelho) dos núcleos magnocelular medial (PaMM), magnocelular lateral (PaML) e núcleo supraóptico (SON) do hipotálamo de ratas OVX realimentadas com ração padrão ou alimento sem sódio tradadas com veículo ou estradiol. Imagens de A a F: animais realimentados com ração padrão. Imagens de G a M: animais realimentados com alimento sem sódio. Barra de escala: 100 µm.

Protocolo experimental 2: Avaliação do conteúdo protéico de $ER\beta$ nos núcleos PVN e SON do hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo.

a) Determinação do conteúdo protéico de $ER\beta$ no PVN e SON

A figura 8 mostra os resultados da análise semi-quantitativa por *western blotting*, com uma banda de aproximadamente 54 KDa equivalente ao peso molecular de $ER\beta$. A figura 8A demonstra a expressão protéica de $ER\beta$ no PVN que é maior nos animais realimentados com ração padrão tratados com veículo ($1,49 \pm 0,1$) ou estradiol ($1,29 \pm 0,1$) do que em animais dos grupos alimentado *ad libitum* (respectivamente $0,7 \pm 0,0$ e $0,8 \pm 0,0$), em jejum (respectivamente $0,9 \pm 0,0$ e $0,9 \pm 0,0$) ou realimentado com alimento sem sódio (respectivamente $0,8 \pm 0,1$ e $0,7 \pm 0,0$) $F_{3,64}=12,37$, $p<0.005$. No entanto, não houve diferença entre os grupos de animais tratados com veículo ou estradiol em nenhum estado alimentar.

No SON (figura 8B) não observamos diferença estatística significativa entre as situações alimentares nem em relação ao tratamento, com exceção do grupo dos animais tratados com veículo realimentados com alimento sem sódio ($1,01 \pm 0,1$), em que houve uma diminuição da expressão protéica em comparação com os animais alimentados *ad libitum* ($1,71 \pm 0,3$), em jejum ($1,9 \pm 0,2$) e realimentados com ração padrão ($1,9 \pm 0,5$) $F_{3,82}=4,17$, $p<0.005$, do mesmo tratamento. A diminuição foi significativa em comparação com o grupo de animais realimentados com alimento sem sódio tratados com estradiol ($2,0 \pm 0,1$) $F_{1,82}=4,17$, $p<0.005$.

Figura 8: Análise semi-quantitativa da expressão *ERβ* 54 (KDa) e β -tubulina (55 KDa) no PVN (A) e no SON (B) por *western blotting*. Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * vs. *ad libitum*, jejum, realimentado com alimento sem sódio. # vs. *ad libitum*, jejum, realimentado ração padrão do mesmo tratamento. α vs. grupo realimentado sem sódio tratado com estradiol. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Protocolo experimental 3: Avaliação da expressão de ER α e FOS nos núcleos OVLT, MnPO (porções dorsal e ventral) e SFO de ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ou veículo

a) Imunoistoquímica para ER α e FOS - OVLT

As figuras 9 e 10 mostram que a realimentação estimula a expressão de FOS no OVLT. Observamos um aumento na expressão de FOS (figura 9A) nos animais tratados com veículo ou estradiol realimentados com ração padrão (respectivamente $36,4 \pm 6,8$ e $46,8 \pm 5,4$) e nos animais realimentados com alimento sem sódio (respectivamente $42,6 \pm 7,9$ e $20,3 \pm 3,9$) em comparação aos animais alimentados *ad libitum* (respectivamente $7,5 \pm 1,4$ e $8 \pm 2,5$) ou em jejum (respectivamente $7,2 \pm 1,4$ e $9,4 \pm 0,8$), ($F_{3,40} = 38,09$, $p < 0.001$). Notamos que houve diferença significativa entre os tratamentos nos animais OVX realimentados com alimento sem sódio. Os animais tratados com estradiol tiveram uma ativação neuronal menor quando comparados aos animais realimentados com alimento sem sódio tratados com veículo ($F_{1,40} = 0,14$, $p < 0.001$). A figura 9B mostra que os animais do grupo em jejum tratados com veículo tiveram uma diminuição na expressão de ER α (0 ± 0) quando comparados aos animais dos grupos alimentado *ad libitum* ($13 \pm 2,8$), realimentado com ração padrão ($8 \pm 3,4$) e realimentado com alimento sem sódio ($8,2 \pm 3,5$) ($F_{3,41} = 6,06$, $p < 0.01$). Nos observamos também que o tratamento com estradiol diminui a expressão de ER α nessa região. Desta forma, os animais alimentados *ad libitum*, realimentados com ração padrão e realimentados com alimento sem sódio tratados com veículo tiveram uma expressão maior de ER α quando comparados aos mesmos grupos experimentais tratados com estradiol ($F_{1,41} = 45,15$, $p < 0.001$). Essa diferença estatística também foi observada em relação à dupla marcação para FOS/ER α .

Figura 9: Número de neurônios FOS-ir (A), receptor para estrógeno- tipo α (ER α) (B) e coexpressão de FOS/ER α (C) no OVLT de animais tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * vs grupo *ad libitum* e jejum. & vs grupo realimentado com ração padrão tratado com estradiol. # vs grupo jejum do mesmo tratamento. α vs grupo realimentado com alimento sem sódio tratado com estradiol. β vs grupo *ad libitum* tratado com estradiol. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Figure 10: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS, receptor para estrógeno- tipo α (ER α) e a colocalização FOS/ ER α em cortes coronais (20 μ m) do OVLT. A-F: animais *ad libitum*; G-M: animais em jejum por 48 horas; N-S: animais realimentados com ração padrão e T-W: animais realimentados com alimento sem sódio. Aumento de 20x. Barra de escala 100 μ m.

b) Imunoistoquímica para ER α e FOS – MnPO porção ventral

As figuras 11A e 12 mostram a expressão de FOS na porção ventral do MnPO. Observamos que expressão de FOS é maior nos grupos dos animais realimentados com ração padrão ($34,4 \pm 4,0$) e realimentados com alimento sem sódio ($32,1 \pm 4,7$) tratados com veículo que nos grupos realimentado *ad libitum* ($14,2 \pm 0,8$) e em jejum ($21 \pm 2,7$) do mesmo tratamento ($F_{3,42} = 5$, $p < 0.02$). Os animais tratados com estradiol não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes situações alimentares. No entanto, a expressão de FOS foi menor em animais tratados com estradiol realimentados com ração padrão ($21,4 \pm 3,2$) e realimentados com alimento sem sódio ($16,3 \pm 1,8$) em comparação com os respectivos grupos de animais tratados com veículo (respectivamente $34,4 \pm 4,0$; $32,1 \pm 4,7$) ($F_{1,42} = 9,51$, $p < 0.01$).

Os dados da figura 11B demonstram que a expressão de ER α dos animais tratados com veículo realimentados com ração padrão ($25,2 \pm 3,2$) foi significativamente maior que os e alimentados com alimento sem sódio ($13,5 \pm 3,6$; $F_{3,42} = 4,74$, $p < 0.05$) do mesmo tratamento. Também foi maior em comparação com os animais realimentados com ração padrão tratados com estradiol ($21,4 \pm 3,2$) ($F_{1,42} = 55,66$ $p < 0.0001$).

A figura 11C mostra que os animais do grupo realimentado com ração padrão tratado com veículo, tiveram um maior número de marcações duplas e FOS/ER α ($3,8 \pm 0,7$) quando comparados aos animais dos grupos em jejum ($1,4 \pm 0,7$) ou realimentado com alimento sem sódio ($2,3 \pm 0,4$) $F_{3,41} = 1,03$, $p < 0.05$ e também em comparação ao grupo realimentado com ração padrão tratado com estradiol (0 ± 0) ($F_{1,41} = 13,16$, $p < 0.0001$).

Figura 11: Número de neurônios FOS-ir (A), receptor para estrógeno- tipo α ER α (B) e coexpressão de FOS/ER α (C) na porção ventral do MnPO de animais tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * vs grupo *ad libitum* e jejum. & vs grupo realimentado com ração padrão tratado com estradiol. # vs grupo jejum do mesmo tratamento. α vs grupo realimentado com alimento sem sódio tratado com estradiol. β vs grupo alimentado *ad libitum* tratado com estradiol. \$ vs grupo realimentado com alimento sem sódio do mesmo tratamento. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Figure 12: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS, receptor para estrógeno- tipo α (ER α) e a colocalização FOS/ ER α em cortes coronais (20 μ m) da porção ventral do MnPO. A-F: animais alimentados *ad libitum*; G-M: animais em jejum por 48 horas; N-S: animais realimentados com ração padrão e T-W: animais realimentados com alimento sem sódio. Aumento de 10x. Barra de escala 100 μ m.

c) Imunoistoquímica para ER α e FOS – MnPO porção dorsal

As figuras 13A e 14 mostram a expressão de FOS na porção dorsal do MnPO. A expressão de FOS nos grupos de animais realimentados com ração padrão tratados com estradiol ($44 \pm 5,3$) ou veículo ($57 \pm 6,7$) foi maior em comparação aos animais alimentados *ad libitum* (respectivamente $17 \pm 2,4$; $9,8 \pm 2,8$) e jejum (respectivamente $20 \pm 5,1$; $30,2 \pm 7,3$) $F_{3,41} = 20,16$, $p < 0.05$.

Também foi observada diferença significativa entre os animais realimentados com alimento sem sódio ($25,8 \pm 2,2$) $F_{3,41} = 20,16$, $p < 0.0001$ quando comparados aos animais *ad libitum* ($9,8 \pm 2,8$) e realimentados com ração padrão ($57 \pm 6,7$) tratado com veículo. Não foi observada diferença entre os tratamentos com veículo ou estradiol.

A expressão de ER α na porção dorsal do MnPO (figura 13B) foi menor nos animais alimentados *ad libitum* ($14,6 \pm 4,2$) e realimentados com ração padrão ($3,6 \pm 1,3$) tratados com estradiol quando comparados aos animais nas mesmas situações alimentares tratados com veículo (respectivamente $27 \pm 8,9$ e $20 \pm 1,3$), $F_{1,41} = 14,28$, $p < 0.05$.

A figura 13C mostra a dupla marcação FOS/ER α na porção dorsal do MnPO. Essa colocação foi maior em animais tratados com veículo realimentados com ração padrão ($1,4 \pm 0,6$) e alimentados *ad libitum* ($0,8 \pm 0,3$) em comparação aos animais tratados com estradiol realimentados com ração padrão (0 ± 0) e alimentados *ad libitum* (0 ± 0) $F_{1,41} = 13,16$ $p < 0.05$.

Figura 13: Número de neurônios FOS-ir (A), receptor para estrógeno- tipo α (ER α) (B) e coexpressão de FOS/ER α (C) na porção dorsal do MnPO de animais tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * vs grupo alimentado *ad libitum* e em jejum. & vs grupo realimentado com ração padrão tratado com estradiol. # vs grupo em jejum do mesmo tratamento. α vs grupo realimentado com alimento sem sódio tratado com estradiol. β vs grupo alimentado *ad libitum* tratado com estradiol. \$ vs grupo realimentado com alimento sem sódio do mesmo tratamento. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Figure 14: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS, , receptor para estrógeno- tipo α (ER α) e a colocalização FOS/ ER α em cortes coronais (20 μ m) da porção dorsal do MnPO. A-F: animais alimentados *ad libitum*; G-M: animais em jejum por 48 horas; N-S: animais realimentados com ração padrão e T-W: animais realimentados com alimento sem sódio. Aumento de 10x. Barra de escala 100 μ m.

d) Imunoistoquímica para FOS – SFO

As figuras 15 e 16 mostram a expressão de FOS no SFO. Houve expressão maior de FOS no grupo dos animais realimentados com ração padrão tratados com veículo ($75,6 \pm 18$) em comparação aos grupos alimentado *ad libitum* ($6,86 \pm 1,4$), em jejum ($33 \pm 7,6$) ou realimentado com alimento sem sódio ($16,8 \pm 6,9$) $F_{3,45} = 11,05$, $p < 0.05$ do mesmo tratamento e também em comparação com o grupo realimentado com ração padrão tratado com estradiol ($39 \pm 11,9$) $F_{1,45} = 3,45$ $p < 0.009$. Nos animais tratados com estradiol, o grupo dos animais em jejum ($47,3 \pm 8,5$) teve expressão maior de FOS quando comparado ao grupo *ad libitum* ($10,5 \pm 2,6$) $F_{3,45} = 11,05$ $p < 0.009$.

Não foi observada marcação neuronal por imunoistoquímica para ER α no SFO em nenhuma situação alimentar em nenhum dos dois tratamentos.

Figura 15: Número de neurônios FOS-ir no SFO de animais tratados com veículo ou estradiol. Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * vs grupos alimentado *ad libitum* e em jejum. # vs grupo em jejum do mesmo tratamento. β vs grupo alimentado *ad libitum* tratado com estradiol. \$ vs grupo realimentado com alimento sem sódio do mesmo tratamento. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

Figure 16: Fotomicrografia ilustrando expressão de FOS em cortes coronais (20 μm) da região do SFO de animais tratados com veículo ou estradiol. Aumento de 10x. Barra de escala 100 μm .

DISCUSSÃO

As alterações osmóticas do líquido extracelular são detectadas por diferentes tipos de receptores, sensíveis às variações de osmolalidade e de concentração de sódio. O cloreto de sódio (NaCl), um dos constituinte do compartimento extracelular, e é um dos principais solutos na determinação da osmolalidade bem como do volume do líquido extracelular (Antunes-Rodrigues e cols., 2004). Quando alguma alteração é detectada no meio interno, mecanismos específicos são acionados para restabelecer a homeostase. No modelo experimental utilizado, observamos um aumento na osmolalidade dos animais tratados com veículo ou com estradiol e realimentados com ração padrão, quando comparados com os animais alimentados *ad libitum*, em jejum por 48 horas ou realimentados com alimento sem sódio. Observamos também que os animais tratados com veículo e realimentados com alimento sem sódio tiveram um aumento na osmolalidade plasmática quando comparados com os animais em jejum por 48 horas. Nesse grupo, a realimentação foi realizada sem sódio, assim o aumento da osmolalidade plasmática pode ser devido ao aumento de glicose plasmática, que sabidamente aumenta após a realimentação. A osmolalidade plasmática está relacionada com a concentração de sódio, de glicose e de uréia entre outros solutos (Kurokawa e Gordon, 1984).

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram aumento da osmolalidade plasmática após a realimentação ou a ingestão de sódio (Haupt cols., 1983; Burlet e cols., 1992; Gill e cols., 1995). O estrógeno não alterou a resposta ao estímulo osmótico, corroborando resultados anteriores. (Caligioni e Franci, 2002; Hartley e cols., 2004; Lucio-Oliveira e Franci, 2011).

Nós verificamos que a realimentação com ração padrão dos animais tratados com veículo ou estradiol induziu um aumento na secreção de AVP em comparação à alimentação *ad libitum*, ao jejum ou à realimentação com alimento sem sódio. AVP e a OT são secretadas em resposta à hiperosmolalidade e à hipovolemia (Balment e cols., 1980; Stricker e Verbalis, 1986; Haanwinckel e cols., 1995; Ruginsk e cols., 2007; Vilhena-Franco e cols., 2011) e essas secreções estão sujeita à modulação por vários fatores circulantes, entre os quais, os hormônios esteróides gonadais, como o estradiol (Hartley e cols., 2004; Somponpun, 2007; Curtis, 2009).

Alguns estudos indicam que o estradiol interfere no controle da secreção de AVP (Swenson e Sladek, 1997; Hartley e cols., 2004, Curtis, 2009). No entanto, não foi observada diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de AVP dos animais realimentados com ração padrão após jejum tratados com estradiol ou com veículo. Os dados da literatura em relação aos efeitos do estrógeno sobre a secreção de AVP são controversos. Peysner e Forsling (1990) verificaram uma diminuição na secreção de AVP de ratas castradas em comparação às ratas intactas e um efeito dose-dependente em relação à reposição com estrógeno. Em animais intactos, o tratamento com estradiol intensifica a concentração plasmática de AVP em resposta ao estímulo osmótico (Barron e cols., 1986). Outros trabalhos não observaram alterações na concentração plasmática de AVP durante o ciclo estral de ratas (Crofton e cols., 1985) ou observaram um aumento das concentrações plasmáticas de AVP durante o proestro em relação ao diestro (Skowsky e cols., 1979). Em estudos com ratas OVX, a secreção de AVP (Hartley e cols., 2004) e expressão de RNAm para AVP (Crowley e cols., 1993) diminuem em resposta ao estímulo osmótico. Essa redução é revertida pelo tratamento com esteróides gonadais. Estudos *in vitro* mostraram que a liberação de AVP pelo sistema hipotálamo-neuro-hipofisário em resposta ao estímulo osmótico não foi alterada pelo tratamento prévio com estradiol (Swenson e Sladek, 1997). Assim, no modelo de realimentação que utilizamos neste trabalho, a concentração plasmática de AVP não foi susceptível à ação do estradiol.

Nossos resultados também demonstraram que um aumento de aproximadamente 4% na osmolalidade plasmática, induzido pela realimentação com ração padrão, foi suficiente para ativar neurônios vasopressinérgicos do PVN e SON. O PVN é um local de integração para elaboração de respostas comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas a diferentes estímulos as quais são mediadas por núcleos distintos organizados intrinsecamente (Swanson e Sawchenko, 1983).

As fotomicrografias das porções magnocelulares medial e lateral do PVN bem como o SON de animais OVX mostram que, de uma forma geral, a realimentação com ração padrão ou com alimento sem sódio aumenta o número de neurônios vasopressinérgicos em comparação à alimentação *ad*

libitum ou ao jejum por 48 horas. Isso pode ser devido ao próprio processo de realimentação, que anteciparia uma resposta ao aumento de osmolalidade, aumentando a expressão do número desses neurônios para uma maior liberação do peptídeo. Experimentos em animais e humanos demonstraram que há osmoreceptores periféricos em regiões relacionadas com alimentação e em vasos que recebem solutos absorvidos pelo intestino, como receptores localizados na cavidade orofaríngea (Kuramochi e Kobayashi, 2000), no trato gastrointestinal (Carlson e cols., 1997) e na veia porta hepática (Baertschi e Vallet, 1981). Estes osmoreceptores podem enviar informações sobre a carga osmótica dos alimentos ingeridos através de aferências para o SNC e induzir respostas antecipatórias para ajudar no restabelecimento de possíveis perturbações osmóticas (Haberich, 1968; Bourque, 2008).

Avaliamos também a ativação neuronal através da expressão de FOS. Esse tipo de estudo, tem sido utilizado de forma confiável para avaliar a atividade no cérebro (Naimi e cols., 1997; Timofeeva e cols., 2002; Hoffman e Lyo, 2002). Os neurônios OT e AVP são sensíveis a mudanças da osmolalidade plasmática e expressam FOS em resposta ao aumento da osmolalidade (Somponpun e Sladek, 2003; Ruginsk e cols., 2007).

Animais em jejum por 48 horas não apresentaram expressão de FOS nos núcleos estudados, em nenhum dos tratamentos (veículo ou estradiol), como era o esperado. Anteriormente, outros autores demonstram que o jejum por 24 horas não induziu expressão de FOS no PVN e SON (Timofeeva e cols., 2002). No entanto, nós verificamos um aumento na expressão da proteína FOS no PVN e SON de animais OVX submetidos à realimentação com ração padrão e, em menor intensidade à realimentação com alimento sem sódio. Não foi observada diferença entre os tratamentos (veículo e estradiol) em nenhum dos núcleos estudados.

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. Durante a alimentação, ações da AVP contribuem para a regulação do balanço de água, modificação na pressão sanguínea e o término da ingestão alimentar (Pittman e cols., 1982; Palkovits, 1984; Langhans e cols., 1991).

A ingestão alimentar ativa regiões no SNC relacionadas com o processo de gustação, balanço de líquidos corporais, controle simpático e parassimpático, os quais incluem o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo parabraquial (PB), núcleo central da amígdala (CeA), núcleo arqueado (ARC), PVN, SON e órgãos circunventriculares. Regiões, estas que expressam FOS em resposta à alimentação (Fraser e Davison, 1993; Frase e cols., 1995; Naimi e cols, 1997; Timofeeva e cols., 2002; Pecoraro e Dallman, 2005).

Não podemos descartar também uma possível ativação neuronal pela distensão gástrica. A distensão do estômago em ratos ativa mecanorreceptores vagais que enviam sinais excitatórios para a área postrema e para o núcleo do trato solitário, de onde projeções são enviadas para áreas específicas do SNC, envolvidas com o controle do comportamento alimentar, como o núcleo hipotalâmico dorsomedial, divisões parvocelular e magnocelular do PVN e amígdala central (Ricardo e Koh, 1978; Rinaman e cols., 1998).

A realimentação aumenta a expressão de FOS em núcleos como PVN, SON, NTS e AP (Timofeeva e cols., 2002). No entanto, sabe-se que os neurônios do NTS ativados pela distensão gástrica projetam-se principalmente para a porção parvocelular do PVN, ao passo que a ativação da divisão magnocelular é devida a estímulos orofaríngeos, osmorreceptores ou de órgãos circunventriculares como o SFO (Starbuck e cols., 2002; Timofeeva e cols., 2005). Outros pesquisadores mostraram que a distensão gástrica pode estimular mecanismos de saciedade e provocar um aumento discreto na secreção de OT em ratos (McCann e cols., 1988), bem como a ativação de neurônios ocitocinérgicos no hipotálamo (Reanud e cols., 1987). No entanto, a ativação de neurônios vasopressinérgicos também pode ser devida ao aumento da osmolalidade induzido pela realimentação, ajudando assim a elaborar uma resposta mais adequada ao desafio osmótico.

Assim, uma de nossas hipóteses era que o tratamento com estradiol pudesse modular a ativação dos neurônios vasopressinérgicos em resposta ao aumento da osmolalidade induzida pela realimentação com ração padrão, alterando assim a resposta. Essa modulação foi observada anteriormente em neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON. Animais OVX tratados com estradiol, realimentados com ração padrão tiveram uma ativação menor de neurônios

ocitocinérgicos em comparação aos animais tratados com veículo (Lucio-Oliveira e Franci, 2011).

Neste estudo, o tratamento com estradiol em ratas ovariectomizadas reduziu a ativação dos neurônios vasopressinérgicos em comparação ao tratamento com veículo, somente no núcleo lateral do PVN. Assim, o estradiol parece inibir a ativação dos neurônios vasopressinérgicos nesse núcleo, frente ao estímulo osmótico neste modelo experimental.

Há trabalhos demonstrando que estrógeno poderia inibir a liberação de AVP através de ER- β (Skowsky e cols., 1979, Skott, 2004). Isto poderia ter ocorrido no núcleo lateral do PVN, em nosso experimento. A presença de ER- β em neurônios AVP está bem estabelecida na literatura (Simonian e Herbison, 1997; Shughrue e cols., 1996; Alves e cols., 1998; Hrabovszky e cols., 1998; Laflame e cols., 1998; Somponpun e Sladek, 2003; Hrabovszky e cols., 2004; Suzuki & Handa, 2005), indicando que o estradiol possa ter ação direta sobre esses neurônios. Um estudo com imunofluorescência em nosso laboratório, demonstrou que cerca de 60% de neurônios do SON são imunorreativos ao ER- β (Caligioni, 2005) e outros pesquisadores demonstraram a presença da proteína e RNAm para ER- β no SON (Laflame e cols., 1998; Hrabovszky e cols., 2004).

Os dados obtidos nesse trabalho demonstraram que a realimentação com ração padrão, induzindo aumento da osmolalidade, foi eficiente para aumentar a expressão protéica de ER- β no PVN em comparação aos animais alimentados *ad libitum*, em jejum ou realimentados com alimento sem sódio. Não foi observada diferença no SON, com exceção do grupo de animais realimentados com alimento sem sódio. 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 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., 2001). Em nosso modelo experimental, diferentemente do estudo de Somponpun e Sladek (2003), o aumento da osmolalidade causado pela realimentação foi eficiente em aumentar a expressão de ER- β no PVN.

Também podemos dizer que essa expressão de ER- β no PVN não é regulada pelo estradiol diante o estímulo osmótico, já que não foi observada diferença entre os tratamentos. Isso também foi observado no estudo de Somponpun e Sladek, em que as mudanças induzidas pela desidratação na expressão de ER- β em neurônios magnocelulares não foram correlacionadas com a testosterona e estrógeno plasmático. Assim, a expressão de ER- β em neurônios magnocelulares parece ser regulada principalmente por mudanças osmóticas e não esteróides circulantes.

Há relato de que em ratas castradas, o tratamento com estrógeno diminui a expressão de ER- β no PVN (Suzuki e Handa, 2004). Outro estudo não verificou variação na expressão de ER- β dependente da concentração de esteróides gonadais circulantes (Greco e cols., 2001). Nossos resultados corroboram esse dado, pois o estradiol não interferiu no aumento da expressão dos receptores, já que não houve diferença entre os tratamentos. Assim, podemos inferir que em nosso modelo experimental, os neurônios vasopressinérgicos respondem ao aumento da osmolalidade e os receptores de estrógeno presentes nesses neurônios não interferem na resposta.

Os órgãos circunventriculares também participam da regulação do ER β . Tanto o OVLT como o SFO contêm neurônios osmorreceptivos e neurônios que expressam receptores de estrógeno enviando projeções diretas para o SON e PVN, bem como projeções indiretas via MnPO (Bourque e cols., 1994; Voisin e cols., 1997; Somponpun e cols., 2004). 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., 2004). A implicação dos órgãos circunventriculares no monitoramento da elevação da osmolalidade plasmática após desafio hiperosmótico ou após a alimentação tem sido sugerida (Oliet e Bourque, 1993; Starbuck e cols., 2002).

Nosso estudo verificou a expressão de FOS no OVLT, SFO e nas porções dorsal e ventral do MnPO dos animais OVX tratados com estradiol ou veículo. Foi observado um aumento na expressão de FOS nessas estruturas dos animais realimentados com ração padrão em comparação aos animais *ad libitum*, jejum e realimentados com alimento sem sal. Esses resultados estão de acordo com trabalhos mostrando que os órgãos circunventriculares respondem ao aumento da osmolalidade (Starbuck e cols., 2002; Hiyama e cols., 2004).

Também foi observado um aumento da expressão de FOS no OVLT e na porção ventral do MnPO dos animais realimentados com alimento sem sódio tratados com veículo em comparação aos animais alimentados *ad libitum* ou em jejum por 48 horas. Como descrito anteriormente, os animais realimentados com alimento sem sódio não tiveram aumento de osmolalidade. Portanto, o aumento da expressão de FOS não seria atribuído à variação de osmolalidade. Provavelmente, regiões relacionadas com a ingestão alimentar enviariam informações a serem integradas nesses núcleos para a elaboração de uma resposta diante de um eventual estímulo osmótico. Seria uma ação antecipatória. Experimentos de transecções de fibras da lâmina terminal relevam a importância do grupo celular dessa região para ativação de neurônios magnocelulares do PVN e SON durante a realimentação, não excluindo a possibilidade de um envolvimento indireto do nervo vago nessa ativação (Timofeeva e cols., 2005). Trabalhos demonstram projeções do NTS para o SFO (Zardetto-Smith e Gray, 1987; Tanaka e Hayashi, 1997) e também não se pode descartar um envolvimento indireto do NTS para os neurônios magnocelulares. No entanto, a expressão de FOS no SFO em resposta à hiperosmolalidade não foi alterada após a vagotomia bilateral (Starbuck e cols., 2002). Portanto, se existe interação entre o nervo vago e a lâmina terminal, o mecanismo pela qual ocorre ainda é desconhecido (Timofeeva e cols., 2005).

O tratamento com estradiol interferiu na expressão de FOS após a realimentação com ração padrão somente na porção ventral do MnPO e no SFO, onde a expressão de FOS foi menor em comparação aos animais tratados com veículo. Os neurônios dessas regiões certamente são regulados pelo estradiol, modulando assim sua resposta frente ao estímulo osmótico.

Adicionalmente, não podemos descartar a possível regulação indireta de estradiol nos neurônios AVP por via ER α , o qual é expresso em neurônios localizados no OVLT, MnPO e SFO de onde partem projeções para o SON (Voisin e cols., 1997; Sladek e Somponpon, 2004; Somponpun e cols., 2004). Dessa forma o ER α poderia ter ação moduladora da regulação osmótica da secreção de AVP e de OT, e o efeito inibitório do estrógeno sobre a secreção de AVP em resposta ao estímulo osmótico seria possivelmente mediado por esse receptor (Sladek e Somponpon, 2008; Grassi e cols., 2010).

Nós também realizamos o estudo da expressão de ER α no OVLT e nas porções dorsal e ventral do MnPO. Os resultados mostraram, que o estradiol diminuiu a expressão de ER α em todos os núcleos estudados e essa redução foi independente da alteração na osmolalidade, visto que também ocorreu nos grupos alimentado *ad libitum* ou em jejum. Sabe-se que a expressão de ER α no OVLT, no MnPO e no SFO aumenta em resposta à hiperosmolalidade crônica (Somponpun e cols., 2004). No entanto, em nosso modelo experimental, o estradiol aparentemente teve uma resposta mais potente na regulação para baixo (*downregulation*) do receptor do que o estímulo osmótico.

Há trabalhos mostrando que o estrógeno pode exercer um efeito inibitório na expressão tanto de ER α (Simerly e Young, 1991; Yamada e cols., 2009; Lauber e cols., 2011) como de ER β (Suzuki e Handa, 2004) e a castração aumenta o RNAm de ER α (DeVries e cols., 1985; Handa e cols., 1996). Assim, podemos inferir que a realimentação não é responsável pela diminuição de ER α nesses núcleos e sim o tratamento com estradiol.

A diminuição da ativação dos neurônios, na porção lateral do PVN dos animais tratados com estradiol realimentados com ração padrão, não estaria associada com a expressão de ER α nos órgãos circunventriculares.

A presença de esteróides gonadais certamente não elimina o controle da liberação de AVP, mas poderia modulá-lo. A diferença na expressão dos receptores de estrógeno pode estar relacionada com a concentração disponível do ligante, sua sensibilidade, ao gênero e a região estudada, refletindo nos diferentes efeitos do estrógeno e da testosterona em cada região para regulação da secreção de AVP. Ratos adultos e humanos liberam OT e AVP em resposta ao estímulo osmótico mesmo na presença de estrógeno ou testosterona circulantes. Mudanças na expressão do receptor poderiam alterar

a responsividade das células-alvos e determinar a circunstância fisiológica na qual os esteróides gonadais tornam-se agentes 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 não foi observada em nosso modelo experimental *in vivo*.

Existem várias vias osmorregulatórias com aferências para o SON e PVN, que fornecem informações sobre outros parâmetros fisiológicos como pressão sangüínea e volume. 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.

Há várias questões ainda sobre o sistema complexo que regula a síntese e a secreção de AVP. Os receptores de estrógeno são candidatos fortes para participar dessa regulação. No entanto o significado fisiológico da expressão de ER β nos neurônios magnocelulares continua sendo uma questão importante. Vários outros fatores podem regular de forma direta ou indireta o sistema vasopressinérgico. Neurônios AVP e OT podem responder de forma diferente ao estímulo osmótico, isso pode ser devido às diferenças de propriedades na membrana e nas sinapses e de modulação nos estágios reprodutivos.

CONCLUSÃO

O presente estudo visou pesquisar o efeito do estradiol nos neurônios AVP, em resposta ao aumento da osmolalidade devido à realimentação.

Observamos que ratas ovariectomizadas tratadas com veículo ou estradiol não apresentaram diferença na ativação dos neurônios AVP do PVN e SON, com exceção do núcleo lateral bem como na concentração plasmática de AVP.

O tratamento com estradiol não alterou o conteúdo de ER β no PVN e SON nos grupos de animais realimentados. Observamos apenas uma alteração dessa expressão pelo aumento da osmolalidade.

No estudo da expressão de ER α nos órgãos circunventriculares, o estradiol eliminou a possível regulação do sistema vasopressinérgico por esses receptores.

Portanto, os hormônios ovarianos aparentemente não participam da resposta ao estímulo osmótico causado pela realimentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GHOUL, WM; 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 Research. Molecular Brain Research*, 44: 262-272, 1997.

ALVES, S.E; LOPES, U; McEWEN, B.S.; WEILSND, 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. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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. *Advance in Experimental Medicine and Biology*, 395: 23-25, 1995.

ANTUNES-RODRIGUES, J; PICANÇO-DINIZ, D.L.W; VALENÇA, M.M; MCCANN, S.M. Controle Neuroendócrinos da Homeostase dos Flúidos Corporais. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2005.

ANTUNES-RODRIGUES, J; CASTRO M; ELIAS L.L.K, VALENÇA M.M; MSCANN S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews*, 84: 169-208, 2004.

ARIMA, H; KONDO, K; MMURASE, T; YOKOI, H; IWASAKI, Y; SAITO, H; OISO, Y. Regulation of vasopressin synthesis and release by área postrema in rats. *Endocrinology*, 139: 1481-1486, 1998.

BAERTSCHI, A.J; VALLET, P.G. Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. *The Journal of Physiology*, 315: 217-230, 1981.

BAI, G; KUSIAK, J.W. Cloning and analysis of the flanking sequence of the rat N-methyl-D-aspartate receptor I (NMDAR) gene. *Biochimica et Biophysica 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. *The Journal of Physiology*, 308: 439-449, 1980.

BARRON, W.M; SCHREIBER, J; LINDHEIMER, M.D. Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *The American Journal of Physiology*, 13: 352-361, 1986.

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

BOURQUE, C.W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation *Nature reviews- Neuroscience*, 9: 519-531, 2008.

BOURQUE, C.W; OLIET S.H; RICHARD D. Osmoreceptors, osmoreception and osmoregulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15: 231-274, 1994.

BOURQUE, C.W; OLIET S.H.R. Osmorreceptors in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*, 59: 601-619, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

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

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 Science*, 24: 2822-2831, 2002.

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, 2005.

CARLSON, S.H; BEITZ, A; OSBORN, J.W. Intragastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *The American Journal of Physiology*. 272: R750-758, 1997.

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

CROFTON, J.T; BAER, P.G; SAHRE, L; BROOKS, D.P. Vasopressin release in male and female rats: Effects os gonadectomy and treatment with gonadal steroid hormones. *Endocrinology*, 117: 1195-1200, 1985.

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

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

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

DALE, H.H. On some physiological actions of ergot. *The Journal of Physiology*, 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 neuros during dehydration. *Neuroscience*, 78: 191-202, 1997.

DEVRIES, G.J; BUIJS, R.M; VAN LEEUWEN, F.W; CAFFÉ, A.R; SWAAB, D.F. The vasopressin innervation of the brain in normal and castrated rats. *The Journal of comparative neurology*, 233: 236-254, 1985.

DU VIGNEAUD, V. Oxytocin, the principal oxytocic hormone of the posterior pituitary gland: its isolation, structure, and synthesis. *Experientia*, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 205: 949-957, 1953.

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

FRASER, K.A; DAVISON, J.S. Meal-induced c-fos expression in brain stem is not dependent on cholecystokinin release. *The American Journal of Physiology*, 265: R235–R239, 1993.

FRASER, K.A; RAIZADA, E; DAVISON, J.S. Oral-pharyngeal-esophageal and gastric cues contribute to meal-induced c-fos expression. *The American Journal of Physiology*, 37: R223–R230, 1995.

GILL, G.V; BAYLIS, P.H; DAVISON, S.J. Changes in plasma solutes after food. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 78: 1009-1013, 1995.

GRASSI, D; AMORIM, M.A; GARCIA-SEGURA, L.M; PANZICA, G. Estrogen receptor alpha is involved in the estrogenic regulation of arginine vasopressin immunoreactivity in the supraoptic and paraventricular nucleio f ovariectomized rats. *Neuroscience Letters*, 474: 135-139, 2010.

GRECO, B; ALLEGRETTO, E.A; TETEL, M.J; BLAUSTEIN, J.D. Coexpression of ER β with ER α and progestin 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: 134-139, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 11704-11709, 1997.

HAANWINCKEL, M.A; ELIAS, L.K; FAVARETTO, A.L.V; GUTKOWSKA, J; MCCANN, S.M; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92: 7902-7906, 1995.

HABERICH F.J. Osmoreception in the portal circulation. *Federation Proceeding*, 27: 1137-1141, 1968.

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 Reserch*, 572: 42-51, 1992.

HANDA, R.J; KERR, J.E; DONCARLOS, L.L; MCGIVERN, R.F; HEJNA, G. Hormonal regulation of androgen receptor Messenger RNA in the medial preptic área of the male rat. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 39: 57-67, 1996.

HARTLEY, D.E; DICKSON, S.L; FORSLING, M.L. Plasma vasopressin concentrations and Fos protein expression in the supraoptic nucleus following osmotic stimulation or hipovolaemia in ovariectomized rat: effe of estradiol replacemente. *Journal of Neuroendocrinology*, 16: 191-197, 2004.

HATTON, G.I; HUTTON, U.E; HOBLITZELL, E.R; ARMSTRONG, W.E. Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the paraventricular nucleus. *Brain Research*, 108: 187-193, 1976.

HOFFMAN, G.E; LYO, D. Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? *Journal of Neuroendocrinology*, 14: 259–268, 2002.

HOUP, K.A; BALDWIN, B.A; HOUP, T.R; HILLS, F. Humoral and cardiovascular responses to feeding in pigs. *The American Journal of Physiology*, 244: R279-R284, 1983.

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. *The Journal of Comparative Neurology*, 473: 315-333, 2004.

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.

HIYAMA, T.Y; WATANABE, E; OKADO, H.E; NODA, M. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior. *The Journal of Neuroscience*, 24: 9276-9281, 2004.

KIMURA, T; MINAI, K; MATSUI, K; MOURI, T; SATO, T; YOSHINAGA, K; HOSHI, T. Effect of various states of hydration on plasma ADH and rennin in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 42: 79-87, 1976.

KLUSMANN, E; MARIC, K; ROSENTHAL, W. The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 141: 33-95, 2000.

KUIPER, G.G; ENMARK, E; PELTO-HUIKKO, M; NILSSON, S; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 5925-5930, 1996.

KURAMOSHI, G.E; KOBAYASHI, I. Regulation of the urine concentration mechanism by the oropharyngeal afferent pathway in man. *American Journal of nephrology*, 20: 42-47, 2000.

KUROKAWA, K. E; GORDON, E.M. Abnormalities of sodium and water metabolism in The Kidney Diagnosis and Management. Chapter 7, pages: 97-98, *A Wiley Medical Publication, New York*, 1984.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.

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

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

LAUBER, A.H; MOBBS, C.V; MURAMATSU, M; PFAFF, D.W. Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology*, 129: 3180-3186, 2011.

LUCIO-OLIVEIRA, F; FRANCI, C.R. Effect of the interaction between food state and the action of oestrogen on oxytocinergic system activity. *The Journal of Endocrinology*, 212: 129-138, 2011.

LUDWIG, M; CALLAHAN, M.F; LANDGRAF, R; JOHNSON, A.K; MORRIS, M. Neural inputs modulate osmotically stimulated release of vasopressin into the supraoptic nucleus. *The American Journal of Physiology*, 270: 787-792, 1996.

MCCANN, M.J; VERBALIS, J.G; STRICKER, E.M. Capsaicin pretreatment attenuates multiple responses to cholecystokinin in rats. *Journal of the Autonomic nervous system*, 23: 265-272, 1988.

MCCANN, S.M; GUTKOWSKA, J; FRANCI, C.R; FAVARETTO, A.L; ANTUNES-RODRIGUES, J. Hypothalamic control of water and salt intake and excretion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 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. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 1575-1579, 1984.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, Chapter 3 5^a edição, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 2001.

MORRIS, M; ROCHA, M.J; SIM, L.J; JOHNSON, A.K; CALLAHAN, M.F; Dissociation between vasopressin and oxytocin mRNA and peptide secretion after AV3V lesions. *The American Journal of Physiology*, 267: R1640-R1645, 1994.

NAIMI, N; RIVEST, S; RICOTTA, I; RICHARD, D. Neuronal activation of the hypothalamus magnocellular system in response to oropharyngeal stimuli in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 9: 329-340, 1997.

NIERMANN, H; AMIRY-MOGHADDAM, M; HOLTHOFF, K; WHITE, O.W; OTTERSEN, O.P. A novel role of vasopressin in the brain: modulation of activity-dependent water flux in the neocortex. *Journal of Neuroscience*, 21: 3045-3051, 2001.

OLIET, S.H; BOURQUE, C.W. Mechanosensitive channels transducer osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*, 22: 364: 341-343, 1993.

OSHEROFF, P.L; PHILLIPS, H.S. Autoradiographic localization of relaxin binding sites in the rat. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 6413-6417, 1991.

OTT, I; SCOTT, J.C. The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 8: 48-49, 1910.

PALKOVITS, M. Role of the central nervous system neuropeptides in body fluid homeostasis. *The Journal of Physiology*, 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. *The FASEB Journal*. 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.

PECORARO, N; DALLMAN, M.F. c-Fos after incentive shifts: expectancy, incredulity, and recovery. *Behavioral Neuroscience*, 119: 366-387, 2005.

PEYSNER, K; FORSLING, M.L. Effect of ovariectomy and treatment with ovarian steroids on vasopressin release and fluid balance in the rat. *Journal of Endocrinology*, 124: 277-284 1990.

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. *The Journal of Comparative Neurology*, 151: 121-158, 1973.

PURYEAR, R; RIGATO, K.V; AMICO, J.A; MORRIS, M. Enhanced salt intake in oxytocin deficient mice. *Experimental Neurology*, 171: 323-328, 2001.

RENAUD, L.P; TANG, M; MCCANN, M.J; STRICKER, E.M; VERBALIS, J.G. Cholecystokinin and gastric distension activate oxytocinergic cells in rat hypothalamus. *American Journal of Physiology*, 253: R661-R665, 1987.

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.

RICARDO, J.A; KOH, E.T. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala and other forebrain structures in the rat. *Brain Research*, 153: 1 – 53, 1978.

RINAMAN, L; BAKER, E.A; HOFFMAN, G.E; STRICKER, E.M; VERBALIS, J.G. Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *American Journal of Physiology*, 275: R262-268, 1988.

RUGINSKY, S.G; OLIVEIRA, F.R; MARGATHO, L.O; VIVAS, L; ELIAS, L.L.K; ANTUNES-RODRIGUES, J. Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. *Experimental Neurology*, 206: 192 – 200, 2007.

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. *The Journal of Endocrinology*, 121: 109-115, 1989.

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

SHARE, L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiological Review*, 68: 1248-1284, 1988.

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

SIMERLY, R.B; YOUNG, B.J. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Neuroscience Letters*, 463: 135–139, 1991.

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

SKOTT, O. Estrogen receptors and central osmotic regulation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286: 445, 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; SOMPONPUN, S.J. Oestrogen receptor beta: role in neurohypophyseal neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, 16: 365-371, 2004.

SLADEK, C.D; KNIGGE, K.M. Osmotic control of vasopressin release by rat hypothalamo-neurohypophyseal explants in organ culture. *Endocrinology*, 6: 1834 -1838, 1977.

SLADEK, C.D; SOMPONPUN, S.J. Estrogen receptor: Theirs roles in regulation of vasopressin release for maintenance of fluid and electrolyte homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29: 114 – 27, 2008.

SMITH, D.W; DAY, T.A. Catecholamine and oxytocin cells respond to hypovolaemia as well as hypotension. *Neuroreport*, 14: 1493-1495, 2003.

SOMPONPUM, S.J; JOHNSON, A.K; BELTZ, T; SLADEK, C.D. Osmotic regulation of estrogen receptor- β expression in magnocellular vasopressin neurons requires lamina terminalis. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286: 465-473, 2004.

SOMPONPUN, J.S. Neuroendocrine regulation of fluid and electrolyte balance by ovarian steroids: contributions from central oestrogen receptors. *Journal of Neuroendocrinology*, 19: 809-818, 2007.

SOMPONPUN, S; SLADEK, C. Osmotic regulation of estrogen receptor- β in rat vasopressin and oxytocin Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23: 4261-4269, 2003.

SOMPUNPUN, 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; WILSON, W.L; FITTS, D.A. Fos-like immunoreactivity and thirst following hyperosmotic loading in rats with subdiaphragmatic vagotomy. *Brain Reserch*, 931, 159–167, 2002.

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

STRICKER, E.M; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regulatory Peptides*, 66: 83-85, 1996.

STRICKER, E.M; VERBALIS, J.G. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *The American Journal of Physiology*, 250: 267-275, 1986.

STUMPF, W.E. Estrogen-neurons and estrogen systems in the periventricular brain. *The American Journal of Anatomy*, 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. *The Journal of Comparative Neurology*, 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.

SWANSON, L.W. Brain Maps. Structure of the Rat Brain, 1992.

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

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. *Journal of Neuroendocrinology*, 10: 679-685, 1998.

SWENSON, K.L; SLADEK, C.D. Gonadal steroid modulation of vasopressin secretion in response to osmotic stimulation. *Endocrinology*, 138: 2089-2097, 1997.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E; SOBOCINSKA, J; SADOWISK, B. Central dipsogenic effect of vasopressin. *The American Journal of Physiology*, 242: 372-379, 1982.

TANAKA, J; HAYASHI Y; SHIMAMUNE, S; NOMURA, M. Ascending pathways from the nucleus of solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Research*, 777: 237-241, 1997.

TIMOFEEVA, E; BARABOI, E.D; RICHARD, D. Contribution of the vagus nerve and lamina terminalis to brain activation induced by refeeding. *The European Journal of 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. *The European Journal of Neuroscience*, 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: 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 and Tissue Research*, 180: 443-452, 1977.

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

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

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.

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.

YAMADA, S; NOGUCHI, D; ITO, H; YAMANOUCHI, K. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain *Neuroscience Letters*, 463: 135-139, 2009.

YAMAMOTO, T; SASAKI, S; FUSHIMI, K; ISHIBASHI, K; YAOITA, E; KAWASAKI, K; MARUMO, F; KIAHARA, I. Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. *American Journal of Physiology: Renal Fluid Electrolyte Physiology*, 268: 1546-1551, 1995.

ZARDETTO-SMITH, A.M; GRAY, T.S. A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Neuroscience Letters*, 80: 163–166, 1987.

**Interaction between estrogen and food state
on activity of the vasopressinergic system**

Lucio-Oliveira, F; Franci, CR*

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto

University of São Paulo, SP, Brazil

Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto - SP, Brazil

Short title: **food state, oestrogen and vasopressinergic system**

*** Corresponding author:**

Celso Rodrigues Franci

Phone number: +55-16 36023022

Fax number: +55-16 36330017

Email address: crfranci@fmrp.usp.br

Key words: vasopressin, estrogen, osmolality, fasting, refeeding

Abstract

The hydroelectrolyte homeostasis is controlled by signals from the total volume of body fluid and the concentration of ions. The changes in osmolality are detected by receptors in various regions of the central nervous system, including circumventricular organs (CVOs). Conformational changes of these cells activate oxytocin (OT) and vasopressin (AVP) neurons located in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic (SON) of the hypothalamus. One of the effective stimuli for secretion of AVP is 2% of increase in osmolality. The plasma osmolality increases after feeding. The sex steroids can also influence the balance of fluids, modulating hormone systems that regulate both consumption and excretion of water, or acting directly on vasopressinergic neurons. The objective of this study was to understand more clearly estrogen modulation of AVP neurons in PVN and SON and ER α expression on CVOs during physiological osmotic stimulus. Ovariectomized rats were treated with either estrogen or vehicle during three days and divided in three groups: *Ad libitum*; 48 hours-fasting and refed with standard food after 48 hours- fasting. On the day of the experiment, blood samples were first collected to determine the plasma osmolality and vasopressin. The animals were subsequently perfused, and AVP/FOS immunofluorescence analysis was conducted on neurones in the PVN and the SON and ER α /FOS in the OVLT, dorsal and medial MnPO. The osmolality and the plasma vasopressin in refed animals were higher when compared with *ad libitum* and fasting animals, wherever there was no difference between treatments. Neuronal activation was observed in animals refed with standard chow, but the animals treated with estrogen had a lower neuronal activation in the PaML of the PVN and SON. We also observed an increase in FOS protein expression in CVOs of animals refed with standard chow studied, both treated with vehicle or estrogen. The expression of ER α decreased in these regions in animals treated with estrogen regardless of the state food. These results suggest that estrogen may exert an inhibitory effect on AVP neurons but ER α are not involved in the inhibition of AVP neurons of the PVN and SON in the studied conditions.

Introduction

The maintenance of volume and osmolality of body fluids is essential to homeostasis. Sodium, the main extracellular solute, is the most effective factor to generate an osmotic gradient that allows the transfer of water between the intracellular and extracellular compartments. The balance is maintained in part by changes of the sodium appetite and the natriuresis osmotically regulated (Bourque & Oliet, 1997).

The receptors that detect changes of osmolality (osmoreceptors) are located in several regions of the central nervous system, mainly in the *organum vasculosum of the lamina terminalis* (OVLT), subfornical organ (SFO) and area postrema (AP) (Arima *et al.*, 1998). The lamina terminalis is composed of the SFO, OVLT and median preoptic nucleus (MnPO). The involvement of circumventricular organs such as the SFO to monitor the elevation of the plasma osmolality after hyperosmotic challenge or after feeding has been suggested (Starbuck & Fitts, 2002; Hiyama *et al.* 2004). Conformational changes of these cells stimulate neurons located in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei, which secrete vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) (Oliet & Bourque, 1993).

The increase of the plasma osmolality causes a proportional increase of plasma OT that induces the excretion of sodium and chloride (Balment *et al.*, 1980). Moreover, an increase near 2% of the osmolality is an effective stimulus for AVP secretion (Sladek & Armstrong, 1977). The plasma osmolality also increases due feeding or sodium intake (Bloom *et al.*, 1975, Houpt *et al.* 1983; Burlet *et al.* 1992). During feeding, the actions of AVP contribute to control the water balance, the changes in blood pressure and to end the food intake (Pittman *et al.* 1982; Palkovits, 1984, Langhans *et al.* 1991). AVP is known for its antidiuretic and vasoconstrictive actions that participate in the control of hydroelectrolytic balance (Skott, 2004; Timofeeva *et al.* 2005; Curtis, 2009).

The ovarian steroids may influence the fluid balance by modulating of hormone systems as vasopressinergic and oxytocinergic systems (Caligioni & Franci, 2002; Somponpun, 2007; Mecawi *et al.* 2011). However, the action of gonadal steroids on vasopressinergic and oxytocinergic neurons is not sufficiently understood. Some studies show that estrogen has no significant effect on the content of OT and AVP in the PVN (Van Tol *et al.* 1988, Crowley *et al.*

1993), whereas other researchers demonstrate that estrogen treatment reduces the OT mRNA in PVN from previously ovariectomized rats (Shughrue *et al.* 2002). Rhodes *et al.* (1981) using double labeling in vivo autoradiography with immunohistochemistry have shown that OT and AVP neurons concentrate the radiolabeled estrogen. Thus, estrogen may directly regulate the secretion of these peptides through estrogen receptor-subtype β (ER- β) in both parvocellular and magnocellular neurons (Shughrue *et al.* 2002; Shughrue & Merchenthaler, 2001, Sladek & Somponpun, 2007). We cannot rule out a possible indirect regulation of estrogen on OT and AVP neurons in rats through estrogen receptors subtype α (ER- α) (Somponpun *et al.* 2004; Grassi *et al.* 2010), because neurons in the MnPO and OVLT with expression of these receptors project to the SON (Voisin *et al.*, 1997).

The expression of estrogen receptors-subtype β (ER- β) in OT and AVP neurons is well established in the literature (Hrabovszky *et al.* 1998; Laflame *et al.* 1998; Somponpun & Sladek, 2003; Suzuki & Handa, 2005). In castrated rats, estrogen treatment significantly decreased the expression of ER- β in the PVN (Suzuki & Handa, 2004), or no change (Greco *et al.* 2001). This difference of results may be due to different doses of estrogen administered.

Little is known about the mechanisms and pathways by which estrogen regulates AVP and OT neurons and interfere in fluid and electrolytes balance associated with different reproductive stages. The changes in expression of ER may alter the impact of gonadal steroids, amplifying or diminishing the effect of increased ligand (Greco *et al.* 2001; Patisaul *et al.*, 2001; Somponpun & Sladek, 2003; Suzuki & Handa, 2004). Based on these information, further investigation must be carried out in order to understand more clearly estrogen modulation of AVP neurons in PVN and SON during physiological osmotic stimulus.

Materials and Methods

Animals

Female Wistar rats weighing 160-180 g were housed in individual cages under controlled conditions of temperature (22 ± 1 °C) and a 12h light-dark cycle with free access to water and chow unless otherwise specified. Bilateral ovariectomy (OVX) was performed under 2.5% tribromoethanol (1 ml/100 g of body weight, i.p) anesthesia. The experimental protocols and the animal manipulations were followed in accordance with the National Institutes of Health

Guidelines for the Care and approved by the Ethics Committee of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Experimental Protocol

Fourteen days after surgery, the OVX animals were divided into 3 groups: 1-*ad libitum* standard chow; 2- 48-hour fasting; and 3- refeeding with standard chow after 48-hour fasting. The animals were treated with estradiol cypionate (10 µg/0.1 ml/animal) or vehicle (oil) during three days before experiment. On the 4th day (at 15:00), the animals were anaesthetised with 2.5% tribromoethanol (1 ml/100 g of body weight, i.p) for ventricular blood withdrawal followed by PFA (4%) transcardiac perfusion and brain removal.

Osmolality

The plasma osmolality was determined by freezing point using osmometer Fisk Msrk3 Osmometer (Fiske Associates, Norwood, Massachussets, USA).

Radioimmunoassay

All samples were extracted with petroleum ether and acetone and plasma AVP was measured by radioimmunoassay (RIA). The RIA was performed using a specific antibody and a standard from Peninsula Labs (CA, USA) and a secondary antibody produced by Dr. Franci's Laboratory (School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil). The results are reported as mean±SEM. The minimum detectable dose was 0.2 pg/ml with intra and inter-assay error of 5,8% and 12 % respectively.

Immunofluorescence

Tissue preparation

After 2.5% tribromoethanol anesthesia(1 ml/100 g of body weight, i.p) at 15.00 h, the animals were transcardially perfused through the ascending aorta with approximately 80 ml of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS pH7.4) followed by 320 ml of cold 4% paraformaldehyde (PFA). The brains were removed immediately after perfusion and pos-fixed in 4% PFA during two hours followed by immersion in 30% sucrose in PBS for crioprotection and frozen in cooled

isopentane to store at -70 °C until sectioning. Serial coronal sections (14µm) through the PVN and SON were cut in a cryostat according to Swanson brain atlas. The serial coronal sections of Medial (PaMM) and Lateral (PaML) magnocellular subdivisions of PVN and SON were analyzed.

Double-label immunofluorescence for AVP and FOS

Sections of PVN and SON were rinsed several times in PBS before immersion in 0.1 M glycine in PBS to remove excess aldehydes. After washes in PBS, the sections were incubated in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% bovine serum albumin (BSA) and incubated with primary antibodies. AVP and FOS labeling were performed by an overnight incubation with mouse monoclonal anti-AVP antibody diluted 1:1000 (a kind gift from Dr Harold Gainer, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and rabbit polyclonal anti-FOS (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:500 at room temperature. All antibodies were diluted in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA. After overnight incubation, sections were rinsed and incubated (1h) with secondary antibodies. To visualize AVP/FOS, it was used a cocktail with goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) and goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 594 (Molecular Probes). The sections were rinsed in PBS and coverslipped with Fluoromount-G (Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). The tissue sections were examined under Leica microscope equipped with a DC 200 Leica digital camera. The number of neurons that expressed AVP, FOS and AVP/FOS in the PVN and SON was counted in each photomicrograph and the mean value of labeled neurons in 2-3 bilateral sections of each studied brain region was calculated.

Double-label immunofluorescence for ER α and FOS

20 µm thick coronal sections of OVLT, MnPO dorsal and ventral were cut in cryostat and processed for FOS and ER α using a mouse monoclonal anti-ER α antibody diluted 1:100 (DAKO, Denmark) and a polyclonal anti-FOS (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:500 in PBS containing 5% normal goat serum and 0.1% triton X-100 under overnight incubation at room temperature. To visualize ER α and FOS, it was used a cocktail with goat anti-mouse IgG labeled Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) and goat anti-rabbit IgG labeled with

Alexa Fluor 594 (Molecular Probes). The double and single labeled neurons were counted for each area bounded.

Statistical Analysis

The data is plotted as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Dependent variables, number of neurons and hormonal concentrations were analyzed separately using two way ANOVA by independent variables hormonal treatment and food state in all analyses performed the level of significance was 5%. Analyses were carried out in SAS 9.1 (SAS, Cary, NC), using proc ANOVA and proc GLM.

Results

Osmolality

The data presented in figure 1A show that the refeeding increases the plasma osmololality (mOsm/KgH₂O). OVX rats treated with vehicle or estrogen (313 $\pm$ 2.4 and 315 $\pm$ 2.3, respectively) and refed rats treated with standard chow presented osmolality significantly higher when compared to the *ad libitum* (302 $\pm$ 1.4 and 303 $\pm$ 1.3, respectively) and fasted for 48 hours (298 $\pm$ 1.8 and 301 $\pm$ 1.3, respectively) animals, $F_{2,75}= 33.10$, $p<0.0001$. There is no significant difference between treatments with vehicle and estrogen.

Hormone measurement

The figure 1B shows plasma AVP (pg/ml) in OVX animals treated with either vehicle or estrogen. The plasma AVP in the group treated with vehicle and refed after the 48-hour of fasting (6.76 $\pm$ 1.0) is higher than *ad libitum* (2.06 $\pm$ 0.2) or fasted for 48 hours (2.16 $\pm$ 0.2) groups ($p<0.0001$). Similarly, the plasma AVP in animals treated with estrogen and refed after 48 hours of fasting (6.19 $\pm$ 0.6) is significantly higher when compared to the *ad libitum* (2.02 $\pm$ 0.2) and 48-hours fasted animals (2.31 $\pm$ 0.2) ($F_{2,85}= 58.83$, $p<0.0001$). The results show that there is no difference between treatments with vehicle and estrogen.

Immunofluorescence

Immunofluorescence for AVP and FOS in PVN and SON

As shown in figure 2A, in the PaMM portion of animals treated with vehicle and refed after fasting (59.6 ± 6.7), there is a higher number of AVP neurons when compared to *ad libitum* animals (35.3 ± 2.1). For the same portion, the treatment with estrogen increases number of AVP neurons in animals refed after fasting (63 ± 7.3) when compared to the *ad libitum* (38.8 ± 2.9) or 48-hours fasted animals (41.8 ± 4.7) ($F_{2,44} = 8.98$, $p < 0.02$). In PaML portion (Figure 2B), we observed that animals treated with vehicle and refed after fasting (59.4 ± 5.4) have an increased number of AVP neurons compared to the *ad libitum* animals (38.5 ± 4.9). Similarly, we observe a higher number of AVP neurons in animals treated with estrogen and refed after fasting (66.6 ± 5.5) than *ad libitum* animals (50.7 ± 1.8), $F_{2,40} = 7.19$, $p < 0.02$. In the SON (figure 2C), there is no difference between any of three food states for animals treated with vehicle. However, we observe that the treatment with estrogen increased the number of AVP neurons in the animals refed after fasting (77.2 ± 3.8) when compared to the *ad libitum* (55.4 ± 3.1) and fasting (55.1 ± 4) animals, ($F_{2,44} = 8.68$, $p < 0.002$). There is no difference between the treatments with vehicle and estrogen in any portion of the PVN and SON.

The figure 3 shows that refeeding activates neurons in all portions of the PVN and SON. In the PaMM portion (figure 3A), the number of FOS-ir neurons in OVX animals treated with vehicle or estrogen (81.8 ± 12.5 and 72.1 ± 16.4 , respectively) that were refed after fasting is significantly higher when compared to the *ad libitum* (0.8 ± 0.4 ; 0.8 ± 0.7 , respectively) and fasting (0.5 ± 0.2 and 1.5 ± 0.8 , respectively) animals ($F_{2,44} = 26.36$, $p < 0.001$). This same pattern of activation is seen in the PaML portion (figure 3B). The OVX animals treated with vehicle or estrogen (76.9 ± 11.7 and 65.0 ± 8.5 , respectively) and refed after fasting have a higher number of neurones activated than the *ad libitum* (0.7 ± 0.4 and 1 ± 0.5 , respectively) or fasting (1.5 ± 0.2 and 2.3 ± 1.5 , respectively) groups ($F_{2,40} = 33.5$, $p < 0.001$). In both portions of the PVN, there is no differences between treatments with estrogen and vehicle,. In the SON, we observed also the same pattern of activation. Refed animals treated with vehicle or estrogen (129.7 ± 14.3 and 98.4 ± 11 , respectively) have a higher neuronal activation than the *ad libitum* (3.2 ± 1.15 and 2.2 ± 1.7 , respectively) or fasting (4 ± 0.8 and 6.1 ± 4.3 , respectively) animals, ($F_{2,44} = 59.61$,

$p < 0.001$). There is a significant difference between the treatments with vehicle and estrogen in the refed group ($F_{2,44} = 3.58$, $p < 0.02$).

The figures 4 and 5 illustrate the FOS-ir co-expression in the AVP neurons from PVN and SON. This co-expression was null or near zero in PaMM and PaML portions of PVN and SON from *ad libitum* and fasting animals treated with vehicle or estrogen,. However, we observe an increase in FOS-AVP co-expression in animals treated with vehicle (PAMM= 47.6 ± 9.1 , PaML= 54 ± 6.2 and SON= 65.7 ± 5.6) or estrogen (PAMM= 41.7 ± 8.4 ; $F_{2,45} = 24.59$, $p < 0.0001$; PaML= 34 ± 6.1 ; $F_{2,40} = 34.68$, $p < 0.0001$ and SON= 49.4 ± 6.2 ; $F_{2,44} = 63.55$, $p < 0.0001$, respectively) and refed after fasting compared to the *ad libitum* and fasting animals for the same treatment. There is an increase of the FOS-AVP co-expression in PaML portion of PVN ($F_{1,40} = 5.62$, $p = 0.0078$) and SON ($F_{1,44} = 3.29$, $p = 0.019$) in animals refed after fasting treated with vehicle when compared with to the animals treated with estrogen.

Immunofluorescence for ER- α and FOS in OVLT, MnPO dorsal and ventral

Figures 6 and 9 show that the refeeding activates the expression of FOS in OVLT. We observe an increase of FOS expression (Figure 6A) in animals treated with vehicle or estrogen (36.4 ± 6.8 and 46.8 ± 5.4 , respectively) and refed after fasting when compared to the *ad libitum* (7.5 ± 1.4 and 8 ± 2.5 , respectively) and fasting for 48 hours (7.2 ± 1.4 and 9.4 ± 0.8 , respectively) animals ($F_{2,30} = 49.32$, $p < 0.0001$). There is no difference of FOS expression in this region between treatments with vehicle or estrogen. Figure 6B shows that under treatment with vehicle the fasting decreases the expression of ER α (0 ± 0) compared with the *ad libitum* group (13 ± 2.8), $F_{2,30} = 1.54$, $p = 0.03$. We observe also that treatment with estrogen reduces the expression of ER α in this region. The expression of ER α in the OVLT from *ad libitum* animals is significantly higher for animals treated with vehicle (13 ± 2.8) than with estrogen (1.4 ± 1.4), $F_{1,30} = 2.98$, $p = 0.04$. The data show that there is significant difference of the FOS/ER α co-expression in the OVLT between *ad libitum* groups treated with vehicle (1.5 ± 0.9) and estrogen (0 ± 0 , $F_{2,30} = 2.98$).

The figure 7A shows the expression of FOS in dorsal MnPO. There is an increase of FOS expression in animals refed after fasting for 48 hours treated with vehicle or estrogen (57 ± 6.7 and 44 ± 5.3 , respectively) when compared to *ad libitum* (9.8 ± 2.8 and 17 ± 2.4 , respectively) and fasting (30.2 ± 7.3 and 20 ± 5.5 , respectively) animals, $F_{2,29} = 27.46$, $p < 0.01$

respectively. In addition, is not observed difference between treatments with vehicle and estrogen. The expression of ER α in the dorsal portion of the MnPO (Figure 7B) is lower in *ad libitum* animals (14.6 ± 4.2) treated with estrogen than treated with vehicle (27 ± 8.9), $F_{1,29} = 15.58$, $p < 0.01$. There is no difference of FOS/ER α co-expression between the food states (figure 7C). However, this co-expression is higher in animals refed and treated with vehicle (1.4 ± 0.5) than with estrogen (0 ± 0), $F_{1,29} = 12.25$, $p < 0.002$.

The refeeding after fasting increases FOS expression in the ventral portion of MnPO of animals treated with vehicle (34.4 ± 4.0) compared with to the *ad libitum* (14.2 ± 0.8) and fasted (21 ± 2.7) animals, $F_{2,29} = 6.58$, $p < 0.0003$. Animals treated with estrogen do not present difference in any food state. However, the refed group treated with estrogen has a lower expression of FOS (21.4 ± 3.5) than the group refed treated with vehicle (34.4 ± 4.0), $F_{1,29} = 3.90$, $p < 0.007$. The data in Figure 8B demonstrates that the ER α expression is lower in fasting (4 ± 1.7) and refed (1.4 ± 0.5) groups treated with estrogen compared with fasting (21.2 ± 5.2) and refed (25.2 ± 3.2) groups, $F_{1,29} = 35.08$, $p < 0.0001$ treated with vehicle. The data also show that estrogen decreases FOS/ER α co-expression in refed animals (0 ± 0) when compared with refed animals treated with estrogen (3.8 ± 0.7), $F_{1,29} = 23.12$, $p < 0.0001$ (figure 8C).

Discussion

Osmotic changes are detected by different types of receptors sensitive to plasma osmolality and sodium concentration. When a change is detected in the environment, specific mechanisms promote the restoration of homeostasis. Our results show an increase of osmolality in refed animals when compared to the *ad libitum* or 48 hours fasted animals. These results are consistent with previous studies that have showed increased plasma osmolality after refeeding or sodium intake (Haupt *et al.* 1983; Burlet *et al.* 1992). Estrogen does not alter the response to osmotic challenge, corroborating previous studies from our laboratory (Caligioni & Franci, 2002; Lucio-Oliveira, & Franci, 2011 - unpublished data).

The refeeding after fasting induces an increased secretion of AVP when compared to the *ad libitum* and fasting animals. The secretion of AVP occurs in response to hypovolemia and hyperosmolality (Balment *et al.* 1980; Stricker & Verbalis, 1986; Haanwinckel *et al.* 1995; Ruginsk *et al.* 2007; Vilhena-Franco *et al.* 2011) and this secretion is subject to modulation by

various circulating factors that include, among others, gonadal steroid hormones, particularly estradiol. Many studies indicate that estradiol is important in controlling secretion of AVP (Swenson & Sladek, 1997; Hartley *et al.* 2004; Curtis, 2009). However, we did not observe significant difference in plasma AVP of animals OVX refed after fasting treated with estrogen compared to the animals treated with vehicle.

Literature data regarding the effects of estrogen on the secretion of AVP are controversial. Peysner and Forsling (1990) found a decrease on AVP secretion in ovariectomized rats compared to intact ones and a dose-dependent relationship with estrogen replacement. In intact animals, the treatment with estradiol enhances plasma concentration of AVP in response to osmotic stimuli (Barron *et al.* 1986). Other studies found no changes in plasma AVP during the estrous cycle in rats (Crofton *et al.* 1985) or observed an increase in plasma levels of AVP during proestrus compared to diestrus (Skowsky *et al.* 1979). The concentration of AVP (Hartley *et al.* 2004) and mRNA expression (Crowley *et al.* 1993) were reduced by osmotic stimulation, in OVX rats. This response was reverse by treatment with gonadal steroids.

In vitro studies have shown that release of AVP in response to osmotic stimulus is not altered by pretreatment with estradiol (Swenson & Sladek, 1997). Thus, as shown by our results, plasma AVP is not susceptible to the effects of treatment with estrogen in refeeding. AVP secretion may be modulated differently by estrogen, and the action on the neuronal activation is not associated with hormone secretion in this model. Apparently, estrogen does not participate in fast action of AVP release, but rather modulates the activation of these neurons in response to refeeding.

Our results also showed that an increase of approximately 4% in plasma osmolality induced by refeeding activates vasopressinergic neurons in PVN and SON. There was no expression of FOS in AVP magnocellular neurons in the PVN and SON on 48 hours-fasted animals in any of the treatments (vehicle or estrogen). The expression of FOS has been used reliably to assess the activity in the brain (Naimi *et al.* 1997; Timofeeva *et al.* 2002; Hoffman & Lyo, 2002). OT and AVP neurons in the PVN and SON are sensitive to changes on plasma osmolality and increase the FOS expression (Somponpun & Sladek, 2003; Ruginsk *et al.* 2007).

We assessed the hypothesis if estrogen treatment could modulate the activation of vasopressinergic neurons in response to increased osmolality induced by refeeding. In fact, our data have showed that activation of vasopressinergic neurons in PaML of PVN and SON is lower in ovariectomized rats treated with estrogen than vehicle. Therefore, estrogen inhibits the activation of these neurons in this experimental model.

The increase of plasma osmolality caused by sodium and glucose during feeding (Bloom *et al.* 1975; Houpt *et al.* 1983) may activate AVP neurons, as shown by our results. During feeding, AVP contributes to regulate water balance, blood pressure changes, and the end of feeding (Pittman *et al.* 1982; Palkovits, 1984; Langhans *et al.* 1991). Co-localization of FOS in the AVP neurons was lower in refed animals treated with estrogen than vehicle. These results indicate that estrogen inhibits the release of AVP, as has been shown previously by other researchers that attribute this action to the ER- β (Skowsky *et al.* 1979; Skott, 2004).

The expression of ER- β in AVP neurons is well established in the literature (Shughrue *et al.* 1996; Simonian & Herbison, 1997; Alves *et al.* 1998; Hrabovszky *et al.* 1998; Laflame *et al.* 1998; Somponpun & Sladek, 2003; Hrabovszky *et al.* 2004; Suzuki & Handa, 2005), indicating that estrogen may have direct action on these neurons.

Somponpun and Sladek (2003) found negative correlation between the expression of ER- β and changes on plasma osmolality in males. This regulation occurs only in magnocellular PVN and SON neurons activated in response to osmotic stimulus. We can not rule out that estrogen by itself regulates the expression of ER- β , because this regulation is controversial. Some studies have shown that estrogen may decrease the expression of ER- β mRNA in rat PVN (Patisaul *et al.* 2001), on the other hand, according to Suzuki and Handa (2004) ovariectomy decreases the expression of this receptor. Other researchers have shown that variation in the expression of ER- β is not estradiol dependent (Greco *et al.* 2001).

Thus, our results and data from literature (Swenson *et al.* 1998; Somponpun & Sladek, 2003) taken together suggest that in refed OVX animals treated with estrogen, although a probable downregulation of ER- β due to refeeding (osmotic stimulus), the inhibitory action of estrogen treatment was able to reduce the activity of AVP neurons. There was no inhibition of activity of AVP neurons in OVX animals treated with vehicle, in addition to downregulation of ER- β receptors in the absence of estrogen.

The regulation of ER β also requires monitoring the circumventricular organs (CVO). The involvement of the circumventricular organs in monitoring the plasma osmolality after hyperosmotic challenge or after food intake has been suggested (Oliet & Bourque, 1993; Starbuck & Fitts, 2002). Both the OVLT and the SFO contain osmosensitive neurons that express estrogen receptors. These CVO neurons send direct projections to SON and PVN as well as indirect projections via the MnPO (Bourque *et al.* 1994; Voisin *et al.* 1997; Somponpun *et al.* 2004). Our study found the expression of FOS in the OVLT and MnPO of OVX animals refed after fasting for 48 hours, with both treatments (vehicle and estrogen). Apparently, estrogen treatment did not affect the expression of FOS after refeeding. These neurons that responded to refeeding are probably not modulated by estrogen in these regions. However, estrogen exerted an inhibitory effect on FOS expression in the ventral MnPO, compared to animals treated with vehicle.

Additionally, we cannot rule out a possible indirect regulation of estrogen on AVP neurons via ER α . Neurons located in the OVLT, MnPO and SFO that express ER α project to the SON (Voisin *et al.* 1997; Sladek & Somponpun, 2004; Somponpun *et al.* 2004). It appears that ER α can play a key role in the osmotic regulation of AVP and OT secretion. These receptors can mediate the inhibitory effect of estrogen on AVP secretion in response to the osmotic stimulus (Sladek & Somponpun, 2008; Grassi *et al.* 2010).

We evaluated the expression of ER α in the OVLT and the dorsal and ventral portions of the MnPO. Our results show that estrogen decreases the expression of ER α in these structures. This reduction is independent of change in osmolality, since we observed this decrease in animals treated with estrogen from both *ad libitum* and fasting groups. It has been shown that the expression of ER α in the OVLT, MnPO and SFO can increase in response to the chronic hyperosmolality (Somponpun *et al.* 2004). However, our data indicate that estrogen can be more powerful than osmotic stimulus for receptor downregulation. .

Some studies show that estrogen can exert an inhibitory effect on the expression of both ER α (Simerly & Young, 1991; Yamada *et al.* 2009; Lauber *et al.* 2011) and ER β receptors (Suzuki & Handa, 2004). Thus we can infer that refeeding is not responsible for the decrease in ER α in these nuclei, but treatment with estrogen is responsible for this observed downregulation. Decreased activation of AVP neurons on PVN and SON of refed animals

refeeding treated with estrogen, was not associated with the expression of ER α in the OVLT and MnPO in this experimental model.

Conclusion

The gonadal steroids certainly would not eliminate the control of AVP release, but it could modulate it. The inhibitory effect of estrogen through ER- β could modulate the response. Adult rats and humans release AVP in response to osmotic stimulus even in the presence of circulating estrogen or testosterone. The downregulation of expression of ER- β during hyperosmolality can remove the inhibitory influence, allowing the release of AVP in situations that require maximum secretion. Changes in receptor expression could alter the responsiveness of target cells and determine the physiological condition in which the gonadal steroids become important for regulation of cell function (Somponpun & Sladek, 2003). In *in vitro* studies, the response to osmotic stimulus is inhibited by gonadal steroids (Swenson & Sladek, 1997). In this way, all our data demonstrate that estrogen has an inhibitory effect on the activity of AVP neurons against the increased osmolality promoted by the food.

Acknowledgements

The authors are grateful to São Paulo State Research Foundation (FAPESP), CAPES Foundation and the Brazilian National Council of Research (CNPq) for financial support.

Reference

Alves SE, Lopez V, McEwen BS & Weiland NG 1998 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. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** 3281-3286.

Arima H; Kondo K; Murase T; Yokoi H; Iwasaki Y; Saito H & Oiso Y 1998 Regulation of vasopressin synthesis and release by área postrema in rats. *Endocrinology*, **139** 1481-1486.

Balment RJ, Brimble MJ & Forsling ML 1980 Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. *The Journal of Physiology* **308** 439-449.

Barron WM, Schreiber J & Lindheimer MD 1986 Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *The American Journal of Physiology* **13** 352-361.

Bloom SR, Edwards AV, Hardy RN, Malinowska K & Silver M 1975 Cardiovascular and endocrine responses to feeding in the young calf. *The Journal of Physiology* **253** 135-155.

Bourque CW & Oliet SHR 1997 Osmorreceptors in the central nervous system. *Annual Review of Physiology* **59** 601-619.

Bourque CW, Oliet SH & Richard D 1994 Osmoreceptors, osmoreception and osmoregulation. *Frontiers in Neuroendocrinology* **15** 231-274

Burlet AJ, Jhanwar-Uniyal M, Chapleur-Chateau M, Burlet CR & Leibowitz SF 1992 Effect of food deprivation and refeeding on the concentration of vasopressin and oxytocin in discrete hypothalamic sites. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **43** 897-905.

Caligioni CS & Franci CR 2002 Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. *Life Science* **24** 2822-2831.

Crofton JT, Baer PG, Sahre L, Brooks DP. 1985 Vasopressin release in male and female rats: Effects os gonadectomy and treatment with gonadal steroid hormones. *Endocrinology* **117** 1195-1200.

Crowley RS, Insel TR, O'Keefe JA & Amico JA 1993 Cytoplasmatic oxytocin and vasopressin gene transcripts decline postpartum in the hypothalamus of the lactating rat. *Endocrinology* **133** 2704-2710.

Curtis KS 2009 Estrogen and the central control of body fluid balance. *Physiology & Behavior* **97** 180-192.

Grassi D, Amorim MA, Garcia-Segura LM & Panzica G 2010 Estrogen receptor alpha is involved in the estrogenic regulation of arginine vasopressin immunoreactivity in the supraoptic and paraventricular nucleio f ovariectomized rats. *Neuroscience Letters* **474** 135-139.

Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ & Blaustein JD 2001 Coexpression of ERβ with ERα and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* **142** 5172-5181.

Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM & Antunes-Rodrigues, J 1995 Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92** 7902-7906.

Hartley DE, Dickson SL & Forsling ML 2004 Plasma vasopressin concentrations and FOS pretein expression in the supraoptic nucleus following osmotic stimulation or hypovolaemia in the ovariectomized rat: Effect of oestradiol replacement. *Journal of Neuroendocrinology* **16** 191-197.

Hiyama TY, Watanabe E, Okado H & Noda M 2004 The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na sodium channels for the control of salt intake behavior. *The Journal of Neuroscience* **24** 9276-9281.

Hoffman GE & Lyo D 2002 Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? *Journal of Neuroendocrinology* **14** 259-268.

Haupt KA, Baldwin BA, Haupt TR & Hills F 1983 Humoral and cardiovascular responses to feeding in pigs. *The American Journal of Physiology* **244** 279-284.

Hrabovszky E, Kallo I, Hajszan T, Shughrue PJ, Merchenthaler I & Liposits Z 1998 Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology* **139** 2600-2604.

Hrabovszky E, Kallo I, Steinhauser A, Merchenthaler I, Coen CW, Petersen SL & Liposits Z 2004. Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *The Journal of Comparative Neurology* **473** 315-333.

Laflame N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C & Rivest S 1998 Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of Neurobiology* **36** 357-378.

Langhans W, Delprete E & Scharrer E 1991 Mechanisms of vasopressin's anorectic effect. *Physiology & Behavior* **49** 169 -176.

Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M & Pfaff DW 2011 Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology* (129) 3180-3186.

Lucio-Oliveira F & Franci CR 2011 Effect of the interaction between food state and the action of oestrogen on oxytocinergic system activity. (*Unpublished data*)

Mecawi AS; Vilhena-Franco T; Araujo IG; Reis LC; Elias LL & Antunes-Rodrigues J 2011 Estradiol potentiates hypothalamic vasopressin and oxytocin neuron activation and hormonal secretion induced by hypovolemic shock. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and comparative Physiology*. (Articles in press)

Naimi N, Rivest S, Ricotta I & Richard D 1997 Neuronal activation of the hypothalamus magnocellular system in response to oropharyngeal stimuli in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* **9** 329-340.

Oliet SH & Bourque CW 1993 Mechanosensitive channels transducer osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* **364** 341-343.

Palkovits M 1984 Role of the central nervous system neuropeptides in body fluid homeostasis. *The Journal of Physiology* **79** 428-431.

Patisaul HB, Dindo M; Whitten PL & Young LJ 2001 Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinology* **142** 2946-2952.

Peysner K & Forsling ML 1990 Effect of ovariectomy and treatment with ovarian steroids on vasopressin release and fluid balance in the rat. *Journal of Endocrinology* **124** 277-284 1990.

Pittman QJ; Lawrence D & McLean L 1982 Central effects of arginine vasopressin on blood pressure in rats. *Endocrinology* **110** 1058-1060.

Rhodes CH; Morrell JI & Pfaff DW 1981 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.

Ruginsk SG, Oliveira FR, Margatho LO, Vivas L, Elias LLK & Antunes-Rodrigues J 2007 Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. *Experimental Neurology* **206** 192 - 200.

Shughrue PJ & Merchenthaler I 2001 Distribution of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* **436** 64-81.

Shughrue PJ, Delovade TL & Merchenthaler I 2002 Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor- β . *Progress in Brain Research* **139** 15-29.

Shughrue PJ, Komm B & Merchenthaler I 1996 The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* **61** 678-681.

Simerly RB & Young BJ 2009 Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Neuroscience Letters* **463** 135–139.

Simonian SX & Herbison AE 1997 Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* **9** 803-806.

Skott O 2004 Estrogen receptors and central osmotic regulation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **286** 445.

Skowsky WR, Swan L & Smith P 1979 Effects of sex steroid hormones on arginine vasopressin in intact and castrated male and female rats. *Endocrinology* **104** 105-108.

Sladek CD & Knigge KM 1977 Osmotic control of vasopressin release by rat hypothalamo-neurohypophyseal explants in organ culture. *Endocrinology* **6** 1834 -1838.

Sladek CD & Somponpun SJ 2008 Estrogen receptor: Theirs roles in regulation of vasopressin release for maintenance of fluid and electrolyte homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology* **29** 114 - 27.

Somponpun SJ, Johnson AK, Beltz T & Sladek CD 2004 Osmotic regulation of estrogen receptor- β expression in magnocellular vasopressin neurons requires lamina terminalis. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **286** 465-473.

Somponpun JS 2007 Neuroendocrine regulation of fluid and electrolyte balance by ovarian steroids: contributions from central oestrogen receptors. *Journal of Neuroendocrinology* **19** 809-818.

Somponpun S & Sladek C 2003 Osmotic regulation of estrogen receptor- β in rat vasopressin and oxytocin Neurons. *The Journal of Neuroscience* **23** 4261-4269.

Starbuck EM & Fitts DA 2002 Subfornical organ disconnection and FOS-like immunoreactivity in hypothalamic nuclei after intragastric hypertonic saline. *Brain Research* **951** 202-208.

Stricker EM & Verbalis JG 1986 Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *American Journal of Physiology* **250** 267-275.

Suzuki S & Handa RJ 2004 Regulation of estrogen receptor-beta expression in the female rat hypothalamus: differential effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology* **145** 3658-3670.

Suzuki S & Handa RJ 2005 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. *The Journal of Comparative Neurology* **484** 28-42.

Swenson KL & Sladek CD 1997 Gonadal steroid modulation of vasopressin secretion in response to osmotic stimulation. *Endocrinology* **138** 2089-2097.

Swenson KL; Badre SE; Morsett DJ; Sladek CD 1998 N-methyl-D-aspartic acid stimulation of vasopressin release: role in osmotic regulation and modulation by gonadal steroids. *Journal of Neuroendocrinology* **10** 679-685.

Timofeeva E, Baraboi ED & Richard D 2005 Contribution of the vagus nerve and lamina terminalis to brain activation induced by refeeding. *The European Journal of Neuroscience* **22** 1489-1501.

Timofeeva E, Picard F, Duclos M, Deshaies Y & Richard D 2002 Neuronal activation and corticotrophin-releasing hormone expression in the brain of obese (fa/fa) and lean (fa/?) Zucker rats in response to refeeding. *The European Journal of Neuroscience* **15** 1013-1029.

Van Tol HH, Bolwerk EL, Lui B & Burbach JP 1988 Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology* **122** 945-951.

Vilhena-Franco T, Mecawi AS, Elias LL & Antunes-Rodrigues 2011 Oestradiol potentiates hormone secretion and neuronal activation in response to hypertonic extracellular volume expansion in ovariectomised rats. *Journal of Neuroendocrinology* **23** 481-489.

Voisin DL, Simonian SX & Herbison AE 1997 Identification of estrogen receptor-containing neurons projecting to the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* **78** 215-228.

Yamada S, Noguchi D, Ito H & Yamanouchi K 2009 Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain *Neuroscience Letters* **463** 135-139.

Figure 1: (A) Plasma osmolality (mOsm/kgH₂O and (B) Plasma OT in OVX rats treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.0001$ vs. groups *ad libitum* and fasted for 48 h the same treatment. (n=10-12 rats/group).

Figure 2: The number of AVP neurones/section in (A) medial magnocellular part (PaMM), (B) lateral magnocellular part (PaML) and (C) supraoptic nucleus (SON) of animals treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.02$ vs *ad libitum* and fasted for 48 h groups for the same treatment. α $p < 0.01$ vs *ad libitum* group treated with vehicle. + $p < 0.004$ vs. fasted for 48 h group for the same treatment. (n=5–6 rats/group).

Figure 3: The number of FOS-ir neurones in (A) medial magnocellular part (PaMM), (B) lateral magnocellular part (PaML) and (C) supraoptic nucleus (SON) of animals treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ vs *ad libitum* and fasted for 48 h groups for the same treatment. # $p < 0.02$ vs. refeed group treated with estrogen. (n=5–6 rats/group).

Figure 4: The percentage of AVP-ir neurones that co-expressed FOS-ir in (A) medial magnocellular part (PaMM), (B) lateral magnocellular part (PaML) and (C) supraoptic nucleus (SON) of animals treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ vs *ad libitum* and fasted for 48 h groups for the same treatment. # $p < 0.02$ vs. refed group treated with estrogen. (n=5–6 rats/group).

Figure 5: Photomicrographs (20x) illustrating the co-localization of AVP and FOS-ir in coronal sections (20 μ m) from the PaMM and PaML portions of the PVN and the SON of rats treated with vehicle (A, B and C) or oestrogen (D, E and F). In each panel (A-F), the magnification of a neurone AVP-FOS-ir is shown into the square on the left bottom corn. Scale bar: 100 μ m.

Figure 6: The number of FOS-ir neurones (A), ER α (B) and FOS/ER α co-expression (C) in the OVLT of animals treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.0001$ vs *ad libitum* and fasted for 48 h groups for the same treatment. # $p < 0.04$ vs. *ad libitum* group treated with estrogen. α $p < 0.03$ vs fasted for 48 h group for the same treatment. (n=5–6 rats/group).

Figure 7: The number of FOS-ir neurones (A), ERα (B) and FOS/ERα co-expression (C) in the dorsal MnPO of animals treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.01$ vs *ad libitum* and fasted for 48 h groups for the same treatment. α $p < 0.01$ vs fasted for 48 h group for the same treatment. # $p < 0.02$ vs. refed group treated with estrogen. + $p < 0.01$ vs *ad libitum* group treated with estrogen. (n=5–6 rats/group).

Figure 8: The number of FOS-ir neurones (A), ER α neurones (B) and FOS/ER α co-expression (C) in the ventral MnPO of animals treated with vehicle or estrogen. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.03$ vs *ad libitum* and fasted for 48 h groups for the same treatment. # $p < 0.001$ vs refed group treated with estrogen. + $p < 0.001$ vs fasted for 48 h group treated with estrogen. (n=5–6 rats/group).

Figure 9: Photomicrographs illustrating FOS, ERα and overlay FOS/ERα in coronal sections (20 μm) of OVLT, dorsal and ventral MnPO of rats treated with vehicle (A, B, C, G, H, I, N, O and P) or oestrogen (D, E, F, J, L, M, Q, R and S).