

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

**TESE**

**Papel dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no equilíbrio hidroeletrólítico, respostas neuroendócrinas e avaliação comportamental em ratas ovariectomizadas: Influência do estrógeno.**

Fabricia Viana Fonseca

2013



636.08928

F676p

T

Fonseca, Fabricia Viana, 1982-

Papel dos receptores 5-ht1a no equilíbrio hidroeletrolítico, respostas neuroendócrinas e avaliação comportamental em ratas ovariectomizadas: influência do estrógeno / Fabricia Viana Fonseca. - 2013. 101 f.: il.

Orientador: Luís Carlos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.

Bibliografia: f. 65-85.

1. Medicina veterinária - Teses. 2. Serotonina - Receptores - Teses. 3. Equilíbrio hidro-eletrolítico (Fisiologia) - Teses. 4. Atividade nervosa superior - Aspectos endócrinos - Teses 5. Avaliação do comportamento - Teses. 6. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Reis, Luís Carlos, 1952-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

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

**FABRICIA VIANA FONSECA**

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

TESE APROVADA EM 08/10/2013.

---

Prof. Dr. Luís Carlos Reis – UFRRJ  
(Orientador)

---

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues - FMRP/USP

---

Prof. Dr. Daniel Badaué Passos Júnior - UFS

---

Prof. Dra. Andrea Claudia Freitas Ferreira - UFRJ

---

Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares – UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*As minhas paixões (Família, Hamilton e Fisiologia)*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luís Carlos Reis meu ilustríssimo orientador, meus sinceros agradecimentos pelo ensinamento constante mostrando que se faz ciência em qualquer lugar independente de situação financeira, “mestre dos mestres” amigo e exemplo de vida a ser seguido, sempre presente, exemplo disso é suas infinitas horas extras acumuladas na Rural.

A Rural por todos esses anos de formação, aliás, graduação, mestrado e doutorado são por volta de 9 anos de convivência. E quem sabe o pós doc?

Aos animais utilizados neste trabalho, reconheço a importância de sua utilização na geração de conhecimento.

A sociedade Brasileira de Fisiologia pela criação do Programa e ao Professor Dr Antunes (chefe), sempre incentivou e ajudou na elaboração desse programa de pós-graduação.

Ao André Mecawi (Coorientador) amigo de graduação e futuro padrinho do meu casamento pelas idéias e colaboração técnica e teórica na elaboração dessa tese, te admiro muito, inspiração.

Aos demais futuros padrinhos Cema, que tornou desde o primeiro dia de aula na graduação uma querida amiga, sempre pronta a ajudar e ensinar teve uma importante participação técnica e teórica nesta tese, tenho maior orgulho de ser sua amiga. A minha amiga Ailin Lepletier pessoa que amo mesmo não estando perto, mas que inicialmente contribuiu muito para minha formação na pesquisa. Ao meu amigo Danilo, agradeço por nossas intermináveis horas de conversas que de uma forma ou de outra contribuiu muito para minha formação.

Aos professores do Departamento Luís, Magda, Welligton, Emerson, Frederico e Jairo que mesmo antes de entrar para o departamento me ensinaram a gostar de ciências básicas. Aos demais professores Fábio, Michelle, Luciano, Norma, Bruno e Alba que mesmo conhecendo depois percebo que seus ensinamentos são essenciais e por isso são integrantes desse grupo.

Aos funcionários do departamento representados por Vicente, Maria Rita, Franklin, Juca, Seu Nei e Dona Leni por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas de laboratório Fonkas (minha motorista predileta), Claudinho (me salvou na discussão de LCE e CA), Anderson (me salvando nas caronas e companhia nos finais de semana) Raquel (fisio), Rafael, Raquel (fármaco), Guiniver, Nayane, Tine, Naty (Michelle), Nátaíia “DOXO”, Rodrigo, Renatinha (veterana), Fernando, Marissa, Carla, Bruno, Lucas, George, David por tornarem a convivência mais agradável no DCF e em especial ao Raoni, Vê e Lívia por terem me ajudado na execução de alguns protocolos, bem como sendo pessoas em quem posso sempre confiar.

Agradeço ainda o laboratório de Neuroendocrinologia/FMRP-USP pela convivência e aporte científico na execução de algumas técnicas para finalização dessa tese, agradeço em especial a Guil (ruralina em Ribeirão), Milene e Val pelo apoio na execução de alguns procedimentos e ao Chefe e Lucila por abrir as portas do seu laboratório para realização dos mesmos.

A banca desta tese pela compressão com relação à data e vasta contribuição científica.

Ao meu noivo e futuro marido Hamilton, pessoa maravilhosa que tenho verdadeira admiração, tanto como pessoa quanto com pesquisador e professor. Obrigada amor por ter contribuído na execução dessa tese não só com paciência e companheirismo, mas realizou uma leitura capaz de detectar várias falhas e ainda me ensinou a utilizar o programa Statistic.

À família do Hamilton (Nídia, Fernanda, Tieppo, Nádia, Oliveira, Guilherme, Elias, Dona Neil) seu cachorro Tosh e aos seus vizinhos de Santa Cruz obrigada pela torcida.

À família do meu cunhado André (Marlene, Marquinho, Olga, Zé, Eliane, Léo e Pedro) pela agradável convivência diária sempre fazendo parte da minha rotina.

A tia Lina, tio Miguel e demais tios e primos que sempre torceram muito por essa conquista.

Aos meus amores eternos Gustavo, Augusto e Isabelle meus sobrinhos que faz da minha vida muito mais alegre e engraçada. Obrigada meus amores por vocês existirem. Titia ama muito vocês!

À minha irmã Patrícia pela paciência e por sua dedicação e apesar de parecer mais nova do que eu sinto um amor materno. Obrigada maninha e te amo muito. Ao meu cunhado por me aturar todos esses anos sem reclamar obrigada por tudo!

À mãe por ter depositado em mim a confiança investindo “sem reclamar” contribuindo financeiramente. Mãe obrigada por tudo, TE AMO muito tá!!!

Ao meu querido pai por ter sempre paciência comigo, escutado minhas teorias sobre ingestão de sal e alterações cardiovasculares. Pai te amo muito e tenho muito orgulho de ser sua filha.

Ao meu irmão contador de histórias Juninho, desculpas por ter sido tão arrogante contigo, que mesmo depois de lhe dar um prejuízo de quase quatro mil nunca pensou em cobrar! Te amo maninho.

E por fim agradeço ainda aos órgãos de fomentos: CNPq, FAPERJ, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

FONSECA, Fabricia Viana Fonseca. **Papel dos receptores 5-HT1A no equilíbrio hidroeletrolítico, respostas neuroendócrinas e avaliação comportamental em ratas ovariectomizadas: influência do estrógeno.** 2013. 85 p. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, seropédica, RJ, 2013.

A atividade serotoninérgica ascendente a partir do núcleo dorsal da rafe (NDR) é modulada pela sinalização dos receptores 5-HT1A que resulta em alteração da frequência de disparo dos potenciais de ação dos neurônios serotoninérgicos. Observações recentes do nosso laboratório utilizando o 8-OH-DPAT, um agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT1A, demonstraram que a sua administração periférica ou intra-NDR incrementa a ingestão de salina hipertônica em condições basais ou após a depleção corporal de sódio em ratos machos. Dessa forma, examinamos neste trabalho o comportamento ingestivo e a homeostase hidroeletrolítica em condição basal e após depleção de sódio em ratas ovariectomizadas (OVX). As observações foram comparadas com aquelas obtidas em grupos de ratas OVX tratadas cronicamente com estrógeno (E2) associada ao tratamento com 8-OH-DPAT. Numa etapa final investigamos uma possível correlação entre o “status” funcional serotoninérgico e a reposição com E2 nas concentrações plasmáticas de angiotensina I (ANG I), angiotensina II (ANGII), ocitocina (OT) vasopressina (AVP), peptídeo natriurético atrial (ANP) e corticosterona (CORT). Além disso, estudamos a expressão do RNAm para 5-HT1A, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e expressão do RNAm e quantificação proteica de triptofano hidroxilase (TPH2), no NDR de grupos de ratas (i) OVX (sem reposição estrogênica) (ii) OVX-E2 (com reposição estrogênica) e cronicamente tratadas com o agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT, em condições basais e após depleção de sódio. Por fim, avaliamos o comportamento de ansiedade pelo teste de labirinto em cruz elevado (LEC) e atividade exploratória através do campo aberto (CA) nos grupos apresentados anteriormente em condição basal. De acordo com os nossos resultados de avaliação diária, observamos uma possível relação entre a terapia estrogênica e o sistema serotoninérgico, no que diz respeito à inibição do comportamento de ingestão e excreção renal de sódio, ingestão de água e alimento, dado este que resultou em perda de peso. Já no experimento que submetemos os animais ao desafio homeostático (depleção de sódio), verificamos que os parâmetros hidroeletrolíticos (comportamento ingestivo, excreção renal de sódio, sódio e/ou proteína e osmolalidade plasmática e hematócrito) são alterados pela depleção de sódio. Porém, possivelmente através de mecanismos centrais e periféricos, o E2 e o sistema serotoninérgico parecem mediar respostas ao nível de diminuição da excreção renal de sódio e inibição do apetite específico a este íon, uma vez que essa atenuação é observada principalmente quando os animais são submetidos a depleção de sódio. Adicionalmente, evidenciamos que as alterações na resposta endócrina observada neste estudo pode ser mediada tanto pelo tratamento com E2 quanto pelo tratamento com 8-OH-DPAT e ainda pela condição de desafio experimental. A geração de ANGI e ANGII parece evoluir mecanismo diferente que depende da condição do animal, ou seja, o tratamento com 8-OH-DPAT associado ao E2 em condição basal aumenta a concentração plasmática de ANGI e o E2 parece atenuar essa liberação em condição de depleção de sódio. A liberação de OT e CORT em condição basal parece ser potencializada pela associação dos dois tratamentos: o E2 tanto em condição basal e de depleção parece aumentar a liberação de ambos. Em relação à CORT na condição de depleção o E2 parece atenuar em parte o efeito estressor da hiponatremia; por sua vez, o tratamento com 8-OH-DPAT parece ser crítico em potencializar a secreção de AVP e ANP em condição de depleção. Por sua vez, a modulação central do sistema serotoninérgico (NDR) parece

recrutar mecanismos moleculares diferentes com relação à condição homeostática do animal. Uma vez que verificamos uma diminuição da expressão do receptor 5-HT1A mediada predominantemente pelo tratamento crônico com 8-OH-DPAT, e em relação à diminuição de TPH2 tal efeito foi mediado pelo tratamento com E2 em condição basal. Já em condição de depleção o E2 parece ser crítico na diminuição da expressão de 5-HT1A. Nesse sentido, verificamos um efeito semelhante ao ansiogênico do E2 que possivelmente está relacionado com essas alterações moleculares em condição basal. Porém a associação do E2 ao 8-OH-DPAT reverteu em parte esse efeito. Considerando-se essas observações, estes resultados reforçam uma possível ligação entre o déficit estrogênico e a maior incidência de enfermidades como depressão e hipertensão arterial. Como o sistema serotoninérgico relaciona-se intimamente a tais doenças são necessários mais estudos para verificar o tipo de terapia farmacológica que pode ser associado para o tratamento de ambas as enfermidades.

Palavras Chaves: receptor 5-HT1A, Núcleo Dorsal da Rafe, sede, apetite por sódio, estradiol e ansiedade.

## ABSTRACT

FONSECA, Fabricia Viana. **Role of 5-HT1A receptors in electrolyte balance, neuroendocrine and behavioral assessment in ovariectomized rats: influence of estrogen.** 2013. 85 p. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, seropédica, RJ, 2013.

The ascending serotonergic activity from the dorsal raphe nucleus (NDR) is modulated by the 5-HT1A receptors signaling that result in changes in the firing frequency of action potentials from the serotonergic neurons. This condition plays important role in the regulation of sodium satiety. Recent observations from our laboratory using the 8-OH-DPAT, a receptor agonist of 5-HT1A serotonergic receptors, demonstrated that peripheral or intra-NDR administration increases the hypertonic saline intake under basal condition or after sodium depletion in male rats. Thus, we examined in the present study the feeding behavior, daily fluid intake and electrolyte homeostasis in ovariectomized (OVX) rats submitted to oil or estrogen treatment (OVX group and OVX-E2 group, respectively) and to chronicle treatment with the 8-OH-DPAT or vehicle, in basal condition and after sodium depletion. We also investigated a possible correlation between serotonergic functional status and E2 replacement on the plasma levels of angiotensin I (ANG I), angiotensin II (ANG II), oxytocin (OT), vasopressin (AVP), atrial natriuretic peptide (ANP) and corticosterone (CORT), as well as, on the mRNA expression for 5-HT1A autoreceptor and glutamic acid decarboxylase (GAD) and the protein quantification of tryptophan hydroxylase (TPH2) in NDR from the groups abovementioned. Finally, we carried out anxiety test by elevated plus maze (LEC) and exploratory activity evaluation through the open field (CA) in all groups. In accordance with our daily evaluation, we observed a possible relationship between estrogen therapy and the serotonergic system related to the inhibition of drinking behavior and reduction in renal sodium excretion, food and water intake, since this has resulted in loss weight. The animals subjected to the homeostatic challenge presented electrolyte parameters (renal sodium excretion, sodium and / or protein and osmolarity plasma and hematocrit) and feeding behavior altered by sodium depletion. However, possibly through central and peripheral mechanisms, serotonergic system and E2 appear to mediate the reduction of urinary sodium excretion and to induce NaCl intake inhibition. In addition, we showed changes in the endocrine response which may be mediated by E2 and 8-OH-DPAT treatments and experimental challenges. The ANG I and ANG II release and respective mechanisms seem to be depend of the condition of the animal or 8-OH-DPAT treatment. Chronic 8-OH-DPAT in basal condition increased the ANG I plasma concentration while the E2 seems to attenuate this response following sodium depletion. The OT and CORT plasma levels at basal condition were enhanced by association of the two treatments. E2 replacement, both at baseline and depletion conditions, increased OT and CORT plasma levels. Additionally we did not observe estrogen influence on plasma CORT concentrations following sodium depletion; on the other hand, the 8-OH-DPAT seems to be critical to enhance the AVP and ANP secretion following sodium depletion. The central serotonergic system seems to recruit different molecular mechanisms regarding the homeostatic condition of the animal, since we found a decrease in the expression of 5-HT1A receptor mediated, predominantly, by chronic 8-OH-DPAT treatment and the reduction of TPH2; such effect was mediated by treatment with E2 at baseline. On the other hand, it seems clear that E2 replacement was critical for reducing 5-HT1A receptors expression on NDR. In this sense, we observed an anxiogenic-like effect of E2, which would be possibly related to these molecular changes at baseline, despite the association of E2 and 8-OH-DPAT treatments partially reversed this effect. Considering these observations, these results support a possible

link between low estrogen and increased incidence of diseases such as depression and hypertension facilitated by enhanced sodium intake.

Keywords: 5-HT<sub>1A</sub> receptors, Dorsal Raphe Nucleus, thirst, sodium intake, estrogen, anxiogenic

## LISTAS DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Representação esquemática de secção sagital do encéfalo                                                                                                                                                                                        | 6  |
| <b>Figura 2-</b> Comparação qualitativa (A) e quantitativa (B) da reposição hormonal                                                                                                                                                                            | 18 |
| <b>Figura 3-</b> Representação esquemática dos protocolos experimentais                                                                                                                                                                                         | 26 |
| <b>Figura 4:</b> Avaliação da ingestão diária de água (A), ingestão de salina hipertônica (1,8%) (B) e preferência por sódio (C).                                                                                                                               | 27 |
| <b>Figura 5:</b> Avaliação do volume urinário (A), osmolalidade urinária (B) e concentração renal de sódio (C).                                                                                                                                                 | 29 |
| <b>Figura 6:</b> Avaliação da ingestão alimentar diária (A) e ganho de peso (B).                                                                                                                                                                                | 30 |
| <b>Figura 7:</b> Avaliação da ingestão cumulativa de água (A) salina 1,8% (B) e preferência por sódio (C) em condição basal.                                                                                                                                    | 31 |
| <b>Figura 8:</b> Avaliação da ingestão cumulativa de água (A) salina 1,8% (B) e preferência por sódio (C) em condição de depleção de sódio.                                                                                                                     | 32 |
| <b>Figura 9:</b> Avaliação do volume urinário 24 horas após a depleção de sódio (A) e volume urinário 120 minutos após a oferta de fluidos (B) em condição basal e após depleção de sódio.                                                                      | 34 |
| <b>Figura 10:</b> Avaliação da concentração urinária de sódio 24 horas após a depleção de volume (A) e concentração urinária de sódio 120 minutos após a oferta de fluidos (B) em condição basal e após depleção de sódio.                                      | 35 |
| <b>Figura 11:</b> Avaliação da osmolalidade plasmática (A) e concentração plasmática de sódio (B) em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                   | 36 |
| <b>Figura 12:</b> Avaliação da proteína plasmática (A) e hematócrito (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                  | 37 |
| <b>Figura 13:</b> Avaliação da Angiotensina I (A) e Angiotensina II (B) plasmática em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                                  | 38 |
| <b>Figura 14:</b> Avaliação da ocitocina-OT (A) e Vasopressina-AVP (B) plasmática em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                                   | 39 |
| <b>Figura 15:</b> Avaliação de ANP (A) e CORT (B) plasmática em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                                                        | 40 |
| <b>Figura 16:</b> Avaliação das unidades arbitrárias de RNAm de 5-HT1A (A), TPH2 (B) e GAD (C) no NDR em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                               | 41 |
| <b>Figura 17:</b> Avaliação da densidade relativa de TPH2/ $\beta$ -Actina no NDR (A) em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                               | 42 |
| <b>Figura 18:</b> Avaliação do teste LEC em relação ao número de entradas nos braços abertos e fechados (A), tempo de permanência (B) e relação do número de entrada BA/BF em porcentagem (C).                                                                  | 43 |
| <b>Figura 19:</b> Avaliação do teste LEC em relação ao número de idas às extremidades nos braços abertos e fechados (A), tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos e fechados (B) e número de quadrantes cruzados no braço aberto e fechado (C). | 44 |
| <b>Figura 20:</b> Avaliação do teste LEC em relação ao número de comportamentos complementares como número e tempo de autolimpezas (grooming) (A), número de mergulho de cabeça no braço fechado (HD BF) e aberto (HD BA) (B)                                   | 46 |
| <b>Figura 21:</b> Avaliação do teste LEC em relação ao número de comportamentos complementares como explorações verticais (Hearing) (A) e número de postura                                                                                                     | 46 |

estendida (SAP) (B).

**Figura 22:** Avaliação do teste Campo Aberto em relação ao número de quadrantes totais percorridos (A), número de quadrantes periféricos percorridos (B) e número de quadrantes centrais percorridos (C) 47

**Figura 23:** Avaliação do teste Campo Aberto na relação entre o número de quadrantes centrais percorridos sob o número de quadrantes periféricos em porcentagem (%) (A), relação entre o número de quadrantes periféricos percorridos sob o número de quadrantes totais em porcentagem (%) (B) e número de cruzamentos no quadrante central (C). 48

**Figura 24:** Avaliação do teste Campo Aberto nos parâmetros número (A) e tempo (B) de autolimpeza “grooming”. 49

**Figura 25:** Avaliação do teste Campo Aberto nos parâmetros número de explorações verticais “Rearing” (A) e número de bolos fecais (B). 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                      |
|--------|--------------------------------------|
| ANGI   | ANGIOTENSINA I                       |
| ANGII  | ANGIOTENSINA I                       |
| ANP    | PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL         |
| AP     | ÁREA POSTREMA                        |
| AVP    | VASOPRESSINA                         |
| CA     | CAMPO ABERTO                         |
| CCK    | COLECISTOCININA                      |
| CORT   | CORTICOSTERONA                       |
| CRH    | HORMÔNIO LIBERADOR DE CORTICOTROFINA |
| E2     | ESTRADIOL                            |
| ENAC   | CANAIS EPITELIAIS DE SÓDIO           |
| ER     | RECEPTORES DE ESTROGENOS             |
| GAD    | DESCARBOXILASE DO ÁCIDO GLUTÂMICO    |
| IP     | INTRAPERITONEAL                      |
| HHA    | HIPOTÁLAMO HIPÓFISE ADRENAL          |
| LCE    | LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO            |
| MAO    | MONOAMINA OXIDASE                    |
| MNPO   | NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIAL             |
| NDR    | NÚCLEO DORSAL DA RAFE                |
| NMR    | NÚCLEO MEDIAL DA RAFE                |
| NPV    | NÚCLEO PARAVENTRICULAR               |
| NSO    | NÚCLEO SUPRAÓPTICO                   |
| NSF    | NÚCLEO SUBFORNICIAL                  |
| NPBL   | NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL          |
| OVX    | OVARIECTOMIA                         |
| OVL    | ORGÃO VASCULOSO DA LAMINA TERMINAL   |
| OT     | OCITOCINA                            |
| P4     | PROGESTERONA                         |
| SC     | SUBCUTÂNEO                           |
| SCP    | SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIACDUTAL      |
| SNC    | SISTEMA NERVOSO CENTRAL              |
| SRA    | SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA          |
| TPH    | TRIPTOFANO HIDROXILASE               |
| 5-HT1A | SEROTONINA                           |

## SUMÁRIO

|                                                                       |       |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>DEDICATÓRIA</b>                                                    | v     |
| <b>AGRADECIMENTO RESUMO</b>                                           | vi    |
| <b>RESUMO</b>                                                         | xviii |
| <b>ABSTRAT</b>                                                        | x     |
| <b>LISTAS DE FIGURAS</b>                                              | xii   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                                          | xiv   |
| <br>                                                                  |       |
| <b>1-INTRODUÇÃO</b>                                                   | 1     |
| <br>                                                                  |       |
| 1.1-Sistema serotoninérgico                                           | 1     |
| 1.1.2-Síntese e liberação de 5-HT                                     | 1     |
| 1.1.3-Receptores serotoninérgicos                                     | 2     |
| 1.2-Sistema serotoninérgico e homeostase hidroeletrolítica            | 3     |
| 1.3- Sistema serotoninérgico e eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA) | 6     |
| 1.4- Sistema serotoninérgico e comportamento emocional                | 7     |
| 1.5-Hormônios Ovarianos e homeostase hidroleterolítica                | 8     |
| 1.6-Hormônios Ovarianos e comportamento Emocional                     | 12    |
| <br>                                                                  |       |
| <b>2-OBJETIVOS</b>                                                    | 15    |
| Objetivo Geral                                                        | 15    |
| Objetivos Específicos                                                 | 15    |
| <br>                                                                  |       |
|                                                                       | 16    |
| <b>3-JUSTIFICATIVA</b>                                                |       |
| <br>                                                                  |       |
| <b>4-MATERIAL E MÉTODOS</b>                                           | 17    |
| <br>                                                                  |       |
| 4.1-Apreciação Bioética da Experimentação Animal no Projeto           | 17    |
| 4.2-Animais utilizados                                                | 17    |
| 4.3-Procedimentos cirúrgicos de Ovariectomia                          | 17    |
| 4.4-Terapia de reposição hormonal                                     | 18    |
| 4.5- Fármacos utilizados                                              | 19    |
| 4.6-Aferição da ingestão de água e sódio e coleta de urina            | 19    |
| 4.7-Coleta de sangue                                                  | 19    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.8-Radioimunoensaio                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 21 |
| 4.9-Coleta do tecido encefálico                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 21 |
| 4.10-Avaliação comportamental                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 23 |
| 4.11-Análise estatística dos resultados                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 24 |
| 4.12-Procedimentos experimentais                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 25 |
| <b>5- RESULTADO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 27 |
| 5.1-Estudo dos parâmetros hidroeletrolítico diários:                                                                                                                                                                                                                                                                      | 27 |
| 5.2- Estudo dos parâmetros metabólicos diários: Ingestão de alimento e ganho de peso em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.                                                                                                                                                                           | 29 |
| 5.3-Estudo dos parâmetros hidroeletrolítico em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT: em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                                                                        | 30 |
| 5.4- Avaliação do volume, osmolalidade e sódio urinário em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                                                                                                                       | 33 |
| 5.5- Avaliação da osmolalidade, sódio e proteína plasmática e hematócrito em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                                                                                                     | 35 |
| 5.6- Avaliação por radioimunoensaio dos parâmetros neuroendócrinos (ANG I, ANGII, OT, AVP, ANP, CORT) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                               | 37 |
| 5.7- Estudo da expressão gênica no NDR (TPH2, GAD e 5-HT1A) e transcrição protéica de TPH2 em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                          | 40 |
| 5.8-Avaliação das respostas comportamentais em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT no teste de labirinto em cruz elevado                                                                                                                                                                               | 42 |
| 5.9-Avaliação das respostas comportamentais em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT no teste campo aberto.                                                                                                                                                                                              | 47 |
| <b>6-DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 51 |
| 6.1-Estudo dos parâmetros hidroeletrolítico diários (ingestão de água, salina, volume urinário, sódio urinário e osmolalidade urinária) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.                                                                                                                        | 51 |
| 6.2-Estudo dos parâmetros metabólicos diários: Ingestão de alimento e ganho de peso em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.                                                                                                                                                                            | 52 |
| 6.3-Estudo dos parâmetros hidroeletrolíticos (ingestão de água, salina, preferência por sódio, volume urinário, sódio urinário e plasmático, osmolalidade urinária e plasmática, proteína plasmática, hematócrito) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT: em condição basal e após depleção de sódio. | 53 |
| 6.4-Avaliação por radioimunoensaio dos parâmetros neuroendócrinos (ANG I, ANGII, OT, AVP, ANP, CORT) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                | 56 |
| 6.5-Estudo da expressão gênica no NDR (5-HT1A, TPH2 e GAD) e síntese protéica de TPH2 em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.                                                                                                                               | 59 |
| 6.6-Avaliação das respostas comportamentais em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT no teste de labirinto em cruz elevado e campo aberto                                                                                                                                                                | 61 |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| <b>7- CONCLUSÃO</b>               | 63 |
| <b>8-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> | 65 |

# **1-INTRODUÇÃO**

## **1.1-Sistema serotoninérgico**

A serotonina (5-hidroxitriptamina: 5-HT) é uma monoamina que foi identificada pela primeira vez no sistema nervoso central (SNC) em 1953 (TWAROG & SCPE, 1953). A 5-HT é um neurotransmissor clássico, identificado em vários locais, tais como SNC, trato gastrointestinal e plaquetas (JACOBS E AZMITIA, 1992; PEROUTKA & HOWELL, 1994). Durante o desenvolvimento embrionário humano, a 5-HT é um dos primeiros neurotransmissores a ser detectada em neurônios do SNC. Tal detecção é possível já a partir de cinco semanas de gestação (SUNDSTROM et al. 1993). Essa descoberta representou um avanço no cerne da explicação do papel desse sistema no desenvolvimento ontogenético do SNC. Ainda neste contexto, a sinalização serotoninérgica parece desempenhar um papel fundamental na geração e modulação de várias funções. A 5-HT encefálica participa na regulação do sistema neuroendócrino, temperatura corporal, controle da pressão arterial, apetite, equilíbrio hidroeletrolítico, humor, atividade motora e funções cognitivas (GRIEBEL, 1995; ARTIGAS et al. 1996; GRAEFF et al. 1996; VAN DE KAR, 1991).

O Sistema serotoninérgico encefálico é topograficamente organizado no tronco encefálico no complexo mesencefálico da rafe. Os núcleos da rafe apresentam propriedades anatômicas e funcionais específicas. Nesses núcleos foram identificados aproximadamente 235.000 neurônios serotoninérgicos no cérebro humano (BACKER et al. 1990). No SNC, os neurônios serotoninérgicos da Rafe projetam-se através de vias ascendentes e descendentes, para uma vasta gama de regiões do encéfalo (DAHLSTROM & FUXE, 1964). O papel desse sistema nessas funções descritas acima depende da sua capacidade de síntese e liberação de 5-HT. Além disso, tais efeitos fisiológicos dependerão da expressão dos receptores e nas estruturas alvos. Os vários efeitos de 5-HT são mediados por receptores específicos pré e pós-sináptico, cuja localização e funções serão descritos.

A atividade elétrica dos neurônios serotoninérgicos é caracterizada por padrões de disparos rítmicos que são responsáveis por modular a atividade basal das respectivas estruturas encefálicas inervadas por eles (AGHAJANIAN & WANG, 1978).

### **1.1.2-Síntese e liberação de 5-HT**

No SNC, a 5-HT é sintetizada no pericário de neurônio a partir do precursor triptofano. A síntese de 5-HT é regulada pelos níveis de triptofano, que é transportado para dentro do neurônio serotoninérgico por uma bomba transportadora específica. Outra regulação importante é a atividade de isoformas triptofano hidroxilase 1 e 2 (TPH1 e TPH2), sendo a TPH2, uma enzima exclusivamente encefálica (WALTHER et al. 2003). A TPH2 é uma enzima chave na síntese de serotonina (5-HT) encefálico, constituindo a etapa limitante desse processo.

Este aminoácido é hidroxilado pela TPH2 para 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que em seguida sofre descarboxilação pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC), resultando em 5-HT (HAMON et al. 1982). A 5-HT formada é armazenada em vesículas para eventual liberação para a fenda sináptica. A liberação depende da chegada do potencial de ação no terminal axonal, responsável pela abertura de canais de cálcio voltagem dependente e conseqüente exocitose das vesículas contendo o neurotransmissor. A 5-HT liberada na fenda sináptica irá se ligar aos receptores específicos e posteriormente desencadeará sua função fisiológica. Imediatamente, ela é recaptada pelo transportador 5-HT localizada na membrana pré- sináptica e subsequente ocorre degradação da mesma, pela ação da enzima monoamina

oxidase (MAO). Dessa forma a resposta fisiológica depende de vários fatores vinculados à síntese e liberação de serotonina bem como sua atuação em receptores específicos.

### **1.1.3-Receptores serotoninérgicos**

Recentes estudos eletrofisiológicos têm demonstrado à heterogeneidade de neurônios 5-HT nos núcleos da rafe mesencefálica. Atualmente são conhecidos 18 genes que codificam os receptores serotoninérgicos, estes receptores são: 5-HT1A/B/D/E/F, 5-HT2A/B/C, 5-HT3A/B e 5-HT3C/D/E, 5-HT4, 5-HT5A/B, 5-HT6, 5-HT7.

Esta população de receptores vem sendo alvo de vários estudos, tendo em vista a necessidade de compreensão da função atribuída a cada um dos receptores 5-HT no cérebro (ARTIGAS, 2012). A maioria dos receptores de serotonina pertence à família de receptores de membrana de sete domínios acoplados a proteína G, que realiza o mecanismo de transdução de sinais interferindo na atividade da fosfolipase C e da adenilato ciclase. A única exceção é a classe de receptor 5HT3 que são canais iônicos. Neste trabalho iremos destacar o papel do receptor 5-HT1A, tendo em vista a sua efetiva importância no mecanismo de autorregulação serotoninérgica.

#### **1.1.3.1-Receptor 5-HT1A**

O receptor 5-HT1A foi o primeiro receptor serotoninérgico a ser clonado e sequenciado (FARGIN et al. 1988;. ALBERT et al. 1990).

##### **1.1.3.1.1 – Distribuição**

Dentre as classes de receptores citadas acima o receptor 5-HT1A, especialmente o pré-sináptico, e não o pós-sináptico (heteroreceptor) exerce um mecanismo de modulação da frequência de disparo do neurônio serotoninérgico. Esse mecanismo de autorregulação torna-se importante para estudar atividade serotoninérgica no NDR. A densidade de receptor 5-HT1A é consideravelmente alta no sistema límbico, especialmente no hipocampo, outras regiões como septo lateral, áreas corticais (em especial o córtex cingulado e córtex entorrinal), e também os núcleos da rafe mesencefálica (dorsal e mediano). Em particular, o autorreceptor 5-HT1A no NDR desempenha um papel crucial no controle fisiológico de vias ascendentes 5-HT. AZMITIA et al. 1996 relataram a existência de receptores 5-HT1A nas células glia, porém tal relato não foi confirmado por outros trabalhos (BURNET et al. 1995;. KIA et al. 1996). Estudos realizados por SOTELA e colaboradores forneceram, com a técnica de imunohistoquímica, a primeira demonstração direta da existência de autorreceptores 5-HT1A no soma e dendritos dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe dorsal e mediana (SOTELA et al. 1990).

Vários trabalhos vêm mostrando a importância da utilização de antagonistas 5-HT1A associados à terapia com antidepressivos (buspirona) na preservação dos seus efeitos neuroquímicos e comportamentais (GARTSIDE et al. 1995; ARTIGAS et al. 1996; HASHIMOTO et al. 1997; MITCHELL & REDFERN 1997; GRIGNASCHI et al. 1998; TRILLAT et al. 1998). O aumento dos níveis de serotonina extracelular no prosencéfalo é induzido por administração de inibidor da recaptação de serotonina (ISRS) e é limitado por uma retroalimentação negativo envolvendo autorreceptores localizados na rafe (ARTIGAS et al. 1996).

#### **1.1.3.1.1 – Mecanismo de sinalização**

Essa retroalimentação negativa envolve mecanismos de sinalização intracelular do receptor. Experimentos eletrofisiológicos têm estabelecido que a ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> causa hiperpolarização neuronal, um efeito mediado por proteína G<sub>i</sub>, que resulta na abertura de canais de K<sup>+</sup> (NICOLL et al. 1990; AGHAJANIAN, 1987; KOBILKA et al. 1987). Além da principal via de transdução de sinal, através de subunidades G<sub>i</sub>, há também envolvimento da subunidade  $\beta\gamma$  ativando vias adicionais de transdução de sinal, como a ativação da fosfolipase C e proteína quinase C e modulação da condutância de K<sup>+</sup> e outros ânions e cátions, como mencionado anteriormente (RAYMOND et al. 1999, 2001).

Curiosamente, a heterogeneidade observada na distribuição dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> tem sido associada com a diversidade na transdução de sinal do receptor. Isso é atribuído à diferença na composição lipídica da região neuronal que o receptor está localizado.

#### **1.1.3.1.1 – Ações biológicas**

O uso de fármacos que interferem na atividade dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> tem sido alvo de muitos trabalhos que norteiam o estudo do sistema serotoninérgico. Atualmente, a utilização de agonista (BLIER et al. 1990) e antagonistas (GRIEBEL, 1999) na clínica representam uma classe importante de moléculas com potenciais efeitos terapêuticos nos transtornos de ansiedade ou estresse. O agonista mais estudado é o 8-OH-DPAT sendo altamente seletivo (ZIFA & FILLION, 1992; HARIKUMAR & CHATTOPADHYAY, 1998; HARIKUMAR et al. 2000; KALIPATNAPU et al. 2004).

### **1.2-Sistema serotoninérgico e homeostase hidroeletrolítica**

O núcleo dorsal da rafe (NDR) é constituído por grupamento neuronal que basicamente é representado por neurônios serotoninérgicos, principalmente na região rostro-medial que se projetam rostralmente (AZMITIA & SEGAL, 1978; STEINBUSCH, 1981; AZMITIA, 1987; BOSLER & DESCARRIES, 1988). O papel do NDR no equilíbrio hidroeletrolítico foi descrito pela primeira vez por REIS et al. 1994, onde foi demonstrado um envolvimento do sistema serotoninérgico ascendente na estimulação e liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP). Neste estudo, foi realizada lesão eletrolítica no NDR e evidenciado uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de ANP em animais submetidos à expansão de volume. Esses resultados suportam a hipótese da existência de uma atividade tônica de neurônios serotoninérgicos que tem seus corpos celulares localizados no NDR que se projetam para área anterior do terceiro ventrículo (AV3V) (STEIN, 1987).

Estudos anteriores, como os realizados por AZMITIA & SEGAL em 1978, através da técnica autorradiográfica identificaram projeções do NDR para regiões que regulam a homeostase hidroeletrolítica. Essas estruturas identificadas foram: Órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT), núcleo pré-óptica medial (MnPO) e órgão sobfornicial (SFO). Especificamente no SFO, LIND, 1986 demonstrou uma conexão bidirecional dessa estrutura com o NDR. Posteriormente, estudos relataram que injeção intra-carótida de angiotensina II (ANG II) altera a eletrofisiologia dos neurônios do NDR (TANAKA et al. 1998). Neste trabalho os autores demonstraram que os neurônios do SFO com projeções descendentes para o NDR são sensíveis a ANG II administrada, sugeriram que os neurônios SFO que se projetam para o NDR podem monitorar o nível de circulação de ANG II e transmitir as informações para o mesmo. Outros trabalhos realizando experimentos com a técnica de

imunohistoquímica detectaram uma diminuição significativa da expressão c-Fos em neurônios serotoninérgicos localizados no NDR após depleção de sódio induzida pela diálise peritoneal (FRANCHINI et al. 2002). Neste trabalho os autores evidenciaram um aumento da expressão de c-Fos em animais que foram ofertados com bebedouros com salina hipertônica, sugerindo que há uma inibição tônica ao apetite ao sódio por neurônios serotoninérgicos deste local.

Várias evidências neuroanatômicas e neurofisiológicas reportam o envolvimento do NDR e regiões prosencéfalicas na integração de respostas viscerossensoriais regulando a homeostase hidroeletrolítica e cardiovascular. Modelos experimentais têm sido utilizados em nosso laboratório na avaliação da participação de vias serotoninérgicas na modulação do apetite e expressão da saciedade ao sódio. Podemos destacar aqui alguns desses experimentos: (i) A administração sistêmica aguda de agonistas de receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT<sub>2C</sub> bem como de liberador de serotonina ou de inibidor de sua recaptação pré-sináptica reduziram significativamente a resposta natriorexigênica em diferentes modelos experimentais (BADAUÊ-PASSOS et al. 2003; REIS, 2007). (ii) Ao contrário do que era esperado, o tratamento crônico com sertralina, um típico inibidor da recaptação pré-sináptica de serotonina, provocou uma clara preferência por sódio que foi explicada pela hiponatremia causada pela secreção inadequada de vasopressina e ocitocina (MAGALHÃES-NUNES et al. 2007). (iii) Em contrapartida, a redução do conteúdo encefálico de serotonina aumentou drasticamente a resposta natriorexigênica evocada pela depleção de sódio, três dias após a administração de pCPA (LIMA et al. 2004). Finalizando essa análise farmacológica, podemos destacar o (iv) papel dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> através da administração aguda e crônica de 8-OH-DPAT periférica e intra-NDR na modulação da ingestão de água e especificamente de sódio. Neste trabalho, os dados obtidos demonstraram que o tratamento agudo 8-OH-DPAT em condições basais e depletados diminuem a transmissão de sinais de saciedade ao sódio. Por outro lado, a administração crônica, possivelmente por uma dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos, promoveu saciedade ao sódio (FONSECA et al. 2009).

Além dos estudos farmacológicos outros modelos foram importantes para discutir efetivamente o papel do NDR no controle da ingestão de água e sal. Tais estudos foram conduzidos pela utilização de lesão no NDR: (v) lesões eletrolíticas da porção ventro-medial do NDR induziram a um aumento da ingestão de salina hipertônica em condições basais, entretanto as observações experimentais foram realizadas por período de três dias. A ingestão de água foi também mais intensa desde a 3<sup>a</sup> hora até a 12<sup>a</sup> hora pós-lesão, tornando-se comparável a dos controles até o 3<sup>o</sup> dia (OLIVARES et al. 2003). Ratos com lesão eletrolítica do NDR desenvolveram intensas respostas dipsogênica e natriorexigênica provocadas pelo modelo FUROCAP (furosemda + baixa concentração de captopril). Estas observações proporcionaram sugestões de que a lesão eletrolítica do NDR suprime uma atividade ascendente inibidora do apetite ao sódio (ou seja, supressão da sinalização serotoninérgica para a saciedade ao sal). Neste trabalho, a lesão foi limitada à região ventro-medial do NDR, onde de acordo com AZMITIA & SEGAL, 1978, concentram-se expressivo contingente de pericários de neurônios serotoninérgicos, que se projetam para o prosencéfalo.

Porém, as fibras axônicas de passagem e neurônios não serotoninérgicos foram também lesionados. Por esta razão, estudos posteriores foram conduzidos visando circunscrever a lesão apenas aos pericários de neurônios localizados na região dorsal da porção ventro-medial do NDR, através da microinjeção local de ácido ibotênico. (vi) As lesões excitotóxicas do NDR produziram qualitativamente as mesmas respostas alcançadas com a lesão eletrolítica e a depleção encefálica de serotonina, tornando a interpretação mais circunscrita e precisa quanto à localização e envolvimento de neurônios originários desta estrutura (CAVALCANTE-LIMA et al. 2005a; 2005b). Neste estudo, quando os animais eram privados de fluidos e alimento, o grupo com lesão no NDR expressou uma intensa resposta de ingestão de salina hipertônica enquanto a resposta dipsogênica foi comparável a

dos controles. Na avaliação da resposta dipsogênica normalmente evocada por isoproterenol, os ratos lesionados apresentaram uma surpreendente resposta apetitiva ao sódio, enquanto a ingestão de água foi comparável a dos controles. Em conjunto, os resultados obtidos em modelos com depleção encefálica de serotonina, lesão eletrolítica ou excitotóxica do NDR revelaram uma elevada sensibilidade encefálica aos paradigmas experimentais que evocam aumento dos níveis plasmáticos de ANGII ou da atividade angiotensinérgica central ao longo da lâmina terminal. Estas observações nos permitiram suspeitar que o déficit no tônus serotoninérgico ascendente pudesse repercutir na supressão de uma importante via moduladora do apetite e/ou indutora da saciedade ao sódio.

Neste mesmo período, trabalhos realizados em outros laboratórios foram importantes para compreender essa via de modulação do sistema serotoninérgico no apetite ao sódio e sede. Estudos de imunoreatividade para a proteína c-Fos e colocalização de ocitocina (OT) demonstraram que além de neurônios do NDR, a área postrema (AP), o núcleo parabraquial lateral (NPBL) e a porção magnocelular do núcleo paraventricular (NPV), particularmente os neurônios produtores de OT são intensamente marcados em ratos depletados de sódio e com acesso livre à salina hipertônica (FRANCHINI & VIVAS, 1995; FRANCHINI et al. 2002; MARGATHO et al. 2007). BADAUÊ-PASSOS et al. (2007) reportaram, utilizando abordagem imunohistoquímica, que o NDR integra informação evocada pela ingestão de sal induzida pela depleção de sódio. REIS (2007) e MARGATHO et al. (2008) propuseram uma modulação integrada da resposta natriorexigênica, cujo substrato neurofisiológico envolveria circuitos neurais entre o NDR e o núcleo NPBL.

Nossas evidências reunidas às de FRANCHINI et al. (2002), GODINO et al. (2005; 2007) e MARGATHO et al. (2008) permitem sugerir preliminarmente que a influência serotoninérgica na saciedade ao sal envolvem a ativação de neurônios ocitocinérgicos no NPV, bem como de neurônios do SFO que expressam receptores AT1 para ANGII.

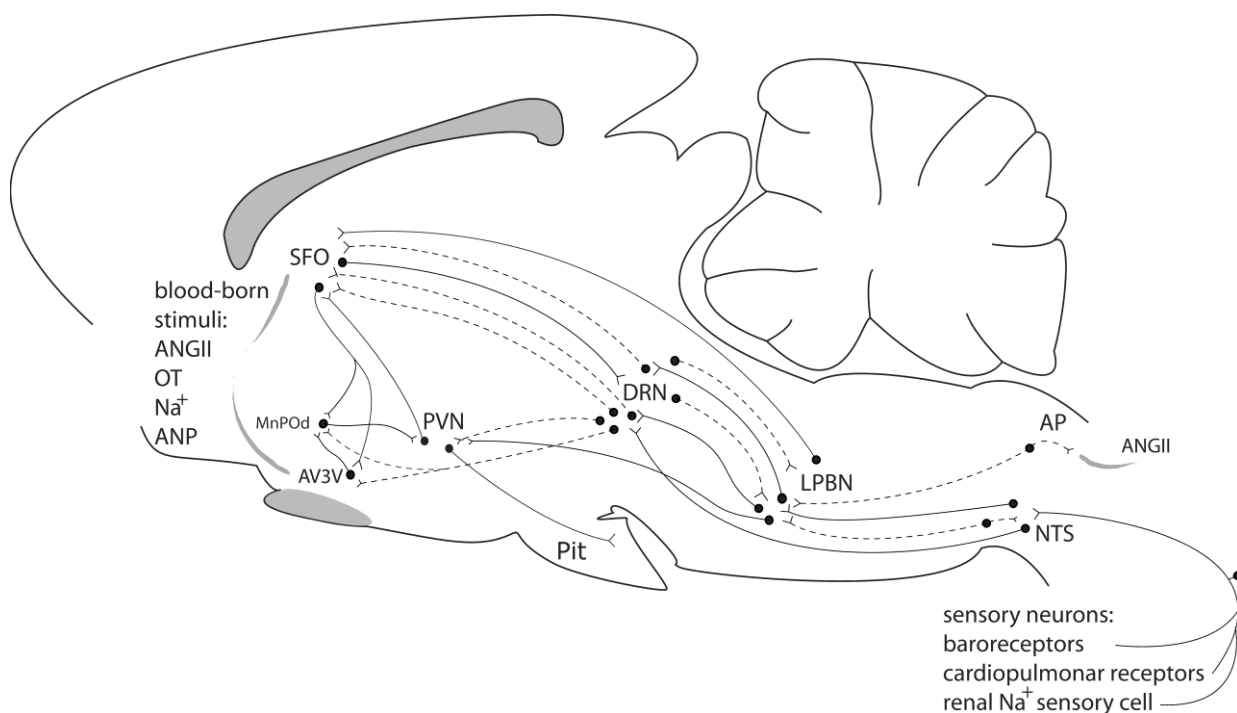


Figura 1- Representação esquemática de secção sagital do encéfalo de ratos mostrando conexões entre área postrema (AP), parede da região antero-ventral do 3º ventrículo (AV3V) núcleo dorsal da rafe mesencefálica (NDR), núcleo parabraquial lateral (LBPN), nucleus tractus solitarius (NTS), pituitária (Pit), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), órgão subfornicial (SFO). As linhas contínuas representam neurônios serotoninérgicos típicos originados no NDR e linhas interrompidas representam neurônios que contêm serotonina (mas não constituem os tipicamente serotoninérgicos) a partir da AP e NTS. Observam-se as conexões bidirecionais entre SFO e DRN entre DRN e LBPN presumivelmente participas com a modulação do apetite ao sódio. Elaboração e digitalização da figura de L.C. Reis, P.L. Cedraz-Mercez & R.H. Costa-e-Sousa (a partir de original publicado nos Anais da Academia Brasileira de Ciências por Reis, 2007).

### 1.3- Sistema serotoninérgico e eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA)

Neurônios serotoninérgicos do NMR e NDR que se projetam ao NPV são importantes sinais envolvidos na alteração do eixo HHA, modulando neurônios produtores CRH (hormônio de liberação de corticotrofina) (LARSEN et al. 1996). Tal efeito é principalmente observado quando grupos de animais em condição basal e após estímulo estressor receberam a administração periférica crônica de antagonista de receptor CRH 1, o que resultou na diminuição de 5-HT em hipocampo, via ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (OSHIMA et al. 2003). Da mesma forma, neurônios produtores de CRH são projetados do NPV para o NDR, e neste há expressão dos receptores de CRH (CHALMERS et al. 1995). Posteriormente, através da técnica de hibridização *in situ* foi observado uma diferença quantitativa entre os subtipos de receptores de CRH, sendo o CRH subtipo 2 mais expresso do que o CRH subtipo 1 na porção medial e caudal do NDR (DAY et al. 2004).

Nessa linha de raciocínio o sistema serotoninérgico parece modular diretamente a liberação de Hormônio Liberador de Corticotrofina (ACTH) pelos corticotrofos

adenohipofisários. Neste sentido foi observado em estudos com cultura de célula de hipófise, que a administração de agonista 5-HT<sub>1A</sub> aumenta a liberação de ACTH e que tal efeito é bloqueado com a administração de propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) com elevada afinidade em receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

O sistema serotoninérgico, além dessa modulação no eixo HHA, parece estimular a liberação de corticosterona (CORT) independente da modulação do eixo, ou seja, de CRH. Tal observação foi demonstrada a partir de experimentos utilizando administração de fenfluramina intravenosa após imunização passiva com anti-soro de CRH (BAUDRIE et al. 1993).

#### **1.4- Sistema serotoninérgico e comportamento**

Alteração da transmissão de serotonina no SNC está relacionada com diferentes distúrbios psiquiátricos, incluindo a depressão, a agressividade impulsiva, medo e distúrbios de ansiedade (WISE et al. 1972; SOUBRIÉ, 1986; HETEM et al. 1997; UMRIUKHIN et al. 2002). O interesse a respeito do sistema serotoninérgico e ansiedade tiveram um marco importante em meados dos anos 1980 em diante, permanecendo até hoje. As principais razões para esse interesse foi através da introdução na prática clínica do ansiolítico buspirona (EINSO & TEMPLE, 1989) e, principalmente, o uso generalizado de antidepressivos, em particular, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, para o tratamento de distúrbios de ansiedade (ARGYROPOULOS et al. 2000).

Somado a isso, os antidepressivos mais prescritos na clínica são moduladores do sistema serotoninérgico. Porém os mecanismos moleculares envolvidos na origem dessas perturbações não são totalmente compreendidos.

A deleção alvo de genes que codificam mediadores da transmissão serotoninérgica tem provado ser uma ferramenta poderosa para entender as contribuições de tais mediadores da regulação das emoções (ARARAGI & LESCH KP, 2013). A utilização de camundongos nocaute para Tph2<sup>-/-</sup> demonstrou uma deficiência encefálica de serotonina comprovada pelos baixos níveis de 5-HT, associado a isso esses animais apresentaram alterações comportamentais como agressão exagerada e no teste Labirinto em Cruz elevado (LCE) foi observado aumento do tempo e do número de entradas no braço aberto interpretados como resposta diminuída da ansiedade (MOSIENKO et al. 2012). Neste sentido, estudos têm proposto a utilização da isoforma de TPH2 como uma nova geração de fármacos antidepressivos, mais seletivo, capazes de regular os níveis de serotonina no cérebro, com menos efeitos colaterais (TORRENTE et al. 2012; MATTHES et al. 2010).

Além da avaliação da participação da TPH2, outra abordagem que tem sido amplamente considerada no estudo sobre circuitaria 5-HTérgica encefálica é a manipulação farmacológica dos receptores serotoninérgicos. Dentre vários, o 5-HT<sub>1A</sub> apresenta papel importante na modulação deste sistema, e consequentemente nas alterações comportamentais. Debate existe sobre qual das populações de receptores (pré ou pós-sináptico) é responsável pelos efeitos da 5-HT na ansiedade. Estudos utilizando camundongos transgênicos para o heteroreceptor (pós-sináptico) 5-HT<sub>1A</sub> no prosencéfalo demonstraram que não há alteração do comportamento de ansiedade nesses animais, já o autoreceptor parece ser necessário para um comportamento normal de ansiedade (PISZCZEK et al. 2013).

Os mecanismos de sinalização do sistema serotoninérgico no desenvolvimento de depressão ainda são pouco compreendidos. Tal mecanismo parece mediar ativação de receptores  $\kappa$ -opiídeos no NDR (LEMOIS et al. 2012), o que parece estar vinculado às respostas adaptativas a exposição ao estresse que dependem de ajustes ao nível de neurotransmissores e neurohormônios que atuam tanto a nível central como periférico

(KORTE et al., 2005). Oscilações nas atividades cerebrais com períodos de minutos a horas pode ser crítica para os o desenvolvimento de distúrbios afetivos como a depressão. Ritmos alterados de neurônios 5HT parece ser um biomarcador para a depressão. Essas alterações têm sido propostas para definir subtipos da doença e prever as respostas ao tratamento com agentes serotoninérgicos (SALOMON & COWAN, 2013).

O sistema serotoninérgico parece ser crítico no desenvolvimento de autismo. Atrelado a isso, a amígdala parece ser uma estrutura encefálica importante nesse processo. Estudos utilizando modelo de autismo em ratos induzido por manipulação farmacológica com valproato, fármaco que aumenta a sinalização gabaérgica. Neste trabalho foram observados que no grupo autista a proporção quantitativa de transportador de 5-HT na amígdala estava aumentada em comparação ao grupo controle. E que o tratamento com agonista 5-HT<sub>1A</sub> aumentou a interação social e memória no grupo autista (WANG et al. 2013).

## **1.5-Hormônios Ovarianos e homeostase hidroeletrólítica**

Abordagem clínicas de edema durante a fase pré-menstrual e gravidez sugerem que o estradiol (E<sub>2</sub>) e progesterona (P<sub>4</sub>) podem desempenhar papéis importantes no balanço de fluidos corporais. O E<sub>2</sub> tende a aumentar e o P<sub>4</sub> diminui o volume plasmático (STACHENFELD et al. 1999). Tais efeitos são mediados por alterações da dinâmica dos fluidos capilares (OIAN et al. 1987) .

Na gravidez ocorrem alterações neuroendócrinas que são essenciais para o seu estabelecimento e manutenção (BRUNTON & RUSSELL, 2010). Estas alterações são fundamentais para proporcionar um ambiente adequado para o embrião/feto. Uma das principais alterações são expansão do volume sanguíneo e alterações metabólicas e imunológicas. Essas alterações são mediadas principalmente por hormônios ovarianos (E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>) e ainda alguns peptídeos. O estudo dos efeitos dos hormônios ovarianos em mulheres jovens e não grávidas nos sistemas fisiológicos é dificultado devido a complexidade das oscilações hormonais ao longo do ciclo menstrual. Dessa forma modelos animais de fêmeas ovariectomizadas (OVX) têm sido utilizados para verificar o efeito desses hormônios isoladamente.

As alterações hormonais durante a gravidez, entre elas o aumento de E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub> que levam à expansão do volume plasmático (ESCHER, 2009). Tal resposta parece ser em parte explicada pela alta afinidade da P<sub>4</sub> nos receptores de aldosterona (MR) (OELKERS, 2004). Além disso, receptores para E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub> são encontrados em estrutura envolvidas na regulação da homeostase hidroeletrólítica, como por exemplo, em neurônios catecolaminérgicos (HERITAGE et al. 1980), sistema cardiovascular (ORSHAL & KHALIL, 2004) e os túbulos renais (DUBEY & JACKSON, 2001). Neste trabalho iremos abordar exclusivamente o efeito da reposição com E<sub>2</sub> nos parâmetros da homeostase hidroeletrólítica e parâmetros comportamentais de ansiedade e atividade psicomotoras.

### **1.5.1-Estrógeno e homeostase hidroeletrólítica**

O estudo do apetite ao sódio tem utilizado múltiplos modelos experimentais, mas o rato (*Rattus norvegicus*), especialmente as linhagens Holtzman e Wistar constitui a mais referida na literatura (FITZSIMONS, 1998). Basicamente o macho tem sido o modelo de eleição para a maioria dos estudos dos mecanismos de regulação do apetite ao sódio. Os estudos da natriorexia em ratas intactas são mais escassos e complexos considerando as oscilações hormonais dos ciclos reprodutivos que influenciam a homeostase hidroeletrólítica.

Dessa forma, os estudos propostos para avaliar o papel dos hormônios ovarianos concentraram-se na análise do ciclo estral de fêmeas e de modelos de animais OVX (ANTUNES et al. 2013). Estudos realizados por Antunes-Rodrigues & Covian em 1963 foram os pioneiros a demonstrar que a ingestão espontânea de sódio diminui durante o estro e aumenta durante diestro. Mediante a variação especificamente dos estrógenos nessas duas fases do ciclo, grande parte dos estudos têm reportado o papel deste na regulação hidroeletrólítica. O tratamento com E2 atenua a ingestão de água em animais OVX em vários desafios homeostáticos (VIJANDE et al. 1978; CARLBERG et al. 1984; KRAUSE et al. 2003). Neste sentido, em 1973 tornou-se evidente que a ingestão de sal era regulada pelo E2 (FREGLY, 1973).

O papel do E2 na homeostase hidroeletrólítica parece envolver principalmente a inibição dos sistemas indutores, como sistema renina angiotensina central e periférico (FITZSIMONS, 1998). Adicionalmente, o E2 estimulação dos sistemas inibidores, tais como serotoninérgicos (RUBINOW et al. 1998; HIROI et al. 2006; DONNER & HANDA, 2009) e ocitocinérgicos (SIMONIAN et al. 1997; HRABOVSKY et al. 2004). Neste sentido há ainda o envolvimento de Arginina vasopressina (AVP) (SOMPONPUN et al. 2004; MECAWI et al. 2011).

#### **1.5.1.1-Papel do estrógeno na modulação do sistema renina angiotensina (SRA)**

Discutindo o papel do E2 na regulação hidroeletrólítica, ratas castradas exibem exagerada resposta de apetite ao sódio comparativamente às intactas e aos machos (FITZSIMONS, 1998). Essa resposta parece ser dependente do papel do sistema angiotensinérgico central e periférico. Adicionalmente, evidências experimentais têm revelado que o envolvimento do E2 nas ingestões de água e sal, na maioria das vezes está relacionado com sua ação sobre o SRA central (FREGLY & THRASHER, 1978; FINDLAY et al. 1979; JONKLAAS & BUGGY, 1985 ; KENSICKI et al. 2002; MECAWI et al. 2007; 2008). O tratamento de ratas OVX com E2 diminui a interação de ANGII em receptores AT1 em sítios prosencefálicos relacionados com a deflagração da sede, do apetite ao sódio e regulação da pressão arterial (JONKLAAS & BUGGY, 1984; 1985; FITZSIMONS, 1998). O tratamento subcrônico com E2 em ratas OVX por 7 dias reduz a ingestão de água induzida por ANGII ou isoproterenol (FREGLY & THRASHER, 1978; FITZSIMONS, 1998). Adicionalmente, a administração subcutânea (s.c) aguda de E2 reduz a ingestão espontânea de água (FINDLAY et al. 1979; FITZSIMONS, 1998). A injeção de benzoato de estradiol na região ântero-ventral do 3º ventrículo (AV3V) de ratas OVX diminui a sensibilidade à resposta dipsogênica provocada por ANGII, mas não por microinjeção i.c.v. de carbachol ou por administração s.c. de salina hipertônica. Neste sentido, a administração i.c.v. de E2 em ratas OVX atenua a resposta pressórica induzida pela injeção i.c.v. de ANGII (JONKLAAS & BUGGY, 1984; 1985; FITZSIMONS, 1998). Nesta mesma linha de raciocínio, a administração sistêmica de E2 inibe a resposta natriorexigênica induzida pela privação de sódio em ratas OVX (STRICKER et al. 1991; FITZSIMONS, 1998).

Recentemente (MECAWI et al. 2008) demonstraram que a terapia estrogênica ou o bloqueio AT1 central reduzem drasticamente as respostas comportamentais, particularmente de ingestão de sal durante o período noturno, período em que a atividade angiotensinérgica central é mais proeminente em ratos. De acordo com esses achados, a influência do “status” estrogênico na sinalização central parece ser mediada pela inibição de receptores AT1 testados por de diferentes paradigmas experimentais.

A incidência da hipertensão, particularmente aquela dependente do consumo de sal aumenta na mulher no período pós-menopausa, em ratas OVX, em cadelas e possivelmente em fêmeas de outras espécies durante a senescência (TIPPETT et al. 1987; CLARK et al.

2004; RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004; SANSOM et al. 2004; HINOJOSA-LABORDE et al. 2000; 2004; NSOG et al. 2005). Tais efeitos parecem ser dependentes do papel protetor do E2 na modulação da expressão de receptores AT1 no prosencéfalo (KISLEY et al. 1999).

#### **1.5.1.2-Relação entre estrógeno e sistema serotoninérgico na homeostase hidroeletrolítica**

Observações recentes no campo da neurobiologia da depressão têm dirigido atenção à plasticidade do sistema serotoninérgico em ratas OVX, comparando-as com aquelas tratadas cronicamente com E2. Neste sentido, vários estudos têm reportado o papel do E2 na modulação do sistema serotoninérgico (RUBINOW et al. 1998; HIROI et al. 2006; DONNER & HANDA, 2009; ;SUZUKI et al. 2013; LU & BETHEA, 2002; ROBICHAUD & DEBONNEL, 2005; ROSSI et al. 2010; MCQUEEN et al. 1997; SUMNER et al. 1999). Tal papel parece exercer influências em todos os sistemas fisiológicos regulados pela 5-HT. Dentre esses sistemas, iremos reportar nessa avaliação o efeito na homeostase hidroeletrolítica.

Estudos têm demonstrado que o E2 modula a síntese e liberação de 5-HT (RUBINOW et al. 1998). Em relação à síntese de 5-HT, o E2 aumenta a expressão de TPH2 em distintas subregiões do NDR (HIROI et al. 2006). Tal efeito parece ser dependente da ativação de receptores  $ER\beta$  (mas não  $ER\alpha$ ) pelo E2 no NDR (DONNER & HANDA, 2009; SUZUKI et al. 2013). O tratamento de macacas OVX com E2 + progestágeno aumentou a neurotransmissão serotoninérgica, em parte por diminuição (infra-regulação) da expressão de autorreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub> no NDR (LU & BETHEA, 2002). E ainda o tratamento com E2 restaura a sensibilidade da atividade neuronal serotoninérgica (menor responsividade à retro-alimentação negativa) aos agonistas 5-HT<sub>1A</sub>, em camundongos OVX (BOUALI et al. 2003). A administração i.c.v. de E2 aumenta a frequência de descarga de neurônios serotoninérgicos do NDR (ROBICHAUD & DEBONNEL, 2005). Evidências experimentais mostraram que o uso de agonista dos receptores  $ER\beta$  é capaz de levar a dessensibilização do autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> no núcleo paraventricular (ROSSI et al. 2010). O E2 ainda aumenta a expressão de 5-HT transportador (SERT) no NDR de animais OVX (MCQUEEN et al. 1997; SUMNER et al. 1999). Estas ações aumentam a transmissão serotoninérgica, que como já discutido no item 2, é um dos principais sistemas fisiológicos de regulação da homeostase hidroeletrolítica.

Neste contexto, o envolvimento do sistema serotoninérgico na regulação do apetite ao sódio foi observado em ratas no estro e OVX-E2, onde foi evidenciada uma redução da ingestão de salina hipertônica neste grupo em condição de depleção de sódio. Atrelado a isso foi demonstrado um aumento da imunoexpressão de c-Fos/5-HT no NDR e c-fos no OVLT. Tal achado suporta hipótese da interação entre os neurônios excitatórios do OVLT e os neurônios inibitórios do NDR modular a resposta de saciedade ao sódio (DALMASSO et al. 2011). Esta interação parece desempenhar um papel na regulação do apetite e saciedade ao sódio. Essa hipótese é sustentada por uma possível modulação do E2 em exclusivo grupamento de neurônios serotoninérgicos segundo avançada concepção de ABRAMS et al. (2004) e CLARCK et al. (2006) de distintas e exclusivas funções moduladoras de comportamentos para diferentes sub-núcleos do NDR.

A interação entre a modulação estrogênica na atividade do sistema serotoninérgico interferindo na homeostase hidroeletrolítica é pouco conhecida. Dessa forma nosso alvo de estudo é compreender os mecanismos fisiológicos da associação da terapia substitutiva com E2 e um fármaco que altera a atividade serotoninérgica numa condição de desafio

homeostático. Nesse tripé os efeitos colaterais de associação de alguns fármacos podem acarretar resultados drásticos na manutenção da homeostase dos organismos vivos.

#### **1.5.1.3-Relação entre estrógeno e sistema ocitocinérgicos e vasopressinérgico na homeostase hidroeletrólítica**

Além do efeito direto do E2 sob o sistema serotoninérgico interferindo na atividade, síntese e liberação de 5-HT, podemos ainda destacar a modulação estrogênica via os núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO), destacando aqui os sistemas ocitocinérgicos e vasopressinérgicos. Evidências atuais corroboram a hipótese de que, além de um efeito natriurético da OT, esta apresenta um papel inibitório no controle do apetite ao sódio (AMICO et al. 2001). De fato, a administração central de OT diminui a ingestão de sal (STRICKER & VERBALIS, 1996). Sabe-se também que o estímulo osmótico determina um aumento na liberação de AVP e OT em ratos, uma vez que a ativação dos núcleos NPV e NSO, responsáveis pela síntese destes hormônios, pode ser mantida por estímulo osmótico crônico, por ingestão de solução salina hipertônica, ou por privação hídrica, sendo revertida pela ingestão de água (MIYATA et al. 1994). Estudos avaliando efeitos de OT em modelos de dieta hipossódica (MECAWI et al. 2013) e de expansão de volume (RUGINSK et al. 2007) demonstraram uma possível relação entre níveis plasmáticos de OT e efeito antinatriorexigênico.

A mudança na concentração plasmática da AVP observada em tratamento com esteróides depende tanto da dose quanto do tempo de duração do tratamento com E2. Doses elevadas de E2 promovem uma diminuição da concentração AVP no plasma, independente do tempo de duração (PEYSNER & FORSLING, 1990). Recentemente estudos realizando análise imunohistoquímicas mostraram que animais submetidos a paradigma de estimulação osmótica (expansão de volume extracelular) resultam em aumento significativo da marcação de neurônios Fos/ocitocina positivos e Fos/vasopressina positivos no NPV e NSO. Tal efeito foi potencializado pela reposição de E2 (VILHENA-FRANCO et al. 2011). Outro modelo experimental realizado por MECAWI et al. (2011), avaliaram o efeito do E2 em ratos submetidos a redução de volume através do choque hemorrágico. A hemorragia induziu aumento da ativação de neurônios OT e AVP na região magnocelular do NPV e do NSO, e de neurônios AVP na região parvocelular medial do NPV.

Observações experimentais fornecem evidências de expressão diferencial de receptor ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  no SNC (SIMONIAN et al. 1997). Tal diferença possivelmente tem uma importância fisiológica na resposta de determinadas estruturas cerebrais ao E2. Estudos neuroanatômicos têm fornecido informações detalhadas sobre a distribuição topográfica e abundância celular de ER- $\beta$  no NPV e NSO em neurônios OT e AVP em ratos. Estudo realizado HRABOVSKY et al. (2004) evidenciaram maiores proporções de ER- $\beta$  em neurônios magnocelulares e parvocelulares vasopressinérgicos do que ocitocinérgicos em topografia cerebrais similares em ratas OVX. Tal resultado possivelmente indica diferenças entre a capacidade de resposta ao E2 em distintas populações neuronais OT e AVP. Com relação ao receptor ao papel do ER- $\alpha$  nesta resposta fisiológica, este parece modular os neurônios OT e AVP do NPV por um mecanismo indireto devido à ação de elementos osmossensíveis localizados ao longo da lâmina terminal (SOMPONPUN et al. 2004).

## **1.6-Hormônios Ovarianos e comportamento Emocional**

Durante o ciclo menstrual em seres humanos e do ciclo estral em roedores, os níveis séricos E2 e P4 variar num padrão rítmico (GOLDMAN et al. 2007). A influência dos hormônios ovarianos no comportamento emocional tem sido alvo de muitos estudos. Os hormônios ovarianos têm efeitos pleiotrópicos no encéfalo e no corpo. A situação em que esses efeitos das oscilações hormonais podem ser mais evidenciados é alterações fisiológicas. Essas alterações podem ser representadas por retirada precoce dos ovários e com o envelhecimento e o aparecimento de senescência reprodutiva, o que pode produzir mudanças na qualidade de vida.

Os esteróides ovarianos (E2 e P4) tem sido associado a comportamentos de medo e a ansiedade em seres humanos e animais, embora os mecanismos fisiológicos não são totalmente esclarecidos. Em algumas situações esses hormônios apresentam efeitos antagônicos entre si, onde P4 antagoniza E2 em resposta de ansiedade e medo (HIRONI & NEUMAIER, 2006). A P4 parece estar envolvida especificamente em respostas ansiogênicas (GALEeva et al. 2003) mas efeitos ansiolíticos tem sido descritos como resultado das suas ações não genômicas (FRYE et al. 2006). O E2 exerce um efeito ansiolítico predominantemente (TETEL & PFAFF, 2006; WALF & FRYE, 2010) apesar de haver evidências de ações ansiogênicas mediadas por receptores de membrana (KASTENBERGER et al. 2011). Neste sentido, tem sido descrito que o efeito do E2 nestas desordens parece ser em parte, devido à modulação de neurotransmissores centrais como dopamina e serotonina em modelos de subordinação social (ASHER et al. 2013).

### **1.6.1 Estrógeno e sistemas neuroendócrinos de regulação do estresse modulado pela corticosterona**

O papel do estrógeno no eixo HHA tem sido amplamente estudado. Essa investigação tem sido consolidada a partir de dados epidemiológicos com relação às respostas ao estresse gênero específicas. Além disso, há uma diferença de gênero na etiologia de desordens de humor com incidência em fêmeas, de duas a três vezes maiores do que em machos.

Evidências experimentais utilizando antagonista de E2 demonstraram um aumento significativo de ACTH e CORT plasmático no modelo de estresse de contenção. Estes dados sugerem que o E2 parece ser um fator de inibição importante na resposta ao estresse de fêmeas (YOUNG et al. 2001). Em condição de estresse agudo e crônico estudo tem evidenciado diferenças estatísticas entre os grupos OVX e OVX-E2 na resposta ao estresse. Esse estudo avaliou a essa resposta ao estresse através da expressão da proteína Fos no NPV, e os autores observaram que tanto o estresse agudo quanto crônico aumentou a expressão de Fos. Em contrapartida, a reposição com E2 reduziu o número de células Fos positiva no NPV (GERRITS et al. 2005). Posteriormente, outros autores evidenciaram que essa modulação era mediada pela CORT, pois ratas OVX-E2 apresentam aumento significativo da imunoreatividade para c-fos no NPV de ratos submetidos ao teste de supressão a dexametasona (WEISER & HANDA, 2009).

Mediante as ações do E2 no HHA, estudos vinculados à expressão do tipo de receptor foram desenvolvidos para esclarecer as bases fisiológicas envolvidas em cada resposta a modulação estrogênica. Estudos têm mostrado que o receptor ER- $\beta$  no NPV parece ser crítico para modulação de resposta do eixo HHA ao estresse, dependente de CORT circulante (ISGOR et al. 2003). Neste sentido, o receptor ER- $\alpha$  no NPV parece ser crítico para inibir a retroalimentação negativa exercida pela CORT.

## 1.6.2- Estrógeno e Comportamento Emocional

O E2 tem sido descrito por exercer inúmeras influências sobre vários circuitos cerebrais. Durante o ciclo menstrual em mulheres são observadas alterações emocionais (TOUFEXIS et al. 2006). Depressão e ansiedade ocorrem com bastante frequência em mulheres na menopausa. A reposição com E2 tem provado ser benéfica em vários casos de transtornos de humor durante a menopausa, porém há alguns efeitos adversos da terapia, tal como a ansiedade e disforia. De fato, algumas mulheres sentem-se melhor com baixos níveis de estrogênio ou mesmo quando há oscilações do mesmo (DEMETRIO et al. 2011).

Neste sentido, estudos têm sido propostos para identificar os receptores responsáveis pelos efeitos adversos observados na terapia de reposição com E2. Enquanto os efeitos ansiolíticos do tratamento com estrogênio são principalmente atribuída aos receptores nucleares (TETEL & PFAFF, 2006) os efeitos ansiogênicos parecem depender de mecanismos não genômicos. Observações experimentais demonstraram que estimulação específica do GPR30 (receptor de membrana acoplado a proteína G) em macho e fêmea OVX induziu efeitos ansiogênicos (KASTENBERGER et al. 2011). Estudo recente sugere que o receptor GPR30 é altamente expresso em neurônios do NPV de ratos, envolvido na atenuação da sinalização de 5-HT1A (XU et al. de 2009).

Vários estudos mostraram efeitos ansiolíticos do estradiol nos testes comportamentais, mas os mecanismos subjacentes não são totalmente claros. Estudos têm demonstrado que esse efeito parece envolver a circuitaria monoaminérgica e gabaérgica principalmente. Esse estudo comparativo utilizou ratas intactas na fase do proestro (elevado níveis de estrógeno), ratas OVX-E2 e OVX. O comportamento ansiolítico foi observado em ratas OVX-E2 em comparação ao grupo OVX. Já com relação ao grupo na fase do proestro foi observada uma resposta panicolítica. Esse estudo ainda demonstrou que ratas OVX-E2 apresentam elevada expressão de TPH2 no mesencéfalo, resultado que demonstram um possível envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação estrogênica (PANDARANANDAKA et al 2008). O efeito do estrógeno na alteração do comportamento pode ser via modulação do sistema gabaérgico. Com efeito, ratas OVX apresentam esquivas inibitórias prejudicadas (resposta ansiogênica) no LCE, enquanto a latência de fuga não foi afetada (resposta panicolítica). Tais resultados foram acompanhados com aumento de receptor GABAA- $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$  em grupos OVX no mesencéfalo em relação aos grupos OVX-E2 (DAENDEE et al. 2013)

Resultados controversos relacionados com a eficácia da terapia de reposição estrogênica para aliviar a depressão são frequentemente relatados. Dessa forma, estudos têm sido propostos para esclarecer os efeitos fisiológicos do tempo de tratamento bem como a dose utilizada de E2. Além disso, outro questionamento é acerca do início da reposição após a ovariectomia que simularia a menopausa. Nesta linha de raciocínio, evidências mostraram que ratos OVX por apenas uma semana apresentaram aumento do comportamento depressivo. Esse comportamento foi revertido com a administração de fluoxetina, um inibidor da receptação de serotonina, em 1, 3 e 12 semanas de tratamento e a reposição com 17- $\beta$ -estradiol apresentou ação antidepressivas. Essas ações antidepressivas ocorreram apenas 12 dias após o tratamento (ESTRADA-CAMARENA et al. 2011). O tratamento com antagonista de E2 induziu comportamentos depressivos testados através do teste de nado forçado. Enquanto a reposição hormonal (E) parece ser um potente protetor contra a depressão (TEREK et al. 2012).

Neste trabalho, focaremos na modulação do E2 no sistema serotoninérgico e com isso consideraremos um importante aspecto translacional que é investigar o papel do E2 no equilíbrio hidroeletrólítico, através de uma abordagem que interajam alguns fatores que podem ser associados na clínica, como reposição hormonal (E2), antidepressivo (agonista 5-HT1A) e diurética (furosemida).

Frente as aspectos abordados nessa introdução, propomos testar as seguintes hipóteses:

- 1) O tratamento subcrônico e com dose elevada de E2 é capaz de induzir inibição de apetite por sódio e sede, diminuição da excreção renal de sódio e ingestão alimentar/variação de peso diariamente via atividade/sinalização do sistema serotoninérgico.
- 2) A reposição subcrônica e com dose elevada de E2 associada ao tratamento crônico com agonista de 5-HT1A é capaz de potencializar os efeitos periféricos e centrais do sistema serotoninérgicos na homeostase hidroeletrolítica após depleção de sódio.
- 3) O tratamento crônico com agonista de 5-HT1A associado à reposição com E2 altera os parâmetros comportamentais de ansiedade e atividade exploratória.

## 2-OBJETIVO

**2.1-Geral:** Examinar o efeito do uso crônico de um agonista de receptor 5-HT1A na resposta hidroeletrolítica, neuroendócrina em ratas OVX em condição basal e após depleção de sódio e alterações comportamental em ratas OVX em condição basal e, adicionalmente, investigar a influência da terapia estrogênica mediante este desafio homeostático.

### 2.2-Específicos:

2.2.1- Avaliar o efeito do tratamento crônico com agonista 5-HT1A em ratas OVX e OVX-E sobre Ingestão de água e sódio, volume urinário, excreção renal de sódio, sódio plasmático, Ingestão de alimento e ganho de peso diário.

2.2.2- Avaliar o efeito do tratamento crônico com agonista 5-HT1A em ratas OVX e OVX-E em condição basal e após depleção de sódio sobre a (s):

- (i) Ingestão de água e sódio, volume urinário, excreção renal de sódio, sódio plasmático, osmolalidade, hematócrito e proteína plasmática.
- (ii) Concentrações plasmáticas de ANG I, ANG II, AVP, OT, ANP e corticosterona.
- (iii) Expressão do RNAm para TPH2, GAD e 5-HT1A no NDR.
- (iv) Síntese de TPH2.

2.2.3- Avaliar o efeito do tratamento crônico com agonista 5-HT1A em ratas OVX e OVX-E nos parâmetros comportamentais:

- (i) Comportamento de ansiedade pelo labirinto em cruz elevado
- (ii) Atividade exploratória pelo campo aberto

### 3-JUSTIFICATIVA

O presente projeto integra a linha de pesquisa **Influência do Sistema Serotoninérgico no Mecanismo de Saciedade ao Sal** na qual investigamos os mecanismos centrais implicados com o controle da sede e do apetite ao sal, e as respectivas respostas ingestivas comportamentais, bem como, as respostas excretoras renais. Portanto, no presente estudo avaliamos a influência da reposição estrogênica subcrônica sobre as respostas comportamentais induzidas numa situação experimental de tratamento crônico com um agonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, bem como investigamos os mecanismos implicados com o controle neuroendócrino da ingestão de sal e água em ratas OVX. Neste contexto, damos continuidade aos estudos que objetivam compreender o papel do sistema serotoninérgico centrais na regulação da ingestão de água e sal, particularmente no processamento de sinais víscero-sensoriais e na transmissão de informações às estruturas proscerebrais que participams com a gênese da sede e do apetite ao sódio e na ativação de mecanismos autonômicos e neuroendócrinos reguladores da excreção de água e sódio (REIS et al. 1994; BADAUÊ-PASSOS et al. 2001; 2003; LIMA et al. 2004; OLIVARES et al. 2003; CAVALCANTE-LIMA et al. 2005a; 2005b; REIS 2007; FONSECA et al. 2009). E adicionalmente avaliar o “status” do comportamento de ansiedade e locomoção da associação da reposição estrogênica ao tratamento crônico com 8-OH-DPAT.

## **4-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1-Apreciação Bioética da Experimentação Animal no Projeto**

O presente projeto está enquadrado em linha de pesquisa do Departamento de Ciências Fisiológicas e foi previamente analisado pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP-UFRRJ, processo número 23083.006757/2010-10).

Todas as manipulações experimentais foram executadas em consonância com o Guide for the Use of Laboratory Animals, publicado por USA National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revisado em 1996) e de acordo com a Lei número 11794 de 8 de Outubro de 2008. Abaixo são discriminados aspectos técnico-científicos para a avaliação bioética da experimentação animal.

- 1) Nos grupos experimentais descritos no projeto em questão foram utilizados 6 a 14 animais (por grupo). Neste estudo foram pouco frequentes os protocolos com amostragem acima de 10 animais. A utilização de eventuais amostragens com um número maior foi necessária para minimizar a elevada variância que se verifica em alguns fenótipos fisiológicos avaliados. Este item é executado de acordo com os princípios dos 3 Rs estabelecidos por RUSSELL & BURCH (1959) e transformados em alternativas por SMYTH (1978).
- 2) Para coleta dos tecidos e plasma os animais foram decaptados.
- 3) Os animais sobreviventes dependendo do protocolo experimental tiveram o destino que se segue:
  - a) Eutanásia com anestésico geral (tiopental sódico, 100 mg/kg, ip) e posterior condicionamento em sistema de refrigeração (congelador) até a data da incineração no Instituto de Veterinária ou doação (espontânea ou de acordo com solicitação) para o CETAS-IBAMA, Seropédica.
  - b) Descarte e doação (espontânea ou por solicitação) ao CETAS-IBAMA, Seropédica ou outras entidades e órgãos institucionais com o objetivo de alimentação de répteis ou aves de rapina.

Finalizando essa abordagem, é importante ressaltar que todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e proporcionar bem estar aos animais utilizados nesse estudo.

### **4.2-Animais utilizados**

Foram utilizadas ratas Wistar, albinas, com peso 200-250g no ato da ovariectomia. O número, ou seja, o N experimental variou de 6 a 14 animais por grupos. Os animais foram mantidos em gaiolas contendo alimento (ração peletizada padrão, Purina) e bebedouro contendo água *ad libitum*. As gaiolas foram colocadas no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRuralRJ ou no boitério do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP. Nesta sala os animais são habituados com um sistema de controle do ciclo claro/escuro que inicia as 19:00 e termina as 7:00 (12 horas claro: 12 horas escuro) e temperatura ambiental ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ).

### **4.3-Procedimentos cirúrgicos de Ovariectomia**

Todos os animais utilizados foram submetidos à ovariectomia (OVX) de acordo com os trabalhos listados (MECAWI et al. 2007; MECAWI et al. 2008; MECAWI et al. 2011; VILHENA-FRANCO et al. 2011) que utilizam somente animais OVX. A ovariectomia foi

realizada em ratas anestesiadas (quetamina, 60 mg/kg + xilazina, 7,5 mg/kg, IP). A pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na linha média próxima ao nível dos rins, abaixo da última costela. Imediatamente o ovário foi identificado e exteriorizado. Em seguida foi executada a ligadura das tubas uterinas e artérias ovarianas, e em seguida foi realizada a retirada dos ovários. As tubas uterinas foram reposicionadas dentro do abdome e foi realizada a sutura local. Após cirurgia os animais foram tratados com dose profilática de pentabiótico veterinário (Fort Dodge Saúde Animal) sendo que a via de administração utilizada foi subcutânea (SC) e posteriormente os animais foram mantidos em gaiolas coletivas.

#### 4.4-Terapia substitutiva:

##### 4.4.1-Tratamento com estrogênica

As ratas ovariectomizadas foram divididas em dois grupos experimentais, a saber: (i) Grupo de ratas ovariectomizadas (OVX); (ii) Grupo de ratas ovariectomizadas tratadas com benzoato de estradiol (OVX-E2). O Ciprionato de estradiol foi solubilizado em veículo oleoso sendo utilizado o óleo vegetal de milho (20 µg/animal, SC, diariamente, durante duas semanas). Nosso grupo, todavia, utiliza uma dose suprafisiológica mimetizando os níveis de estrógeno circulante em fêmeas no último terço de gestação. A aplicação consistiu em um volume de 0,1 ml/animal. Dessa forma o grupo controle representado por ratas OVX foi tratado com o veículo (0,1 ml/animal, SC).

##### 4.4.2-Avaliação da substituição hormonal

Para essa avaliação determinamos o peso relativo do útero dos animais comparando o grupo OVX-E2 e OVX. De acordo com a figura e gráfico abaixo, podemos avaliar a confirmação da reposição, uma vez que um dos principais efeitos do estrógeno é promover hipertrofia uterina, que resulta no aumento do peso relativo, dado este observado no grupo OVX-E2. Podemos verificar um aumento significativo do peso uterino do grupo OVX-E2 que nos norteia a afirmar a efetiva reposição hormonal nestes grupos.

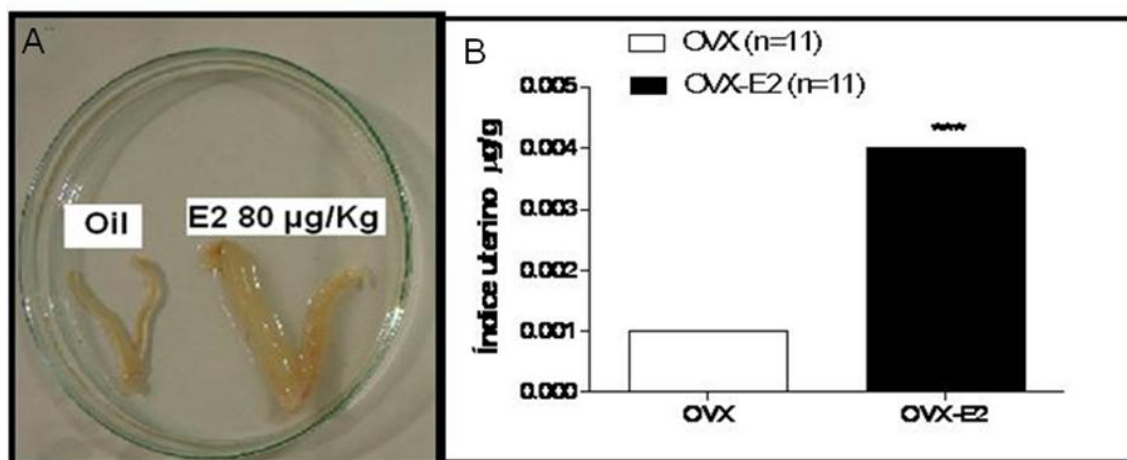


Figura 2: A Comparação qualitativa e B: Comparação quantitativa da reposição hormonal.

## **4.5- Fármacos utilizados**

### **4.5.1-Para avaliar o sistema serotoninérgico**

O 8-hidroxi-2-di-n-propilamino tetralina (8-OH DPAT), um agonista de receptor 5-HT1A (adquirido da Sigma-Aldrich), foi dissolvido em salina isotônica 0,9% (veículo). O tratamento com 8-OH DPAT foi realizado pela via de administração intraperitoneal (IP) na dose de 250µg/Kg durante sete dias.

### **4.5.2-Depleção de sódio**

Metade dos grupos experimentais foi submetida ao procedimento padrão para depleção de sódio através da administração de furosemida (20 mg/kg, SC) uma substância diurética/natriurética, inibidora do co-transporte  $1\text{Na}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ ,  $1\text{K}^+$  no ramo ascendente espesso da alça de Henle. Durante 24 h os animais tiveram acesso à água destilada e dieta alimentar pobre em NaCl (fubá). Devido ao seu potente efeito natriurético/diurético, a furosemida é amplamente empregada como modelo exequível de indução de hiponatremia e hipovolemia em ratos, objetivando induzir a avidez por sal, ou seja, o apetite ao sódio (FITZSIMONS, 1998; BADAUÊ-PASSOS et al. 2003; 2007; OLIVARES et al. 2003; CAVALCANTE-LIMA et al. 2005a; 2005b; REIS, 2007; FONSECA et al. 2009).

## **4.6-Aferição da ingestão de água e sódio e coleta de urina**

A aferição da ingestão de água e sódio (através da oferta de NaCl, 1,8%) foi realizada em gaiolas metabólicas dotadas de bebedouros volumétricos. A salina hipertônica é normalmente aversiva ao paladar de ratos. A ingestão de fluidos é expressa em ml/100g por períodos variáveis, de acordo com o protocolo experimental (diária e 30, 60, 120 minutos após a reapresentação de fluidos). O índice de preferência por sódio foi quantificado pelo volume de ingestão de salina hipertônica dividido pelo volume de fluidos totais (volume de salina hipertônica + volume de água).

A coleta da urina foi realizada diariamente e no dia do experimento no tempo 0 que corresponde ao período anterior à oferta de fluidos. Após a oferta de fluidos a urina foi coletada no tempo de 120 minutos. A coleta da urina, além de mensurar o volume urinário, também foi utilizada para verificar concentrações urinárias de sódio.

## **4.7-Coleta de sangue**

A coleta do sangue foi realizada por decapitação. O sangue foi colocado em três tubos, (1) em tubos de micro-hematócrito para mensuração de hematócrito, (2) no tubo contendo heparina (10 µL/mL), para avaliação de proteína, sódio, osmolalidade plasmática, CORT, AVP, OT e (3) tubos contendo inibidores de peptidases para as dosagens de ANP, ANG I e II. Esses inibidores são basicamente constituídos de benzoato p-hidroximercurio 1 mM, 10-fenantrolina 30 mM, PMSF 1 mM, pepstatina A 1 mM, EDTA 10% sendo todo procedimento realizado sobre gelo. O plasma foi obtido após centrifugação (20 minutos, 3000 rotações/min a 4 °C) e estocado a -20 °C até o momento dos procedimentos padrões para realização da mensuração por técnicas específicas.

#### **4.7.1-Avaliação de hematócrito, osmolalidade, proteína e sódio plasmático.**

Para aferição do hematócrito, o sangue foi coletado em tubos de microhematócrito e centrifugado (centrífuga FANEM) durante cinco minutos. Em seguida, foi utilizada uma escala de microhematócrito para determinação do mesmo.

Para a determinação da osmolalidade plasmática foram utilizados 350 microlitros de plasma em um osmômetro de bancada (GONOTEC).

Para dosagem de proteínas plasmáticas, o plasma foi diluído (1:200) e foram utilizados 10 microlitros do plasma diluído associado a 200 microlitros do corante diluído (1:5) em um leitor de ELISA (BIORAD).

Para quantificação do  $\text{Na}^+$  plasmático o plasma foi diluído (1:100), já com relação  $\text{Na}^+$  urinário a urina foi diluída (1:200) e imediatamente após a diluição, o  $\text{Na}^+$  foi dosado em um fotômetro de chama (modelo MICRONAL b262).

Todas as aferições mencionadas foram realizadas em duplicata.

#### **4.7.2-Procedimentos para dosagens hormonais**

##### **4.7.2.1-Extração de hormônios**

Todos os procedimentos de extração foram realizados sobre gelo.

##### **4.7.2.1.1- AVP e OT.**

A AVP e OT foram extraídos do plasma com acetona e éter de petróleo: 1 mL de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 mL de acetona gelada (MercK, Brasil), seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min, 4°C); posteriormente, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido à agitação e reservado durante 2 min; o sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo AVP e OT foi submetido ao processo de liofilização. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspensão com 250  $\mu\text{L}$  de tampão do ensaio.

##### **4.7.2.1.2- Corticosterona.**

A extração de corticosterona foi realizada a partir da adição de 1 mL de etanol (4 °C) a 25  $\mu\text{L}$  de plasma, sendo logo em seguida submetido à centrifugação (2500 rpm, 15 min, 4°C). Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e liofilizado. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspensão com 1,5 mL de tampão do ensaio e pipetado em duplicata.

##### **4.7.2.1.3- ANG I, ANGII e ANP.**

Nesta extração foram utilizados 1 mL de plasma que foi imediatamente acidificado com 2 mL de TFA. As extrações de ANP, ANG I e II foram realizadas em colunas Bond-Elut (Peninsula Laboratories, EUA). Essas colunas foram submetidas a uma pré-ativação com 4

mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% (solução A) seguido de 20 mL de TFA 0,1% (solução B). Após esse procedimento as amostras de plasma foram colocadas individualmente nas colunas e eluídas novamente com mais 20 mL de solução B. Os peptídeos absorvidos foram então eluídos em 3 mL de uma solução a 60% de acetonitrila em TFA 0,1%, sendo coletados em tubos com dimensões 12 x 75 mm e liofilizados. No momento do ensaio, o liofilizado foi ressuspense em 400 µL de tampão de ensaio.

#### **4.7.2.2-Eficiência da extração dos hormônios.**

Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de (~ 25.000 cpm) do peptídeo marcado (com 125I) foi adicionada a 1 mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado foi acima de 80%. Os anticorpos específicos para ANG I e II, AVP e OT foram obtidos a partir da Peninsula Inc. (San Carlos, CA, USA; ANG I: T4166; ANG II: T4007; AVP: T4561; e OT: T4084), e aquele para ANP foi gentilmente cedido por Jolanta Gutkowska (Hotel Dieu, University of Montreal, Canada). O anticorpo específico para CORT foi adquirido da Sigma (Missouri, USA) especificação 1,2,6,7-3H-corticosterone da empresa americana GE Healthcare Life Sciences (New Jersey, USA).

#### **4.8-Radioimunoensaio**

Todas as dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios específicos usando as técnicas descritas por ELIAS et al. (1998), HAANWINCKEL et al. (1995), GUTKOWSKA et al. (1984), VECSEI (1979), MOREIRA et al. (1987), BOTELHO et al. (1994), para AVP, OT, ANP e ANGII.

Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata.

Inicialmente devemos salientar que a metodologia descrita acima está implementada e tem sido rotineiramente utilizada no laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Aplicada do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP.

#### **4.9-Coleta do tecido ecefálico**

Os cérebros foram retirados da calota craniana e imediatamente congelados em gelo seco. Em seguida foi realizado o “punch” do inglês que significa uma punção para retirada do NDR em criostato de acordo com as coordenadas PAXINOS & WATNSO (2004). Posteriormente os cérebros foram conservados a -80 °C até o momento da extração do RNAm para o RT-PCR. Todo o procedimento foi realizado em condição livre de RNase.

##### **4.9.1-PCR em tempo real**

As disseções das estruturas foram realizadas segundo as coordenadas do atlas de PAXINOS & WATNSO (2004). Essas estruturas foram adicionadas a tubos RNase-“free”,

contendo 750 µl de solução monofásica de phenol/guanidinium thiocyanate (Trizol®) de acordo com as instruções do fabricante (Gibco), agitados vigorosamente por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 2-3 min. As amostras foram posteriormente centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (contendo o RNA total) foi solubilizado em 100 µl de água tratada com DEPC. Uma alíquota foi removida para verificar a integridade do RNA em gel agarose 1,5% e a eletroforese realizada durante 60 min a 80V. Para a extração do RNA total (a partir do material obtido com a técnica de “PUNCH”), utilizamos o Kit PicoPure RNA Isolation (Arcturus Biosciences). Assim como o radioimunoensaio a metodologia descrita a seguir está implementada e tem sido rotineiramente utilizada no laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Aplicada do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP.

A análise semi-quantitativa de expressão gênica foi realizada por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real (Taqman®-pcr). Amostras de RNA total do núcleo NDR, extraídos foram submetidas à reação da transcriptase reversa em tempo real. As sequências de cDNA foram enviadas para a empresa Applied Biosystems® para a construção dos iniciadores. Sondas para o gene TPH2 e 5-HT1A foram marcadas com repórter fluorescente 6-carboxi-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína (TET). As reações foram realizadas em volumes de 50 µl contendo 50 ng de RNA total utilizando o sistema de detecção TaqMan EZ RT-PCR (Perkin Elmer, Foster City, CA cat# N808-0235). As reações com 40 ciclos foram realizadas em um instrumento ABI PRISM 7000 (Catálogo 4330087, Perkin Elmer, Foster City, CA), cujo aparelho caracteriza-se por possuir um termociclador acoplado a uma câmara de CCD. A amplificação da sequência alvo foi detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorreu quando existia formação de dupla fita na região codificada pelo par de iniciadores. Foi considerada expressão do gene, amostras que apresentaram intensidades de fluorescência acima de dois desvios padrão da média das intensidades dos controles negativos (com ausência de RNA).

PCR foi realizada em um equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizadas as seguintes sondas: TPH2, 5-HT1A e GAD. Foi realizada a curva de eficiência da amplificação para cada sonda no tecido estudado. Cada amostra foi analisada em triplicata. Água livre de cDNA foi usada como controle negativo. A β-actina foi utilizada como gene controle para normalizar as reações e realizar a quantificação relativa da expressão gênica.

Na análise da curva de eficiência relativa, montamos uma curva contendo cinco pontos em cada placa para os genes alvo e controle com base nesta curva e no Ct de cada amostra. Dessa forma, obtivemos as concentrações de RNAm nas amostra. Após essa etapa, avaliamos matematicamente os valores para uso trabalhando com a divisão da quantificação do gene alvo pelo do gene controle. Na análise pelo método do threshold cycle (Ct) cada amostra teve seu Ct determinado e normalizado pelo Ct do 14 gene de referência ( $\Delta Ct = Ct_{alvo} - Ct_{gene\ de\ referência}$ ). A expressão do RNAm nas amostras desconhecidas foi determinado por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{desconhecido} - \Delta Ct_{Controle}$ . Todos os dados apresentados amostram relativas à expressão do RNAm em relação ao grupo controle.

#### 4.9.2-Western blotting

Amostras de tecidos cerebrais foram obtidas por “punch” (microdissecção) com agulha de diâmetro de secções coronais com 2000µm para NDR segundo as coordenadas do atlas de PAXINOS & WATNSO (2004). Essas amostras foram em seguida homogeneizadas no tampão Tris-HCl (pH 7,2). Este tampão é constituído por um “mix” de inibidores de

protease e fosfatase (1 mg/mL de aprotinina, leupeptina, PMSF, pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio e ortovanadato de sódio). Logo em seguida, o material biológico foi centrifugado a uma rotação de 15.000 rpm durante 40 minutos sendo a 4 °C. Após a centrifugação realizamos a quantificação proteica das amostras, sendo sempre em duplicata. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de BCA, e utilizando o espectrofotômetro com comprimento de onda de 562 nm. A solubilização das amostras foram feitas em tampão (20% de 4-glicerol, Tris 1M pH 6,8, SDS 4%, DTT 0,1M, azul de bromofenol 0,02%; pH 6,8) a 95°C por 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese SDS-SCPE 10%, com 0,75 mm de espessura. Imediatamente realizamos a eletroforese e logo em seguida a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 mm. Posteriormente, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (TBS-T e 10% albumina sérica bovina) por 90 minutos.

Realizado o bloqueio, incubamos a membrana sob agitação à temperatura de 4°C, overnight com anticorpo primário rabbit anti- $\beta$ -actina 1:1000, TPH2 1:10.000 em solução contendo TBS-T e 5% de albumina de sérica bovina. Logo em seguida, foi realizada a incubação da membrana com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Cell Signaling Technology, EUA), sendo a diluição na proporção de 1:3.000 em solução contendo TBS-T e 5% de albumina sérica bovina, durante um período de 1 hora. Por fim, a membrana foi incubada durante 6 minutos com uma mistura de reagentes contidos no kit de quimioluminescência amplificada (ECL 17 Plus, GE-Amersham, EUA). A detecção por quimioluminescência foi realizada em sistema de detecção Chemidoc XRS + Imaging System (BioRad, EUA), com exposição de 90 segundos.

## **4.10-Avaliação comportamental**

### **4.10.1-Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).**

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos modelos de avaliação de ansiedade em ratos e camundongos mais largamente utilizados na pesquisa. O LCE é um teste de ansiedade amplamente utilizado tanto para a investigação de fármacos ansiolíticos, quanto para investigar as bases neurofisiológicas da ansiedade. No ano de 1984, Handley e Mithani validaram o teste através de avaliações experimentais com agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. Neste trabalho eles constataram que drogas como o diazepam (ansiolíticos) eram capazes de aumentar a proporção do número de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas (braço aberto + braço fechado), enquanto os agentes ansiogênicos, como a picrotoxina, diminuía esta proporção (HANDLEY & MITHANI, 1984). A proposta do teste foi baseada no comportamento natural dos animais, não oferecendo nenhum tipo de punição aos mesmos. O uso deste teste para a detecção de tais efeitos foi validado através de avaliação de parâmetros comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (PELLOW et al. 1985) .

O aparato utilizado neste teste foi construído em madeira, constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes (braços fechados). Como é elevado, esse se encontra a 50 cm acima do solo. As dimensões dos braços abertos são (50 x 10 x 1cm) e dos braços fechados (50 x 10 x 40 cm), também opostos, em forma de cruz grega, conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). O teste foi conduzido sob luz vermelha (85 lux), em ambiente de penumbra.

Neste teste foram avaliados os parâmetros principais que incluem número de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo de permanência nos braços abertos, fechados e na plataforma central, e porcentagem do número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e/ou plataforma central em relação aos braços fechados. Numa avaliação secundária foram mensurados os índices comportamentais relativos ao número de bolos fecais,

exploração vertical (rearing), autolimpeza (grooming), postura estendida (stretched attend posture – SAP) e mergulho de cabeça (head dipping - HD).

#### **4.10.2-Teste do Campo Aberto (CA).**

O campo aberto foi inicialmente elaborado para avaliar parâmetros emocionais em ratos. Essa elaboração foi realizada por Hall (1934). Esse teste consiste em submeter o animal a um ambiente novo e observar os comportamentos de rearings, tempo de autolimpeza (grooming), defecação, tempo gasto para deixar a área central e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal). Neste modelo os roedores têm certa preferência a permanecer na periferia do aparelho, normalmente próximos às paredes, tal comportamento é caracterizado pela tigmotaxia (RAMOS et al. 1997; CAROLA et al. 2002). A tigmotaxia está vinculada a esquiva de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas. No LCE a tigmotaxia está atrelada a aversão do animal a permanecer no braço aberto. Mediante a isso, a tigmotaxia é um parâmetro relacionado à ansiedade no CA e LCE (CHOLERIS et al. 2001). A utilização deste modelo na avaliação da ansiedade tem como fundamentação o estudo da ambulação e permanência do animal na região central. Aumento da ambulação e maior permanência na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade (CHOLERIS et al. 2001). Entretanto, esta proposta tem sido criticada por alguns autores, já que as medidas avaliadas parecem influenciar mais os fatores como atividade locomotora e exploração.

Consiste em uma arena circular com 60 cm de diâmetro. O chão é dividido em 12 seções, circundado por uma parede circular de parede lateral de aço com 50 cm de altura e piso consistindo de madeira pintada de branco com linhas pretas. O número de áreas invadidas com as quatro patas pelo animal foi quantificado (ambulação). Neste teste o animal foi colocado na região central e os parâmetros comportamentos foram registrados durante 5 minutos.

Os parâmetros utilizados foram número de ambulações na periferia (áreas com paredes laterais); número de ambulações no centro (áreas sem contato com paredes laterais); tempo de imobilidade na periferia; tempo de imobilidade no centro; número de rearings (elevações nas patas traseiras); tempo e número de grooming (autolimpeza); número de espreitas no centro; número de espreitas na periferia; número de bolos fecais.

#### **4.11-Análise estatística dos resultados**

Os resultados obtidos foram expressos em forma de médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise da variância (ANOVA) de duas vias ou de três vias (fatorial) seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores médios serão comparados nos diferentes tratamentos e condições experimentais com o nível de significância estabelecido em 5%

#### 4.12-Procedimentos experimentais

Os animais constituiram os seguintes procedimentos experimentais:

- 1) **Estudo dos parâmetros hidroeletrólíticos diários (ingestão de água, salina, volume urinário e sódio urinário) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo.**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais antes da cirurgia de ovariectomia para ambientação, e os respectivos grupos foram submetidos à avaliação da ingestão de água, salina hipertônica (1,8%), volume urinário e excreção de sódio. Essa avaliação ocorreu durante todo período da reposição hormonal e do tratamento com 8-OH-DPAT (figura 3).

- 2) **Estudo da ingestão alimentar e variação de peso corporal diário em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.**

Estes parâmetros foram avaliados em gaiolas metabólicas individuais, de acordo com o protocolo acima (1).

- 3) **Estudo dos parâmetros hidroeletrólíticos (ingestão de água, salina, volume urinário, sódio urinário e plasmático, osmolalidade plasmática, proteína plasmática e hematócrito) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio.**

Neste procedimento experimental os parâmetros ingestão de água, salina, volume e sódio urinário foram realizados em gaiolas metabólicas. Nesta avaliação os animais foram divididos em grupos submetidos à (i) depleção de sódio (furosemida a 20mg/kg, com acesso livre à água, 24 horas anterior ao experimento) e em (ii) condição basal. Para a avaliação do sódio, osmolalidade, proteína plasmática e hematócrito os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta do plasma no tempo zero do décimo terceiro dia como descrito na figura 3.

- 4) **Avaliação por radioimunoensaio dos parâmetros neuroendócrinos (ANG I, ANGII, OT, AVP, ANP, CORT) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio.**

Assim como no procedimento 3 os animais foram divididos em grupos submetidos à (i) depleção de volume e (ii) condição basal. A mensuração deste parâmetro foi realizada pela coleta do plasma e mensurada pela técnica de radioimunoensaio no tempo zero do décimo terceiro dia como descrito na figura 3.

- 5) **Estudo da expressão gênica no NDR (TPH2 e 5-HT1A, GAD) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.**

Neste procedimento os grupos foram os mesmo do anterior, sendo nesta análise a coleta do encéfalo (especificamente o “punch” do NDR, região mesencefálica) para quantificação do RNAm dos respectivos genes descritos acima. A análise foi realizada pela técnica de PCR no tempo zero do décimo terceiro dia como descrito na figura 3.

- 6) **Estudo da síntese protéica no NDR (TPH2) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.**

Para quantificação da TPH2 os animais foram separados de acordo com os protocolos 2, 3, 4 sendo “punch” realizado com uma agulha de diâmetro 2 mm. Neste procedimento a quantificação da TPH2 foi realizada pela técnica de Western Blot.

**7) Estudo dos parâmetros comportamentais (LCE e CA) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal.**

Neste parâmetro os animais foram avaliados apenas em condição basal, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado para avaliação comportamental relacionada a alterações de ansiedade por 5 minutos e imediatamente foi avaliada a atividade locomotora pelo campo aberto por 5 minutos.

A figura abaixo representa os procedimentos experimentais descritos acima.

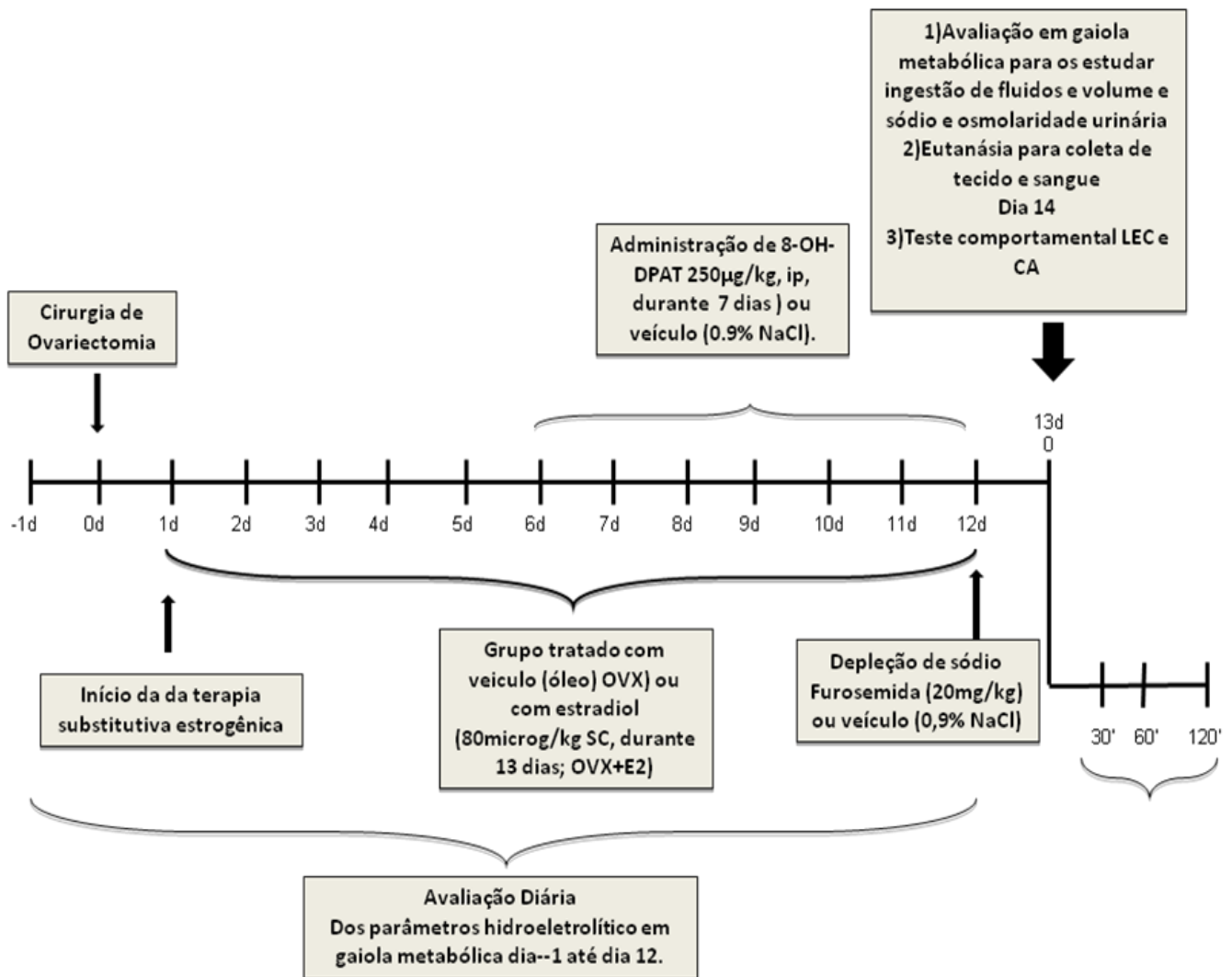


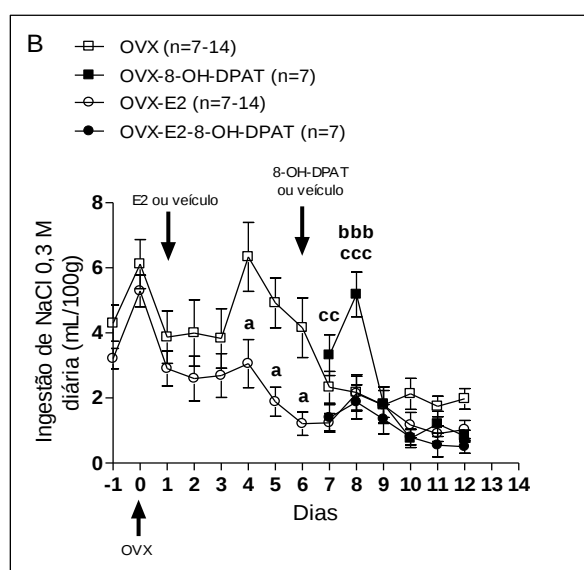
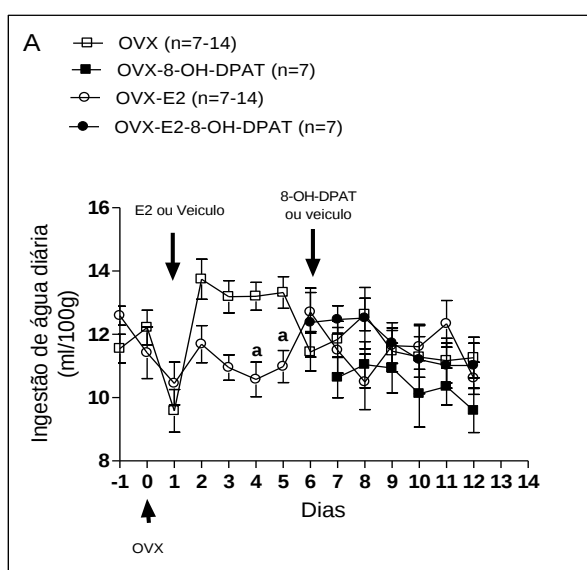
Figura 3-Representação esquemática dos protocolos experimentais.

## 5-RESULTADOS

### 5.1- Estudo dos parâmetros hidroeletrólítico diários:

#### 5.1.1- Ingestão de água, salina, preferência por sódio em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.

Na figura 4A podemos evidenciar que no quarto dia ocorreu uma redução significativa ( $10,57 \pm 0,54$  vs  $13,20 \pm 0,43$  ml/100g;  $P < 0,05$ ) da ingestão de água no grupo OVX-E2 em relação ao grupo controle (OVX). Tal resultado também foi observado no quinto dia ( $10,98 \pm 0,50$  vs  $13,32 \pm 0,5$  ml/100g;  $P < 0,05$ ). Na análise da ingestão de salina hipertônica (figura 4.1B) observamos uma menor ingestão no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX no quarto, quinto e sexto dia respectivamente ( $3,05 \pm 0,74$  vs  $6,33 \pm 1,06$  ml/100g;  $P < 0,05$ ;  $1,88 \pm 0,44$  vs  $4,92 \pm 0,76$  ml/100g;  $P < 0,05$ ;  $1,21 \pm 0,36$  vs  $4,15 \pm 0,91$  ml/100g;  $P < 0,05$ ). Ainda na figura 4B observamos que no primeiro dia (no gráfico corresponde ao sétimo dia) após a administração de 8-OH-DPAT há uma resposta natriorexigênica do grupo OVX-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2-8-OH-DPAT ( $3,31 \pm 0,62$  vs  $1,40 \pm 0,40$  ml/100g;  $P < 0,01$ ). Esse efeito ainda é observado no dia seguinte, ou seja, no segundo dia de administração de 8-OH-DPAT (no gráfico corresponde ao oitavo dia). O gráfico demonstra um aumento da ingestão de salina no grupo OVX-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX ( $5,18 \pm 0,68$  vs  $2,13 \pm 0,53$  ml/100g;  $P < 0,001$ ) e esse aumento também é observado em relação ao grupo OVX-E2-8-OH-DPAT ( $5,18 \pm 0,68$  vs  $1,88 \pm 0,52$  ml/100g;  $P < 0,001$ ). Avaliamos ainda o índice de preferência por sódio diário como observado na figura 4C. Nesta mensuração, podemos evidenciar uma menor preferência no grupo OVX-E2, no sexto dia em relação ao grupo OVX ( $0,079 \pm 0,020$  vs  $0,22 \pm 0,036$ ;  $P < 0,01$ ). No segundo dia após a administração de 8-OH-DPAT (dia 8 no gráfico) podemos observar um aumento significativo da preferência por sódio no grupo OVX-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX ( $0,32 \pm 0,04$  vs  $1,4 \pm 0,036$ ;  $P < 0,001$ )



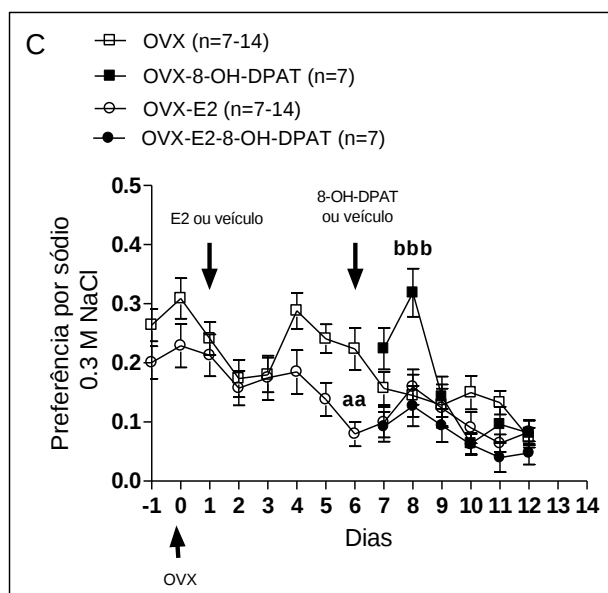


Figura 4: Avaliação da ingestão diária de água (A), ingestão de salina hipertônica (1,8%) (B) e preferência por sódio (C) em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $P < 0,01$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>bbb</sup>  $P < 0,001$  compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>c</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>cc</sup>  $P < 0,01$ ; <sup>ccc</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT OVX. ANOVA três vias.

#### 5.1.2- Volume urinário, sódio urinário em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.

Na avaliação do volume urinário diário como observado na figura 5A podemos evidenciar um menor volume urinário especificamente no dia 8 no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $7,54 \pm 1,04$  vs  $12,28 \pm 1,21$  ml,  $P < 0,05$ ). Ainda na figura 5A observamos uma redução estatística do volume urinário no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX no último tempo avaliado que corresponde ao décimo segundo dia ( $8,94 \pm 0,95$  vs  $14,25 \pm 1,29$  ml,  $P < 0,001$ ).

Na excreção renal de sódio visualizada na figura 5B observamos uma menor significativa na concentração urinária de sódio no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX ( $615,95 \pm 65,41$  vs  $1208,9 \pm 153,76$  mEq/l,  $P < 0,05$ ) no sexto dia. No segundo dia de administração de 8-OH-DPAT que equivale ao oitavo dia do gráfico evidenciamos uma diminuição significativa da excreção renal de sódio no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $736,18 \pm 95,06$  vs  $1039,28 \pm 265,82$  mEq/l,  $P < 0,01$ ). Podemos ainda observar uma redução significativa da concentração urinária de sódio do grupo OVX-8-OH-DPAT em relação ao seu respectivo grupo controle OVX no décimo segundo dia ( $661,28 \pm 86,10$  vs  $1075,77 \pm 107,1$  mEq/l,  $P < 0,05$ ).

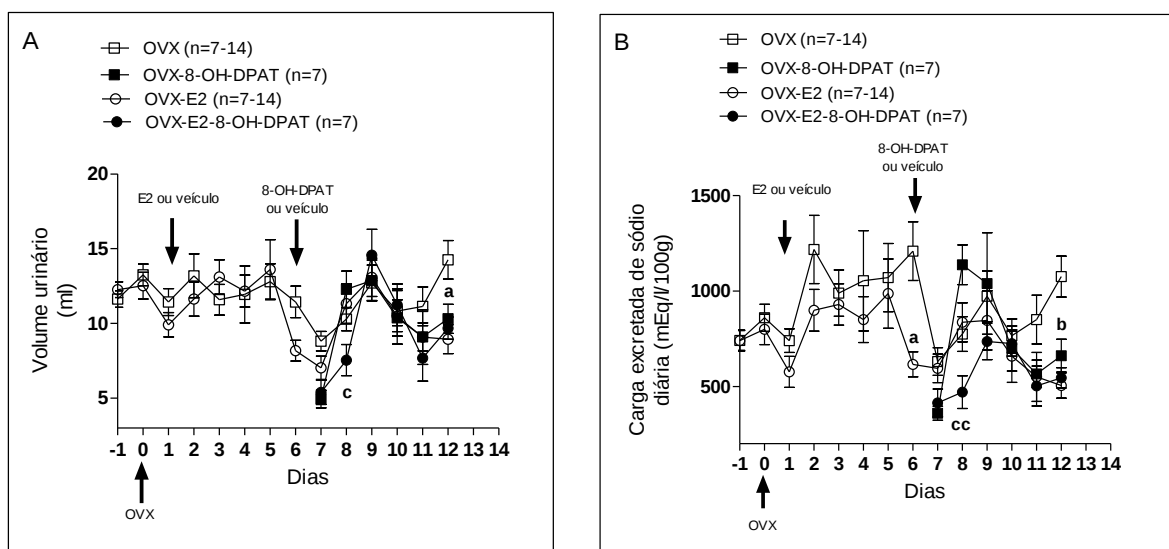


Figura 5: Avaliação do volume urinário (A) e carga excretada de sódio (mEq/l/100g) (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>a</sup> $P<0,05$ ; <sup>aa</sup> $P<0,01$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>bbb</sup> $P<0,001$  compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>c</sup> $P<0,05$ ; <sup>cc</sup> $P<0,01$ ; <sup>ccc</sup> $P<0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT OVX. ANOVA três vias.

## 5.2- Estudo dos parâmetros metabólicos diários: Ingestão de alimento e ganho de peso em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.

Na avaliação da ingestão de alimento diária (figura 6A) evidenciamos uma menor ingestão no quinto dia no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $8,34 \pm 0,31$  vs  $10,27 \pm 0,36$  mg/100g,  $P<0,05$ ). Neste contexto, podemos destacar a menor da ingestão alimentar no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT quando comparado aos seu respectivo grupo controle OVX-8-OH-DPAT, tal redução foi observada no décimo segundo dia ( $7,00 \pm 0,44$  vs  $9,25 \pm 0,35$  g/100g,  $P<0,05$ ).

Na figura 6B avaliamos a variação do peso corporal, nesta resposta curiosamente observamos que no segundo dia representado no gráfico, que corresponde 24 horas após a primeira administração de E2, o grupo OVX-E2 apresentou maior ganho de peso em relação ao grupo OVX ( $3,35 \pm 0,92$  vs  $-2,06 \pm 0,70$  g;  $P<0,001$ ). Em contrapartida, no quarto dia observamos um menor ganho de peso no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $-0,07 \pm 0,86$  vs  $5,71 \pm 0,92$  g;  $P<0,001$ ). Já no quinto dia, o grupo OVX-E2 apresentou um pequeno ganho de peso que foi significativamente menor do que o ganho de peso do grupo OVX ( $1,21 \pm 0,70$  vs  $6,28 \pm 1,31$  g,  $P<0,001$ ) esse resultado pode ser associado a menor ingestão alimentar observada na figura 6A. Avaliando o resultado de variação relativa do peso corporal notamos um maior do ganho de peso no grupo OVX-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2-8-OH-DPAT ( $4,85 \pm 0,88$  vs  $2,00 \pm 0,69$  g,  $P<0,05$ ) tal achado foi observado no sétimo dia do gráfico que corresponde a avaliação de 24 horas após a administração de 8-OH-DPAT, tal efeito parece ser atenuado pelo estradiol. Ainda podemos destacar a perda significativa do peso corporal do grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2, que apesar de pequena teve um ganho de peso relativo ( $-2,71 \pm 0,71$  vs  $0,57 \pm 0,48$  g,  $P<0,01$ ). Neste sentido a administração crônica de 8-OH-DPAT associada à reposição estrogênica induziu uma redução do ganho de peso.

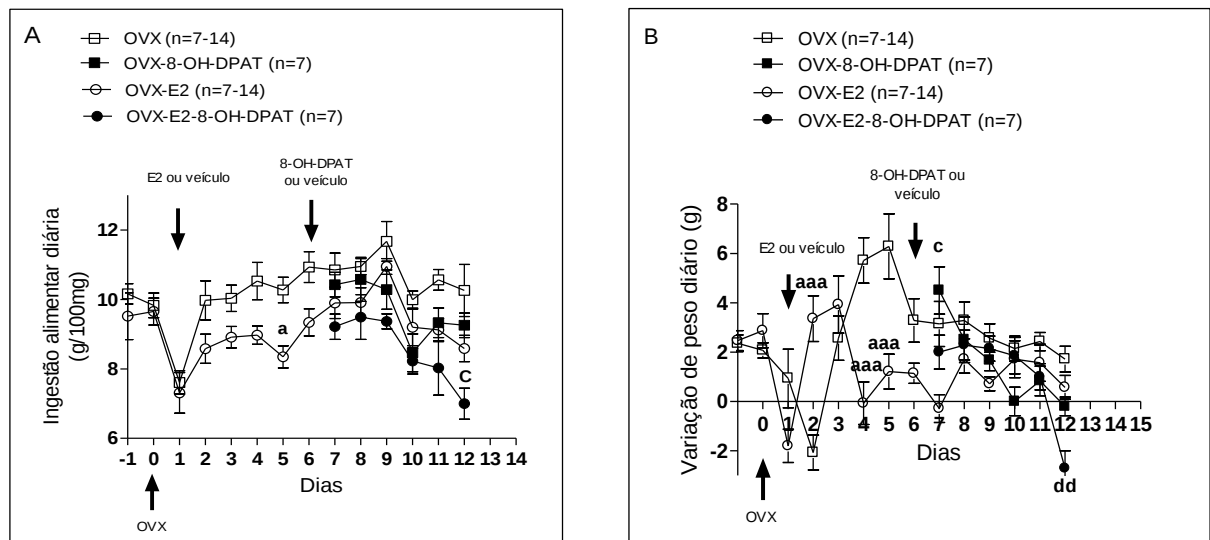


Figura 6: Avaliação da ingestão alimentar diária (A) e ganho de peso (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>aaa</sup> $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>c</sup> $P < 0,05$  Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>dd</sup> $P < 0,01$ : compara OVX-E2-8-OH-DPAT vs OVX-E2. ANOVA duas vias.

### 5.3- Estudo dos parâmetros hidroeletrólítico em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT: em condição basal e após depleção de sódio.

#### 5.3.1- Avaliação da ingestão de água, salina, preferência por sódio em:

#### 5.3.2- Condição basal

Na avaliação da ingestão de água em condição basal como demonstrada na figura 7A evidenciamos uma inibição da ingestão de água no grupo OVX-E2 em comparação com o grupo OVX apenas no intervalo de 120 minutos ( $0,094 \pm 0,07$  vs  $1,45 \pm 0,46$  ml/100g,  $P < 0,001$ ). O tratamento com 8-OH-DPAT em condição basal não alterou a resposta dipsogénica.

Com relação à ingestão de salina hipertônica (Figura 7B) a diferença estatística também aconteceu no intervalo de 120 minutos, neste parâmetro ocorreu uma inibição do comportamento natriorexigénico no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX ( $0,051 \pm 0,042$  vs  $0,45 \pm 0,095$  ml/100g,  $P < 0,001$ ) e ainda observamos inibição da ingestão de salina entre o grupo OVX-8-OH-DPAT e OVX ( $0,19 \pm 0,11$  vs  $0,45 \pm 0,095$  mg/100g,  $P < 0,001$ ).

Na preferência por sódio (figura 7C) os tratamentos não alteraram este parâmetro em condição basal.

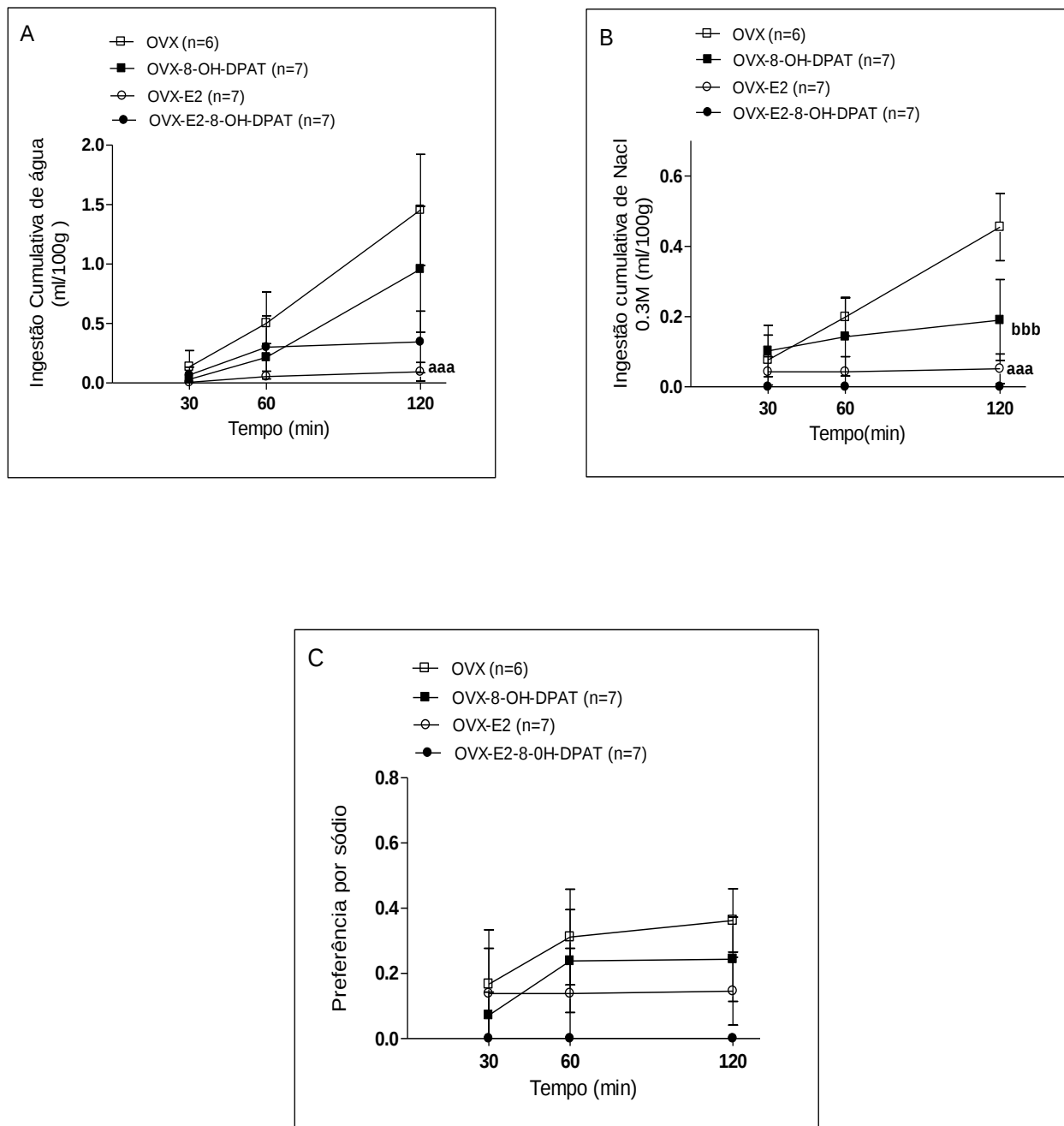


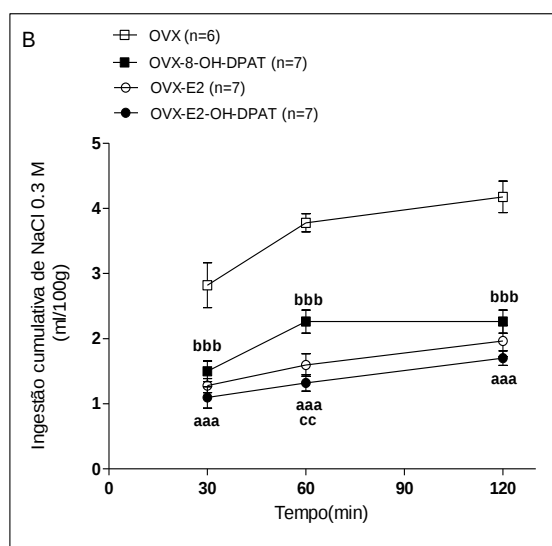
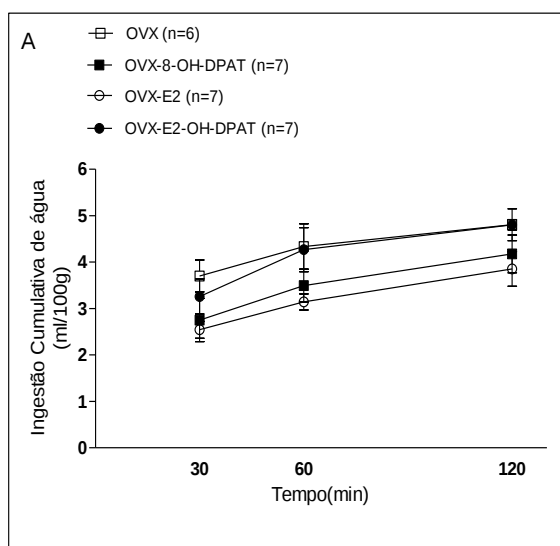
Figura 7: Avaliação da ingestão cumulativa de água (A) salina 1,8% (B) e preferência por sódio (C) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal. <sup>aaa</sup>  $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>bbb</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. ANOVA duas vias.

### 5.3.2- Depleção de sódio.

Ao visualizar a figura 8 A podemos observar que não foi alterado o comportamento dipsogênica entre os tratamentos nesta condição de depleção de sódio.

Por outro lado, na avaliação do comportamento natriorexigênico (Figura 8B) tanto a reposição estrogênica quanto a administração repetida com 8-OH-DPAT interferiu nesta resposta. A reposição, ou seja, o grupo OVX-E2 teve uma redução da ingestão de salina em relação ao grupo OVX em todos os intervalos de tempo sendo 30 ( $1,27 \pm 0,10$  vs  $2,81 \pm 0,34$  ml/100g,  $P < 0,001$ ), 60 ( $1,59 \pm 0,17$  vs  $3,77 \pm 0,13$  ml/100g,  $P < 0,001$ ) e 120 minutos ( $1,96 \pm 0,23$  vs  $4,17 \pm 0,24$  ml/100g,  $P < 0,001$ ). Ainda neste paradigma experimental, o grupo OVX-8-OH-DPAT teve uma redução significativamente da ingestão de salina em relação ao grupo OVX no intervalo de tempo de 30 ( $1,49 \pm 0,15$  vs  $2,81 \pm 0,34$  ml/100g,  $P < 0,001$ ), 60 ( $2,26 \pm 0,17$  vs  $3,77 \pm 0,13$  ml/100g,  $P < 0,001$ ) e 120 minutos ( $2,26 \pm 0,17$  vs  $4,17 \pm 0,24$  ml/100g,  $P < 0,001$ ). No intervalo de tempo de 60 minutos observamos inibição do apetite por sódio no grupo OVX-8-OH-DPAT em relação ao OVX-E2-OH-DPAT ( $1,31 \pm 0,12$  vs  $2,26 \pm 0,17$  ml/100g,  $P < 0,01$ ).

Na figura 8 C não foram observadas diferenças estatísticas entre a reposição e o tratamento na avaliação da preferência por sódio.



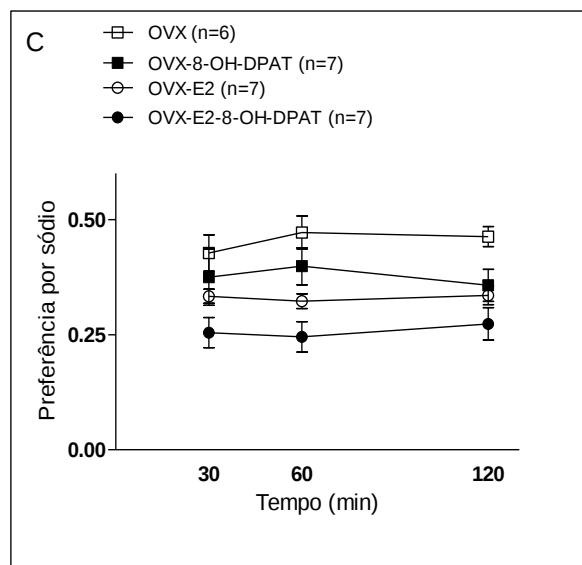


Figura 8: Avaliação da ingestão cumulativa de água (A) salina 1,8% (B) e preferência por sódio (C) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição de depleção de sódio. <sup>aaa</sup>  $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>bbb</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>cc</sup>  $P < 0,01$  Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. ANOVA duas vias.

#### 5.4- Avaliação do volume e sódio urinário em condição basal e após depleção de sódio.

De acordo com a figura 8 A observamos que em condição basal, ou seja, os animais que não foram submetidos a desafio de depleção de volume não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos com relação ao volume urinário no tempo zero antes da oferta de fluidos. Porém em condição de desafio homeostático, o volume urinário produzido em 24 horas após a depleção de sódio foi menor no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX ( $13,25 \pm 1,00$  vs  $24,42 \pm 1,47$  ml,  $P < 0,05$ ) e ainda uma diminuição do volume de urina foi produzido no grupo OVX-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX ( $16,94 \pm 0,99$  vs  $24,42 \pm 1,47$  ml,  $P < 0,05$ ). Quando comparamos o efeito da depleção de sódio observamos um aumento significativo no grupo OVX em comparação com o seu respectivo grupo OVX em condição basal ( $24,42 \pm 1,47$  vs  $9,54 \pm 0,96$  ml,  $P < 0,001$ ) esse aumento é observado ainda no grupo OVX-8-OH-DPAT em condição de depleção em comparação ao grupo OVX-8-OH-DPAT em condição basal ( $16,94 \pm 0,99$  vs  $9,10 \pm 1,85$  ml,  $P < 0,01$ )

O volume urinário foi avaliado juntamente com a ingestão de fluidos, ou seja, 120 minutos após a oferta de fluidos (figura 8B). Neste também não verificamos diferenças significativas no volume urinário entre os grupos em condição basal. Por outro lado, na condição de depleção de volume verificamos uma redução significativa do volume urinário no intervalo de 120 minutos no grupo OVX-E2 e OVX-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX ( $2,37 \pm 0,37$ ;  $3,25 \pm 0,36$  vs  $6,85 \pm 0,59$  ml,  $P < 0,001$ ). Neste sentido, observamos ainda uma maior redução do volume urinário no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $3,25 \pm 0,36$  vs  $2,25 \pm 0,25$  ml,  $P < 0,05$ ). Já em relação ao efeito da depleção de sódio observamos que em 120 minutos após a oferta dos fluidos o aumento do volume urinário foi significativo em todos os grupos em relação aos seus respectivos em condição basal, sendo  $P < 0,001$ .

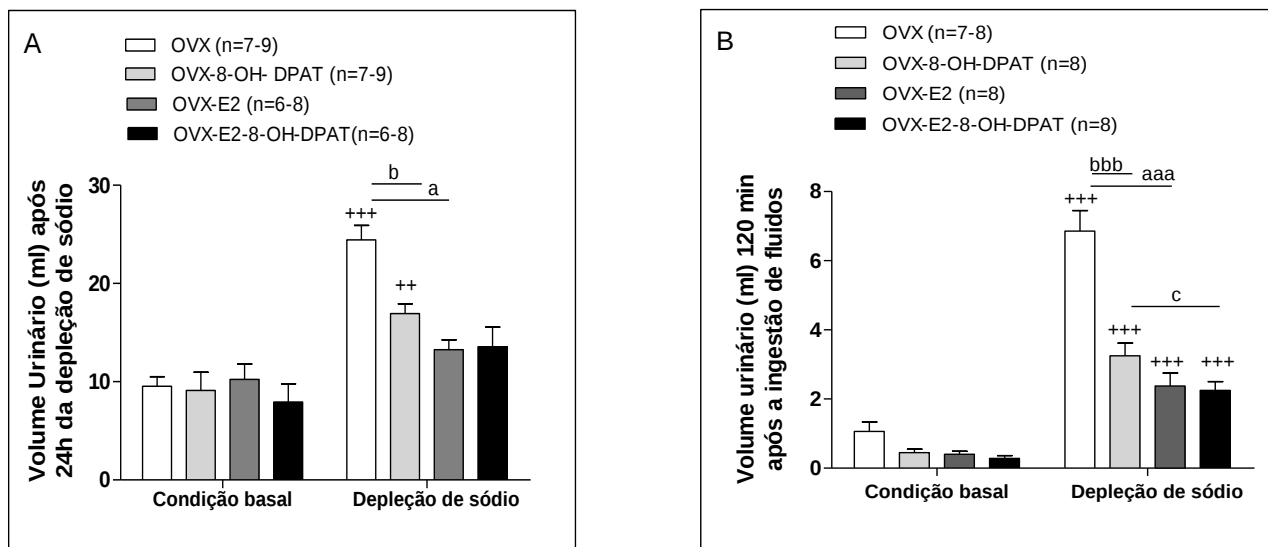


Figura 9: Avaliação do volume urinário 24 horas após a depleção de sódio (A) e volume urinário 120 minutos após a oferta de fluidos (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio. <sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>aaa</sup>  $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>b</sup>  $P < 0,05$ , <sup>bbb</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>c</sup>  $P < 0,05$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>++</sup>  $P < 0,01$ ; <sup>+++</sup>  $P < 0,001$ : compara a condição de depleção e condição basal em cada grupo. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

Na figura 10 A evidenciamos uma menor excreção renal de sódio no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 tanto em condição basal ( $335,48 \pm 56,49$  vs  $789,35 \pm 159,43$  mEq/l,  $P < 0,01$ ) quanto em condição de depleção de sódio ( $295,44 \pm 41$  vs  $583,72 \pm 47,62$  mEq/l,  $P < 0,05$ ). Ainda em condição de depleção de volume observamos uma menor concentração urinária de sódio no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $295,44 \pm 41$  vs  $607,54 \pm 58$  mEq/l,  $P < 0,05$ ). Ainda podemos evidenciar um aumento significativo da concentração urinária de sódio no grupo OVX em condição de depleção em relação ao grupo OVX em condição basal ( $925,97 \pm 105,57$  vs  $553,01 \pm 36,94$  mEq/l,  $P < 0,05$ ). Tal resultado não é evidenciado nos e outros grupos avaliados.

A concentração de sódio urinário como observado na figura 10 B não foi alterada nos grupos em condição basal. Em contrapartida, verificamos uma diminuição da excreção renal de sódio no grupo OVX-E2 e OVX-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX ( $114,28 \pm 22,93$ :  $217,74 \pm 44,82$  vs  $492,24 \pm 46,31$  mEq/l,  $P < 0,001$ ). Ainda evidenciamos menor concentração de sódio urinário no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $113,53 \pm 26,23$  vs  $217,74 \pm 44,82$  mEq/l,  $P < 0,05$ ). Observamos ainda um efeito da depleção de sódio no grupo OVX, ou seja, este apresentou um aumento significativo na concentração urinária de sódio em relação ao grupo OVX na condição basal ( $492,24 \pm 46,31$  vs  $113,93 \pm 23,50$  mEq/l,  $P < 0,05$ ).

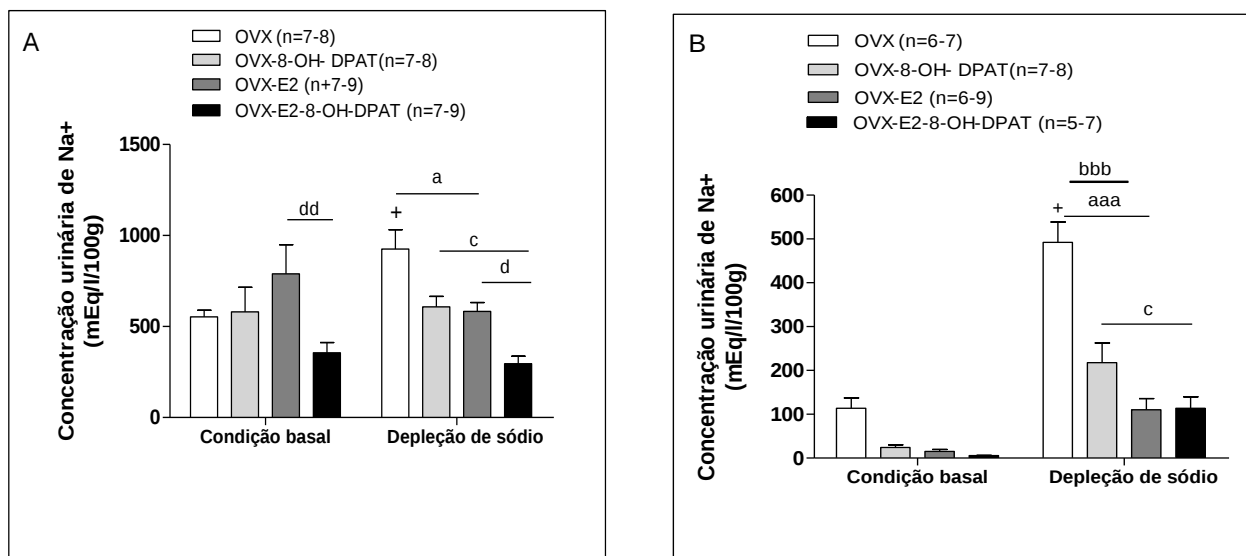


Figura 10: Avaliação da concentração urinária de sódio 24 horas após a depleção de volume (A) e concentração urinária de sódio 120 minutos após a oferta de fluidos (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio. <sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>aaa</sup>  $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX., <sup>bbb</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>c</sup>  $P < 0,05$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>d</sup>  $P < 0,05$ , <sup>dd</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-E2-8-OH-DPAT vs OVX-E2. <sup>+</sup>  $P < 0,05$  compara a condição de depleção e condição basal em cada grupo. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

### 5.5- Avaliação da osmolalidade, sódio e proteína plasmática e hematócrito em condição basal e após depleção de sódio.

Com relação à osmolalidade plasmática observamos na figura 11 A que em condição basal não foi evidenciado diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Porém nos animais submetidos à depleção, observamos maior osmolalidade no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX ( $305,5 \pm 1,86$  vs  $294,61 \pm 1,29$  mOsm/Kg,  $P < 0,01$ ). Esse aumento ainda foi verificado no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $311,64 \pm 5,61$  vs  $301,14 \pm 2,07$  mOsm/kg,  $P < 0,01$ ). A depleção de sódio promoveu uma diminuição da osmolalidade plasmática somente no grupo OVX em relação ao seu respectivo grupo OVX em condição basal ( $294,61 \pm 1,29$  vs  $310,64 \pm 2,045$  mOsm/Kg,  $P < 0,05$ ).

Em relação à concentração plasmática (Figura 11B) de sódio observamos ser maior no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-E2 ( $141,71 \pm 2,35$  vs  $138,57 \pm 1,79$  mEq/l,  $P < 0,05$ ). Já na condição de depleção não observamos diferenças estatísticas entre os grupos.

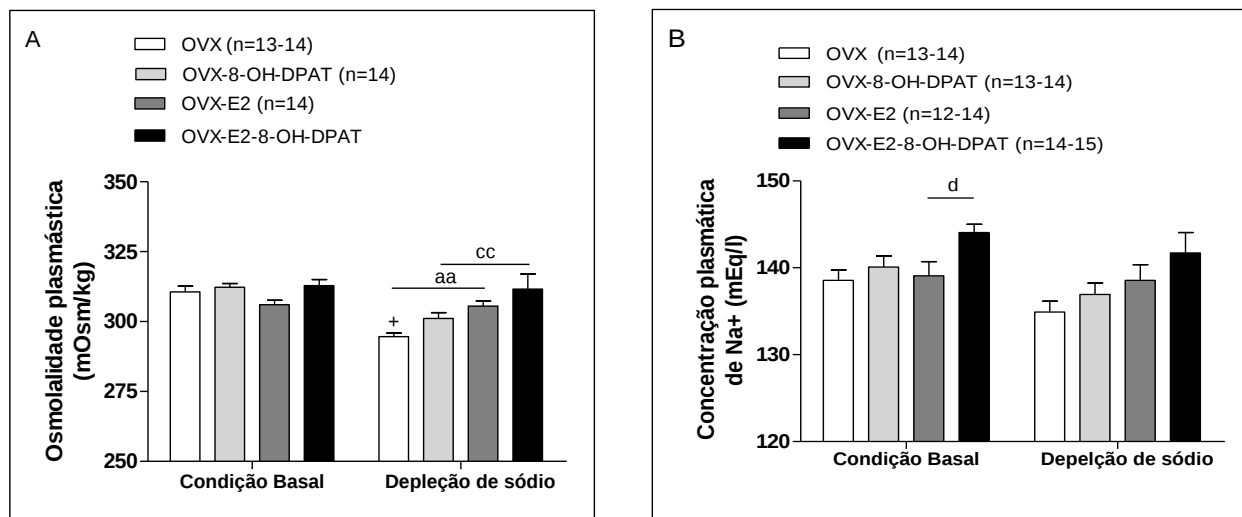


Figura 11: Avaliação da osmolalidade plasmática (A) e concentração plasmática de sódio (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio. <sup>aa</sup>  $P < 0,01$ : compara OVX-E2 vs OVX., <sup>cc</sup>  $P < 0,01$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>d</sup>  $P < 0,05$ : Compara OVX-E2-8-OH-DPAT vs OVX-E2. <sup>+</sup>  $P < 0,05$ : compara a condição de depleção e condição basal em cada grupo. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

Na avaliação de proteína plasmática (figura 12A) observamos que esta variável foi maior no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX tanto em condição basal ( $10,38 \pm 0,31$  vs  $8,57 \pm 0,39$  mg/dL,  $P < 0,001$ ) quanto em condição de depleção ( $11,06 \pm 0,45$  vs  $9,00 \pm 0,28$  mg/dL,  $P < 0,001$ ). Tal efeito foi observado ainda, no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-8-OH-DPAT novamente tanto em condição basal ( $11,1 \pm 0,43$  vs  $9,13 \pm 0,15$  mg/dL,  $P < 0,001$ ) quanto em condição de depleção ( $11,46 \pm 0,26$  vs  $9,50 \pm 0,30$  mg/dL,  $P < 0,001$ ). O fator depleção não interferiu nos grupos avaliados. Em relação à quantificação de hematócrito (figura 12 B) verificamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos avaliados em condição basal. Porém na condição de depleção o grupo OVX-E2 apresentou uma redução significativa em relação ao grupo OVX ( $44,6 \pm 0,76$  vs  $49,21 \pm 1,97$  g/dL,  $P < 0,05$ ). Não houve diferenças entre a depleção de sódio e a condição basal nos grupos

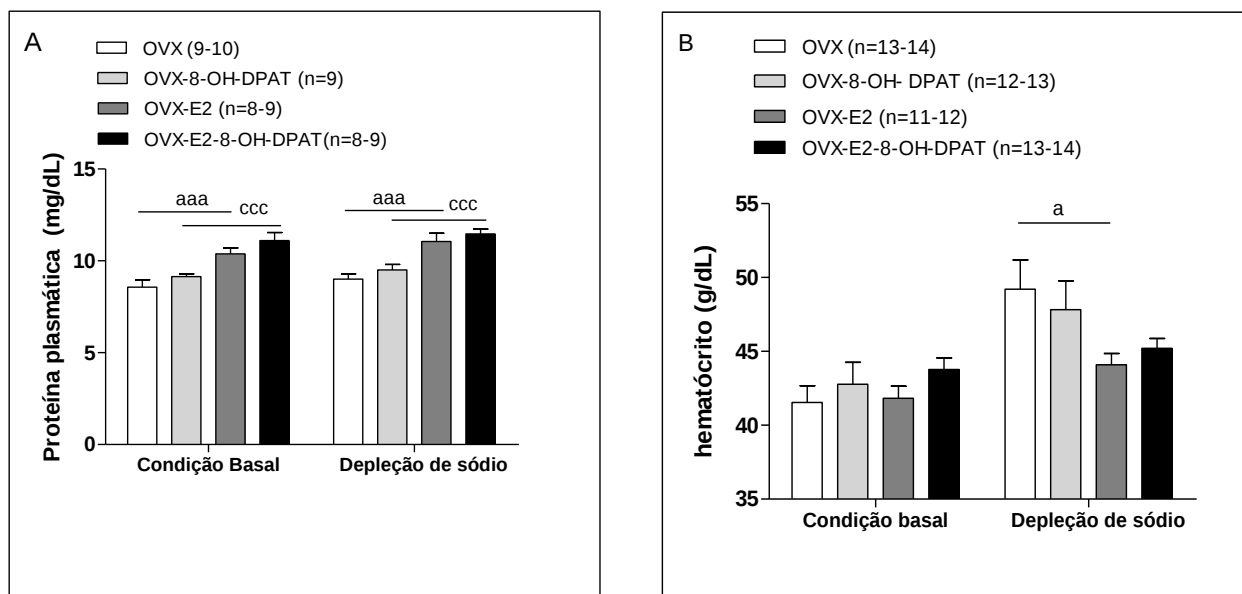


Figura 12: Avaliação da proteína plasmática (A) e hematócrito (B) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com 4estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio<sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>aaa</sup>  $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX., <sup>ccc</sup>  $P < 0,05$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

### 5.6- Avaliação por radioimunoensaio dos parâmetros neuroendócrinos (ANG I, ANGII, OT, AVP, ANP, CORT) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.

Na figura 13 A verificou um aumento significativo da ANGI plasmática no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-8-OH-DAPT em condição basal ( $385,17 \pm 61,41$  vs  $153,57 \pm 8,12$  pmol/ml,  $P < 0,05$ ). Em contrapartida, observamos uma menor concentração plasmática de ANGI no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DAPT em condição de depleção de sódio ( $409,08 \pm 51,90$  vs  $626,19 \pm 69,74$  pmol/ml,  $P < 0,05$ ). A depleção aumentou ANG I no grupo OVX e OVX-8-OH-DAPT em relação aos seus respectivos grupos OVX e OVX-8-OH-DAPT em condição basal ( $596,91 \pm 47,78$ :  $596,91 \pm 47,78$  vs  $212,28 \pm 33,54$ ;  $153,57 \pm 8,12$  pmol/ml,  $P < 0,001$ ).

Em relação à ANGII plasmática (Figura 13B) esta foi menor no grupo OVX-8-OH-DAPT em relação ao grupo OVX em condição basal ( $7,36 \pm 1,11$  vs  $15,66 \pm 2,87$  pmol/ml,  $P < 0,01$ ). Na condição de depleção de sódio, verificamos uma menor concentração plasmática de ANGII no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX ( $11,54 \pm 1,49$  vs  $17,49 \pm 2,21$  pmol/ml,  $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre a depleção de sódio e a condição basal entre os grupos.

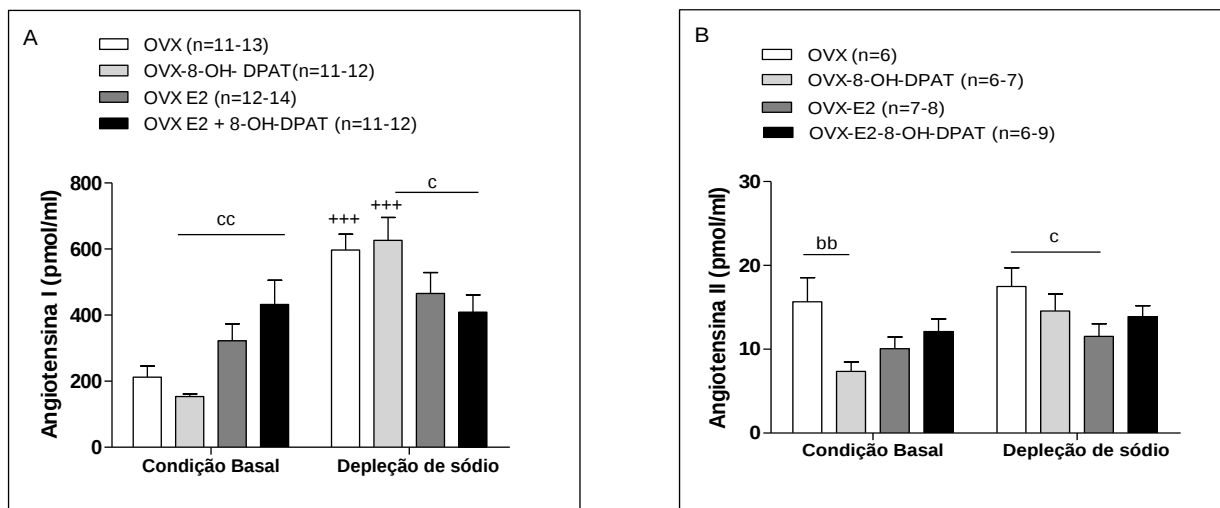


Figura 13: Avaliação da Angiotensina I (A) e Angiotensina II (B) plasmática em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio <sup>bb</sup> $P < 0,01$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>°</sup> $P < 0,05$ , <sup>°°</sup> $P < 0,01$  : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>\*\*\*</sup> $P < 0,001$ : compara a condição de depleção e condição basal em cada grupo. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

De acordo com a figura 14 A observamos maior concentração plasmática de OT no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 em condição basal ( $1,37 \pm 0,17$  vs  $0,68 \pm 0,07$  pmol/ml,  $P < 0,001$ ) e depleção de sódio ( $1,80 \pm 0,22$  vs  $0,99 \pm 0,10$  pmol/ml,  $P < 0,001$ ). Em condição de depleção, foi verificada uma mais elevada concentração plasmática de OT no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $0,99 \pm 0,10$  vs  $0,64 \pm 0,04$  pmol/ml,  $P < 0,05$ ), que também foi maior no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $1,80 \pm 0,22$  vs  $0,87 \pm 0,13$  pmol/ml,  $P < 0,001$ ). A depleção de sódio não alterou a concentração de OT entre os grupos.

Os grupos na condição basal não tiveram diferenças estatísticas com relação à concentração plasmática de AVP (Figura 14B). Porém em condição de depleção de sódio, verificamos maior concentração plasmática de AVP no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT tanto em relação ao grupo OVX-E2 ( $1,49 \pm 0,12$  vs  $1,16 \pm 0,04$  pmol/ml,  $P < 0,001$ ) quanto ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $1,49 \pm 0,12$  vs  $1,21 \pm 0,06$  pmol/ml,  $P < 0,01$ ). Com relação ao efeito da depleção observamos um aumento significativo na concentração plasmática de AVP quando comparado aos respectivos grupos em condição basal (OVX e OVX-E2:  $P < 0,01$  e OVX-8-OH-DPAT e OVX-E2-8-OH-DPAT:  $P < 0,001$ ).

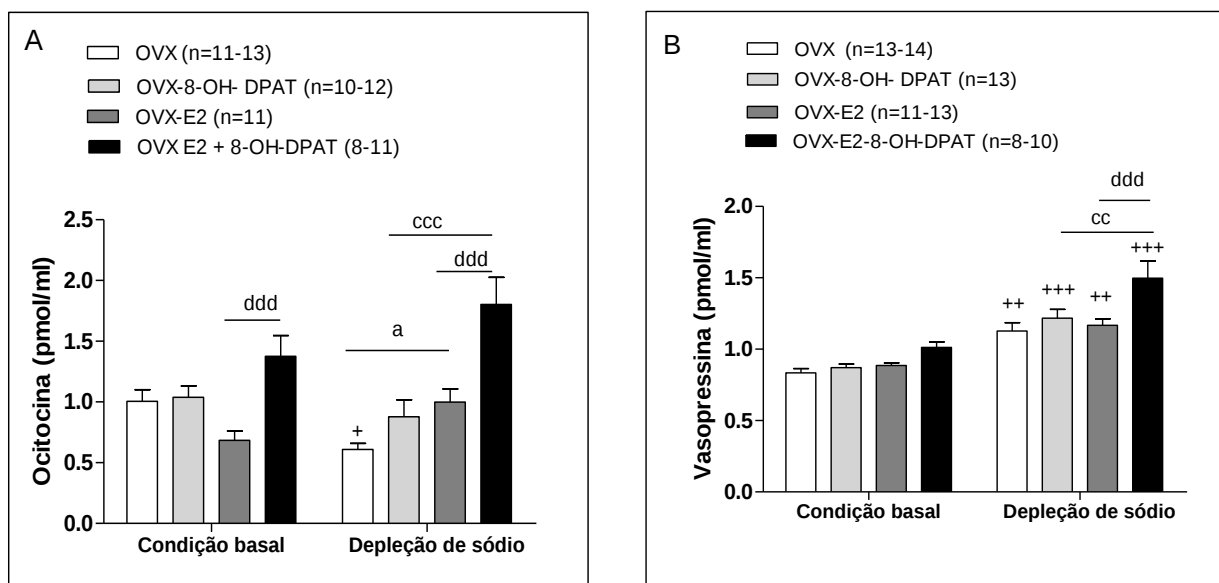


Figura 14: Avaliação da ocitocina-OT (A) e Vasopressina-AVP (B) plasmática em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio. <sup>a</sup>  $P < 0,05$ : compara OVX-E2 vs OVX., <sup>cc</sup> $P < 0,01$ , <sup>ccc</sup> $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>ddd</sup> $P < 0,001$ : Compara OVX-E2-8-OH-DPAT vs OVX-E2. <sup>+++</sup> $P < 0,001$ ; <sup>++</sup> $P < 0,01$ : compara a condição de depleção e condição basal em cada grupo. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

Na figura 15A não observamos diferenças estatísticas entre os grupos em condição basal. Já em condição de depleção verificamos maior concentração plasmática de ANP no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-E2 ( $73,24 \pm 8,05$  vs  $34,51 \pm 2,86$  pmol/ml,  $P < 0,01$ ). A depleção de sódio aumentou estatisticamente a concentração plasmática de ANP em todos os grupos comparados com os seus respectivos na condição basal (OVX, OVX-E2 e OVX-8-OH-DPAT:  $P < 0,001$  e OVX-E2-8-OH-DPAT:  $P < 0,01$ ).

Com relação à concentração plasmática de corticosterona (Figura 15 B) em condição basal evidenciamos que esta variável foi menor no grupo OVX-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX ( $2,04 \pm 0,25$  vs  $4,76 \pm 0,47$   $\mu$ mol/ml,  $P < 0,01$ ). Já o grupo OVX-E2 apresentou maior concentração plasmática de CORT em relação ao grupo OVX tanto em condição basal ( $4,76 \pm 0,47$  vs  $7,51 \pm 0,41$   $\mu$ mol/ml,  $P < 0,05$ ) e após depleção de sódio ( $7,73 \pm 0,72$  vs  $5,74 \pm 0,32$   $\mu$ mol/ml,  $P < 0,05$ ). E o grupo OVX-E2-8-OH-DPAT apresentou maior concentração plasmática de CORT em comparação ao grupo OVX-8-OH-DPAT tanto em condição basal ( $7,42 \pm 0,56$  vs  $2,04 \pm 0,25$   $\mu$ mol/ml,  $P < 0,001$ ) como em condição de depleção de sódio ( $6,83 \pm 0,55$  vs  $5,08 \pm 0,34$   $\mu$ mol/ml,  $P < 0,05$ ). A depleção de sódio aumentou a concentração plasmática significativamente de CORT apenas no grupo OVX-8-OH-DPAT em comparação ao mesmo ao grupo em condição basal ( $5,08 \pm 0,34$  vs  $2,04 \pm 0,25$   $\mu$ mol/ml,  $P < 0,01$ ).

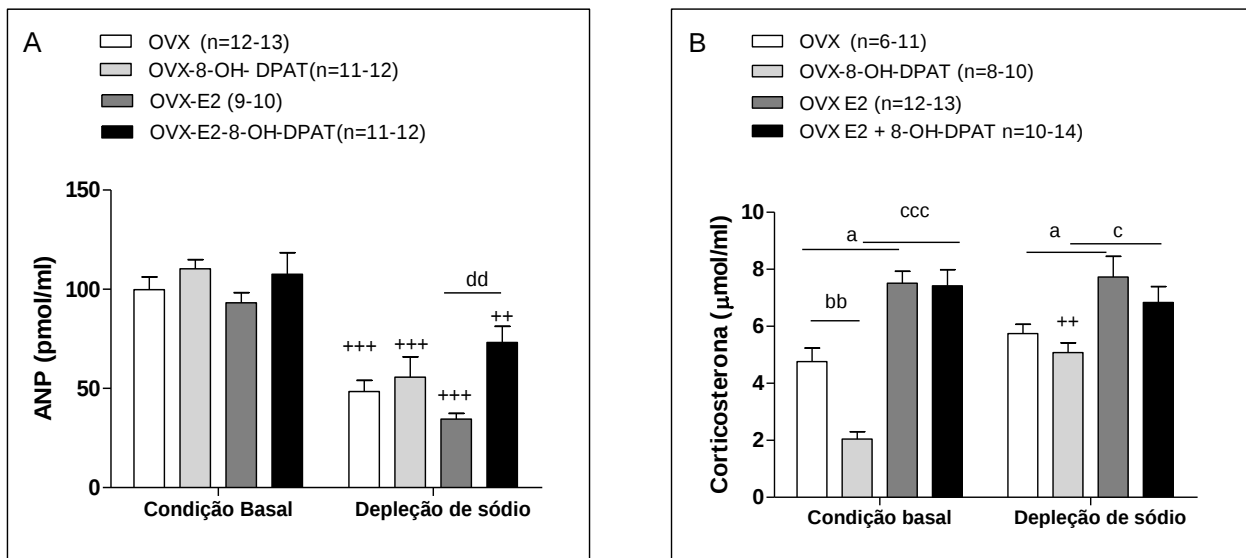


Figura 15: Avaliação de ANP (A) e CORT (B) plasmática em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio. <sup>a</sup>  $P < 0,05$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>bb</sup>  $P < 0,05$ : compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2. <sup>c</sup>  $P < 0,05$ , <sup>ccc</sup>  $P < 0,001$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>dd</sup>  $P < 0,01$ : Compara OVX-E2-8-OH-DPAT vs OVX-E2. <sup>+++</sup>  $P < 0,001$ ; <sup>++</sup>  $P < 0,01$ : compara a condição de depleção e condição basal em cada grupo. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

### 5.7- Estudo da expressão gênica no NDR (TPH2, GAD e 5-HT1A) e transcrição protéica de TPH2 em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.

Na figura 16 A evidenciamos uma menor expressão relativa de RNAm para 5-HT1A no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-E2 em condição basal ( $0,43 \pm 0,10$  vs  $1,52 \pm 0,45$  unidades arbitrárias,  $P < 0,05$ ). Já em condição de depleção de sódio, observamos uma alteração desse padrão, ou seja, há uma maior expressão relativa de RNAm para 5-HT1A no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 ( $1,50 \pm 0,30$  vs  $0,47 \pm 0,13$  unidades arbitrárias,  $P < 0,05$ ). Não observamos diferenças estatísticas nos grupos com relação à depleção de sódio.

Na avaliação da expressão relativa de RNAm para TPH2 (figura 16 B) evidenciamos uma menor expressão nos grupos OVX-E2 e OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação aos grupos OVX e OVX-8-OH-DPAT ( $0,75 \pm 0,048$ ;  $0,74 \pm 0,064$  vs  $1,00 \pm 0,064$ ;  $1,04 \pm 0,101$  unidade arbitrárias,  $P < 0,05$ ) respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em condição de depleção de sódio e não foi evidenciado o efeito da depleção nos grupos.

Com relação a expressão relativa de RNAm para GAD (figura 16 C) não evidenciamos diferenças estatísticas entre os grupos tanto em condição basal quanto após depleção de sódio e ainda não observamos qualquer alteração da depleção em relação a condição basal.

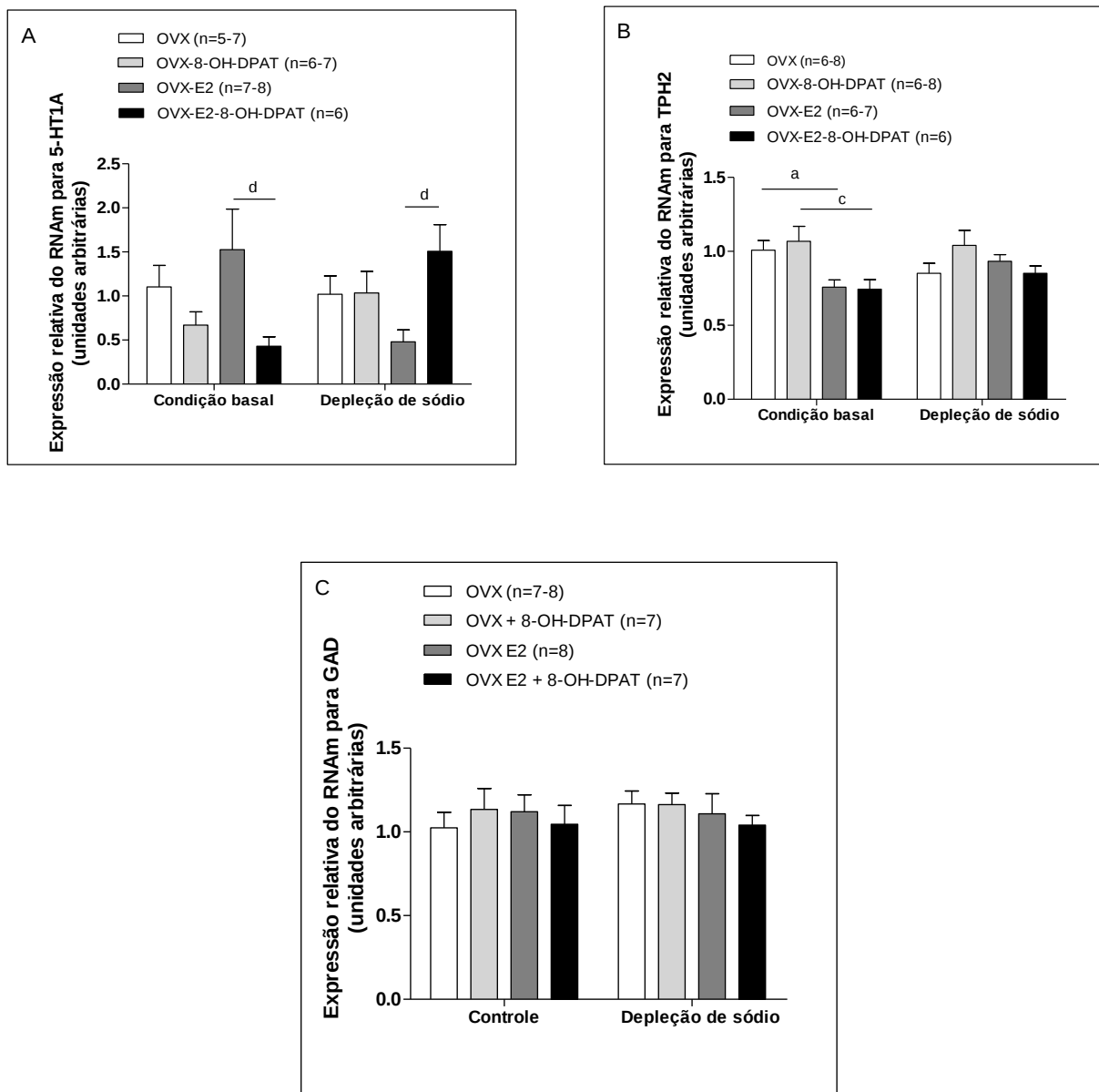


Figura 16: Avaliação das unidades arbitrárias de RNAm de 5-HT1A (A), TPH2 (B) e GAD (C) no NDR em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio. <sup>a</sup>  $P < 0,05$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>c</sup>  $P < 0,05$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT. <sup>d</sup>  $P < 0,05$ : Compara OVX-E2-8-OH-DPAT vs OVX-E2. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

De acordo com a figura 17 A observamos menor expressão de TPH2 em relação a  $\beta$ -actina no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX em condição basal ( $61,63 \pm 6,92$  vs  $100 \pm 14,3$  densidades relativas,  $P < 0,05$ ).

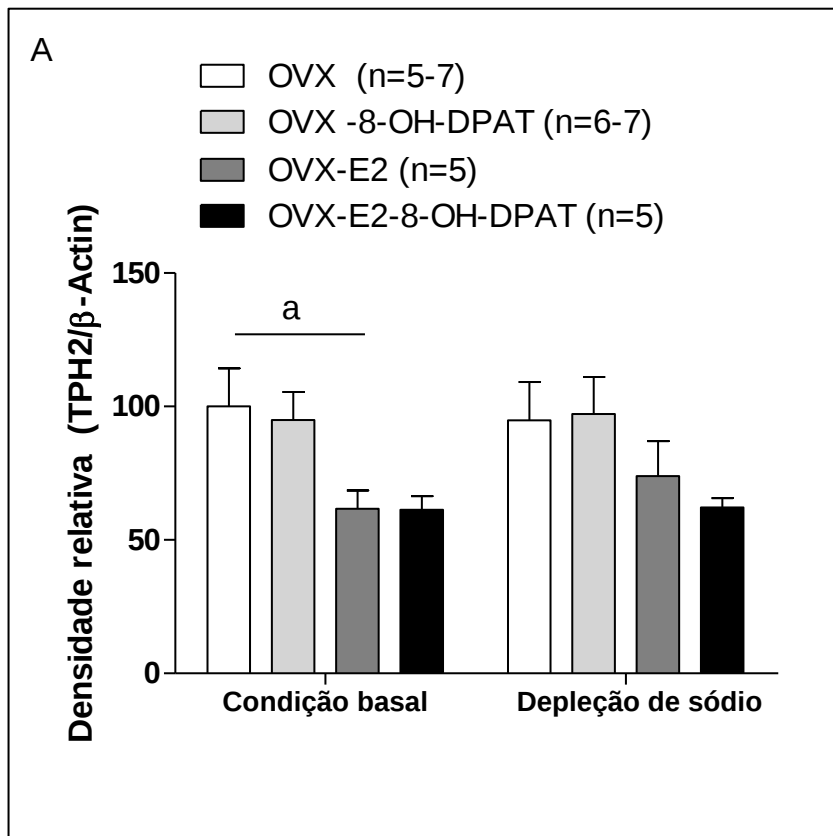


Figura 17 Avaliação da densidade relativa de TPH2/ $\beta$ -Actina no NDR (D) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo em condição basal e após depleção de sódio. <sup>a</sup>  $P < 0,05$ ; compara OVX-E2 vs OVX.. ANOVA trifatorial (Fatores: Reposição hormonal, Tratamento, Depleção de sódio).

### 5.8-Avaliação das respostas comportamentais em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT no teste de labirinto em cruz elevado.

Na avaliação dos parâmetros comportamentais visualizados no teste LCE, observamos um menor (18 A) número de entradas no braço aberto em grupo OVX-E2 comparado ao OVX e OVX-E2-8-OH-DPAT ( $0,14 \pm 0,14$  vs  $3,62 \pm 0,86$ ;  $4,12 \pm 0,81$ ,  $P < 0,05$ ). Já em relação ao número de entradas no braço fechado não foram detectadas alterações significativas entre os grupos.

Quando avaliamos o tempo de permanência no braço aberto (18 B), observamos ser maior no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 ( $63,72 \pm 12,91$  vs  $11,63 \pm 4,21$  sec,  $P < 0,05$ ). No braço fechado, o tempo de permanência foi menor no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao OVX-E2 ( $191,4 \pm 19,80$  vs  $260,2 \pm 9,38$  sec,  $P < 0,01$ ) e OVX-

8-OH-DPAT ( $191,4 \pm 19,80$  vs  $237,5 \pm 17,47$  sec,  $P<0,05$ ). Ainda evidenciamos um maior tempo de permanência no braço fechado no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $260,2 \pm 9,38$  vs  $214,7 \pm 11,31$  sec,  $P<0,05$ )

De acordo com a figura 18 C a relação entre o número de entrada no braço aberto pelo braço fechado verificou-se ser maior no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 ( $41,02 \pm 5,98$  vs  $2,88 \pm 1,93$ ,  $P<0,001$ ) e OVX-OH-DPAT ( $41,02 \pm 5,98$  vs  $14,69 \pm 7,41$ ,  $P<0,05$ ). Evidenciamos também um menor número de entradas no BA pelo BF no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $2,88 \pm 1,93$  vs  $30,48 \pm 5,94$ ,  $P<0,05$ ).

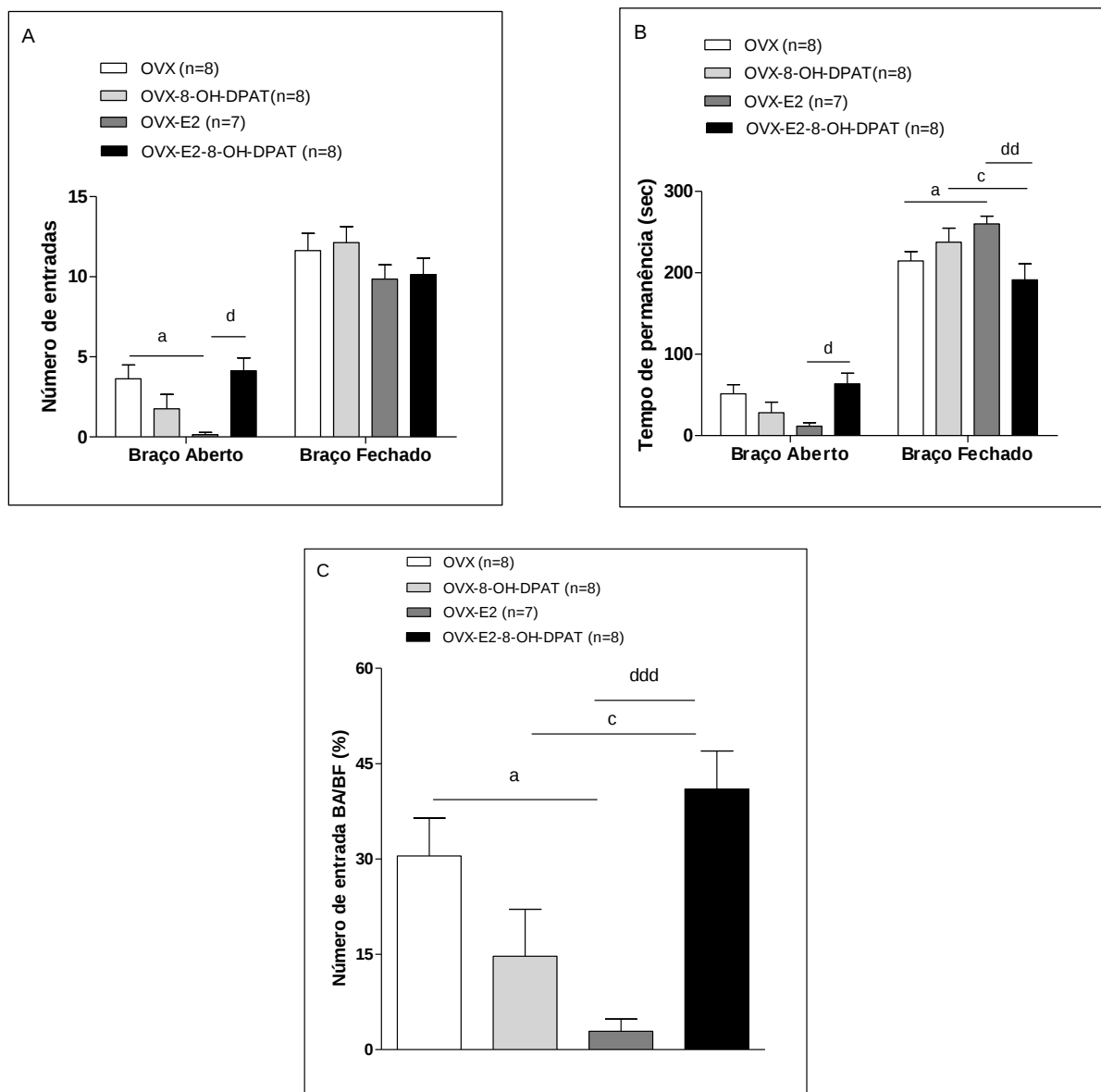
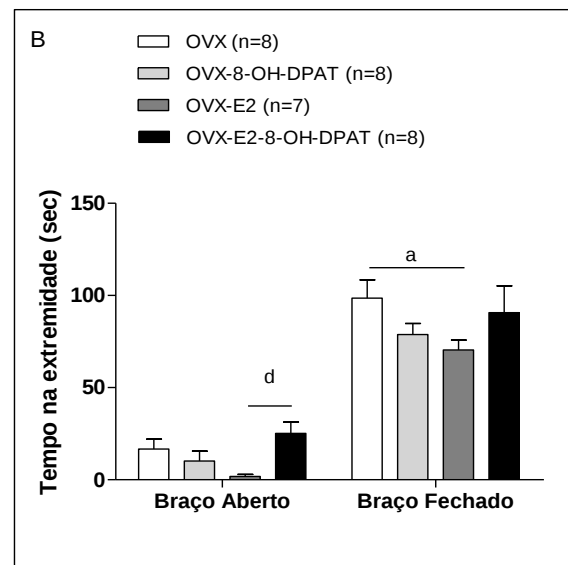
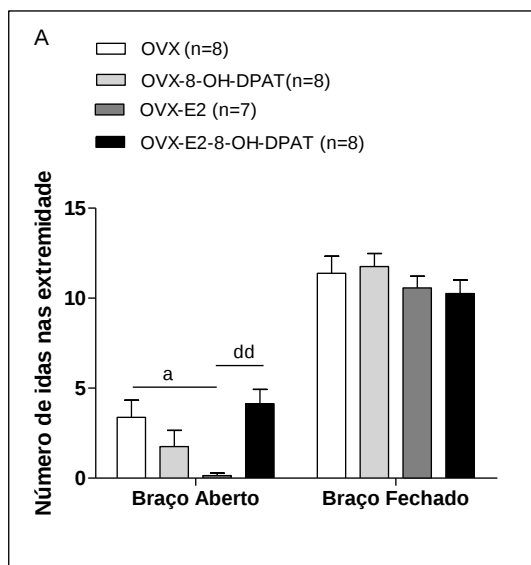


Figura 18: Avaliação do teste LEC em relação ao número de entradas nos braços abertos e fechados (A), tempo de permanência (B) e relação do número de entrada no braço aberto (BA)/braço fechado (BF) em porcentagem (C) em grupos de ratas ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>a</sup> $P<0,05$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>b</sup> $P<0,05$  compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX. <sup>c</sup> $P<0,05$ : Compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT OVX. <sup>d</sup> $P<0,05$ ; <sup>dd</sup> $P<0,01$ ; <sup>ddd</sup> $P<0,001$ : Compara OVX-E2 vs OVX-E2-8-OH-DPAT OVX.

De acordo com a figura 19 A observamos um menor número de idas às extremidades no braço aberto no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $0,25 \pm 0,16$  vs  $3,22 \pm 0,86$ ,  $P < 0,05$ ). Ainda no braço aberto, verificamos um maior número de idas às extremidades no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 ( $3,77 \pm 0,79$  vs  $0,25 \pm 0,16$ ,  $P < 0,01$ ). Em relação ao número de idas às extremidades no braço fechado não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Na avaliação do tempo de permanência no braço aberto (Figura 19 B) verificamos maior permanência no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 ( $22,83 \pm 5,84$  vs  $1,53 \pm 1,06$ ,  $P < 0,05$ ). Já com relação ao tempo de permanência no braço fechado o gráfico demonstra uma menor permanência no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $74,5 \pm 6,44$  vs  $97,14 \pm 8,83$ ,  $P < 0,05$ ).

O número de quadrantes cruzados no braço aberto e fechado é evidenciado na figura 19 C, na qual observamos menor número de quadrantes cruzados no braço aberto no grupo OVX-E em comparação ao grupo OVX ( $3,75 \pm 1,46$  vs  $18,78 \pm 4,5$ ;  $P < 0,05$ ) e OVX-E2-8-OH-DPAT ( $3,75 \pm 1,46$  vs  $23,50 \pm 4,39$ ,  $P < 0,01$ ). Não observamos diferenças significativas no número de quadrantes cruzados no braço fechado entre os grupos.



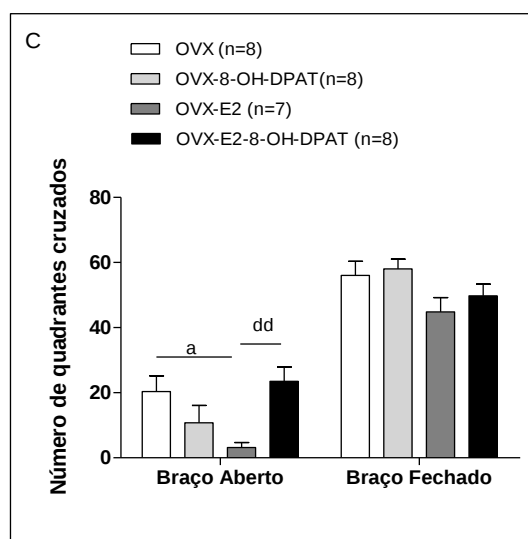


Figura 19: Avaliação do teste LEC em relação ao número de idas às extremidades nos braços abertos e fechados(A), tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos e fechados (B) e número de quadrantes cruzados no braço aberto e fechado (C) em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>a</sup>P<0,05: compara OVX-E2 vs OVX. <sup>d</sup>P<0,05; <sup>dd</sup>P<0,01: Compara OVX-E2 vs OVX-E2-8-OH-DPAT OVX.

Não evidenciamos diferenças estatísticas com relação ao tempo e número de “grooming” como observado na figura 20 A.

De acordo com a figura 20 B não evidenciamos diferenças estatísticas no parâmetro número de mergulho de cabeça no braço fechado entre os grupos. Em contrapartida no braço aberto o número de mergulhos de cabeça foi menor no grupo OVX-E2 em comparação ao grupo OVX ( $0,57 \pm 0,42$  vs  $7,12 \pm 1,35$ ,  $P < 0,001$ ). Observamos ainda que esta variável foi maior no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 e OVX-8-OH-DPAT ( $9,75 \pm 1,84$  vs  $0,57 \pm 0,42$ ;  $3,62 \pm 1,59$ ,  $P < 0,001$ ).

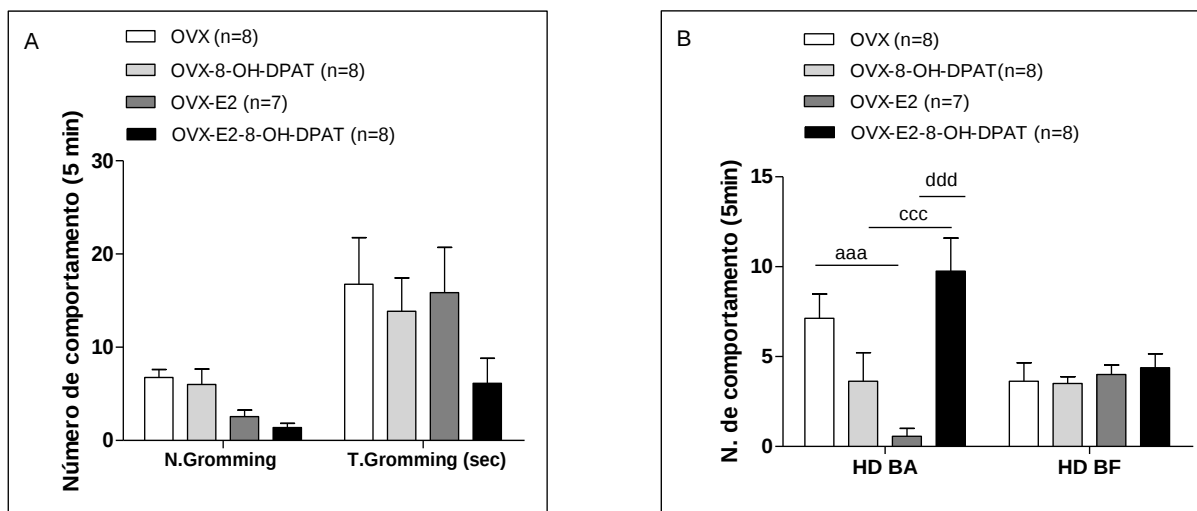


Figura 20: Avaliação do teste LEC em relação ao número de comportamentos complementares como número e tempo de autolimpezas (grooming) (A), número de mergulho de cabeça no braço fechado (HD BF) e aberto (HD BA) (B) em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo: <sup>aaa</sup> $P < 0,001$ : compara OVX-E2 vs OVX. <sup>ccc</sup> $P < 0,001$ : compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT; <sup>ddd</sup> $P < 0,001$ : Compara OVX-E2 vs OVX-E2-8-OH-DPAT.

Evidenciamos na figura 21 A que em relação ao número de “Hearing” uma redução no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $25,87 \pm 1,30$  vs  $33,00 \pm 2,62$ ,  $P < 0,05$ ). Já com relação ao número de “SAP” não observamos diferenças estatísticas entre os grupos.

Quando avaliamos o número de bolos fecais (Figura 21 B) não observamos diferenças entre os grupos.

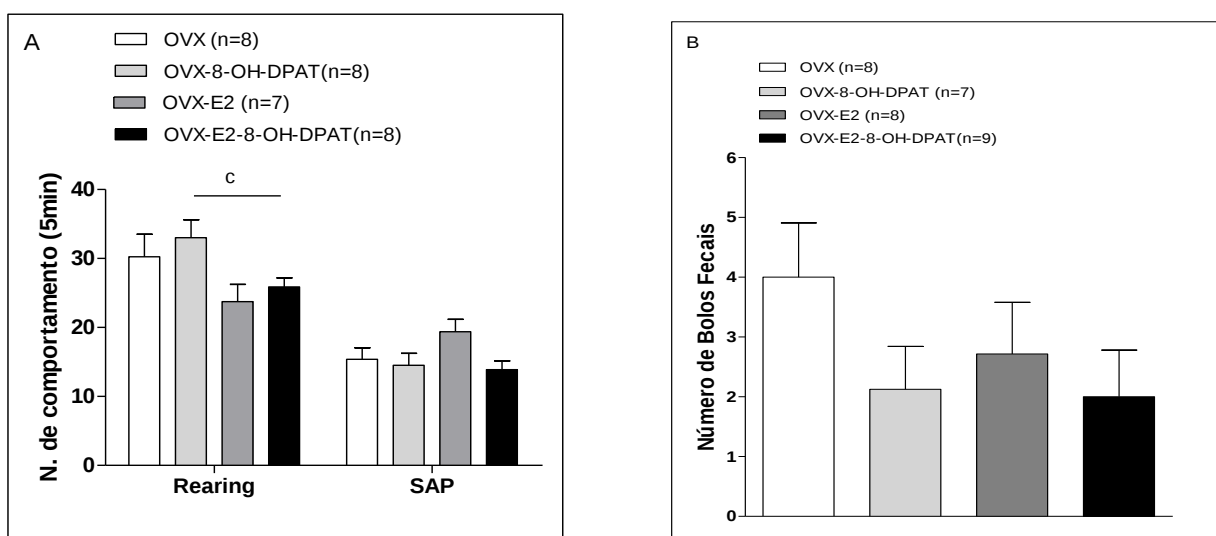


Figura 21: Avaliação do teste LEC em relação ao número de comportamentos complementares como explorações verticais (Hearing) (A) e número de postura estendida (SAP) (B) em grupos de ratos

ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>c</sup>P<0,05: compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT.

### 5.9-Avaliação das respostas comportamentais em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT no teste campo aberto.

Como evidenciado na figura 22 A observamos um menor número de quadrantes totais percorridos no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 ( $41,50 \pm 2,45$  vs  $57,63 \pm 3,53$ , P<0,01). Em contrapartida, com relação ao número de quadrantes periféricos (22 B) e centrais (22 C) percorridos não evidenciamos diferenças estatísticas entre os grupos.

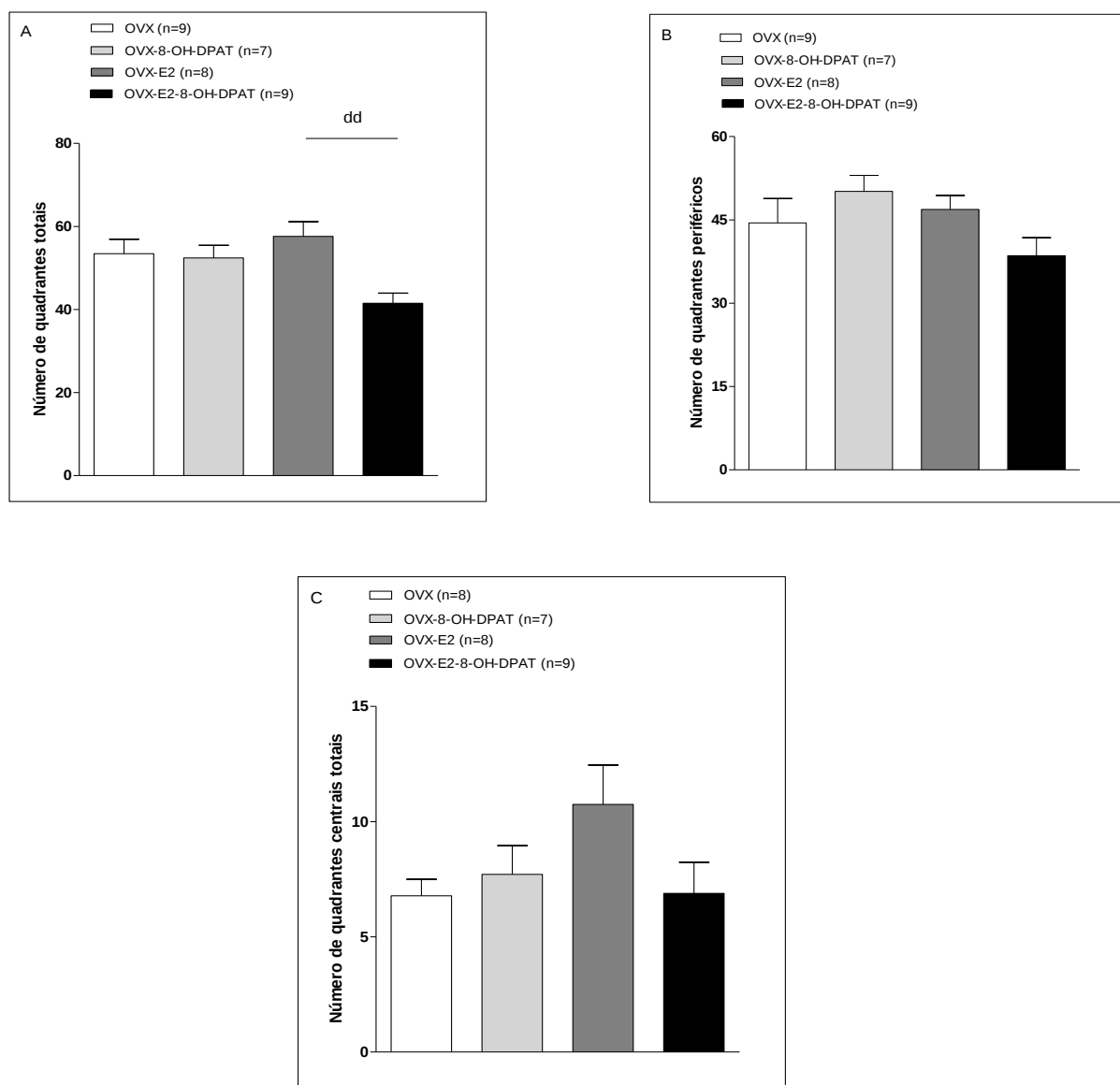


Figura 22: Avaliação do teste Campo Aberto em relação ao número de quadrantes totais percorridos (A), número de quadrantes periféricos percorridos (B) e número de quadrantes centrais percorridos (C) em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo. <sup>dd</sup>P<0,01: compara OVX-E2 vs OVX-E2-8-OH-DPAT.

Nos parâmetros relação entre o número de quadrantes centrais percorridos sobre o número de quadrantes periféricos (figura 23 A), não evidenciamos diferenças estatísticas. Assim como, a relação entre o número de quadrantes periféricos percorridos sobre o número de quadrantes totais (Figura 23 B) e número de cruzamentos no quadrante central (Figura 21 C) não diferiram entre os grupos.

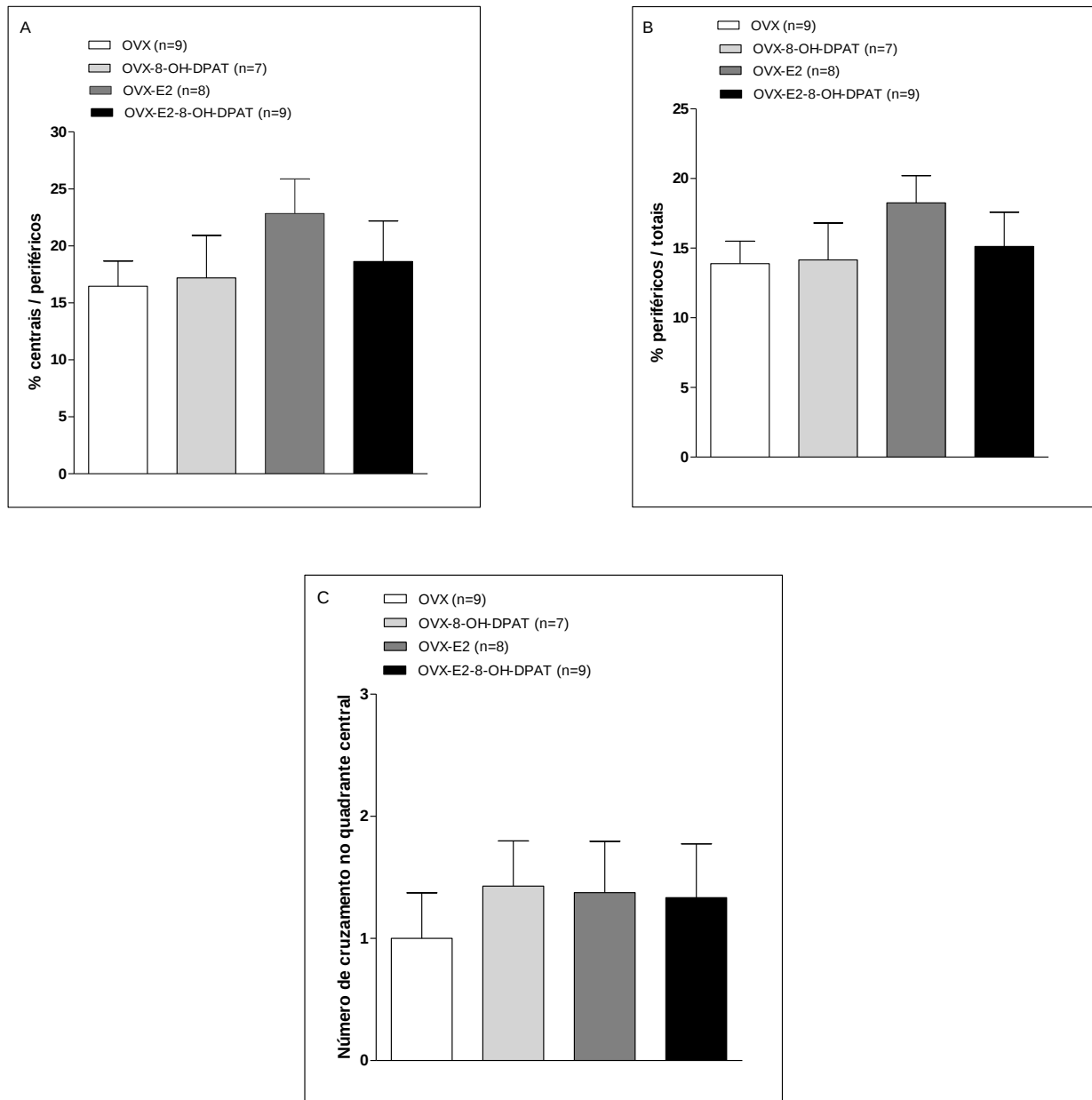


Figura 23: Avaliação do teste Campo Aberto na relação entre o número de quadrantes centrais percorridos sob o número de quadrantes periféricos em porcentagem (%) (D), relação entre o número de quadrantes periféricos percorridos sob o número de quadrantes totais em porcentagem (%) (E) e número de cruzamentos no quadrante central (F) em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) reposta com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo.

Com relação ao número de “grooming” como visto na figura (24 A) foi menor no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-8-OH-DPAT ( $2,44 \pm 0,53$  vs  $6,57 \pm 1,08$ ,  $P<0,05$ ).

Quando avaliamos o tempo de “grooming”, este foi maior no grupo OVX-8-OH-DPAT em comparação ao grupo OVX ( $63,25 \pm 14,39$  vs  $26,13 \pm 8,42$ ,  $P<0,05$ ).

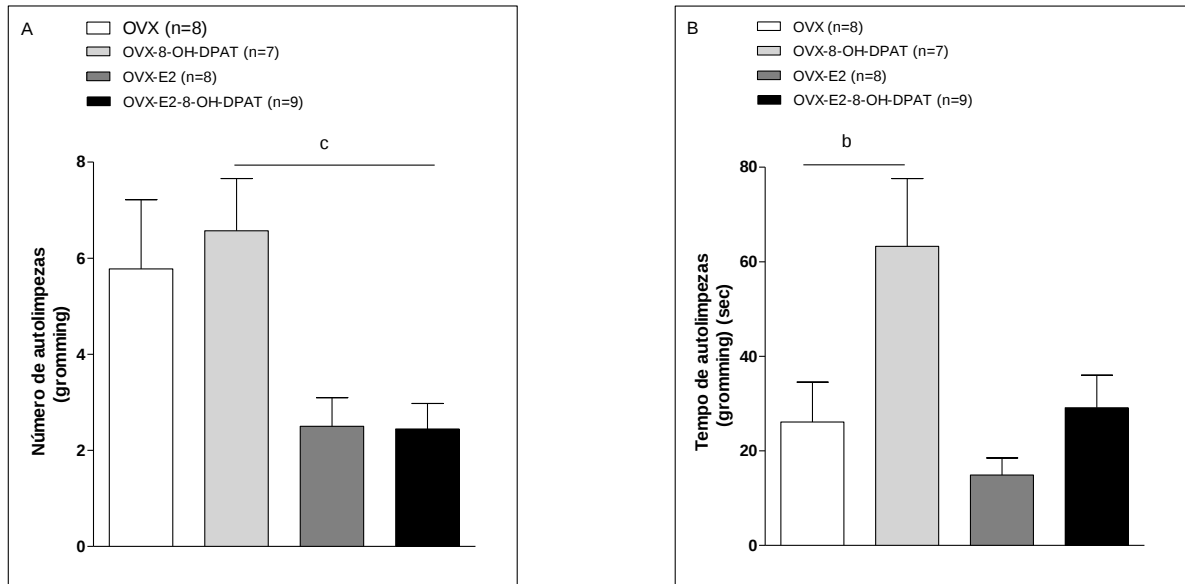


Figura 24: Avaliação do teste Campo Aberto nos parâmetros número (A) e tempo (B) de autolimpeza “grooming” em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT. <sup>c</sup> $P<0,05$ : compara OVX-8-OH-DPAT vs OVX-E2-8-OH-DPAT; <sup>b</sup> $P<0,05$ : compara OVX vs OVX-8-OH-DPAT ou veículo.

Com relação o número de exploração vertical “Rearing” (Figura 25 A) e número de bolos fecais (figura 25 B) não foram evidenciados diferenças significativas entre os grupos.

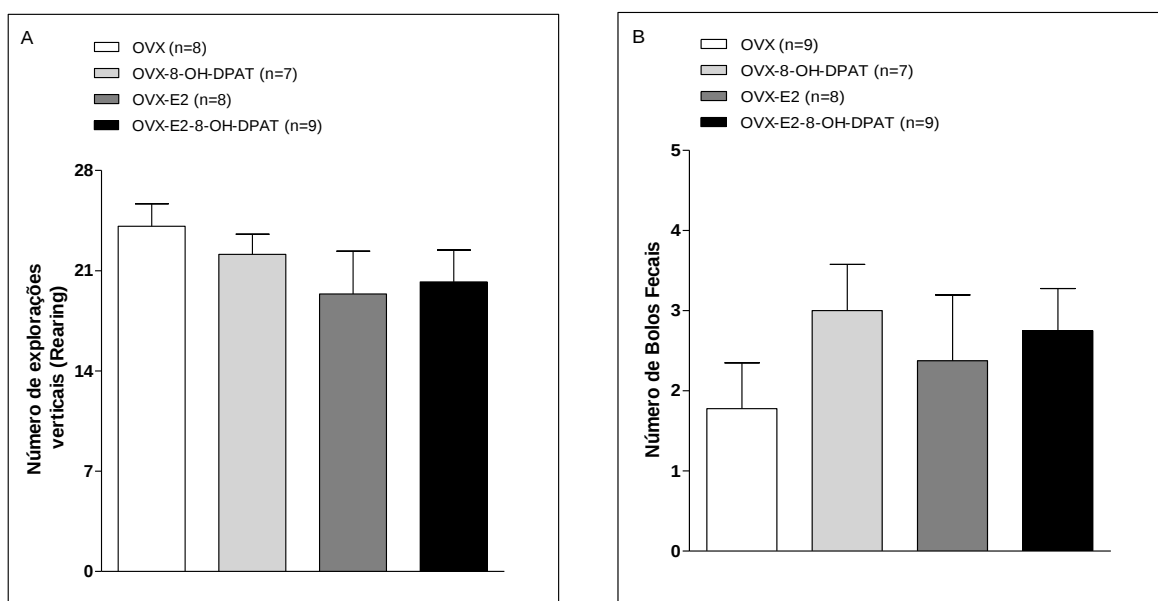


Figura 25: Avaliação do teste Campo Aberto nos parâmetros número de explorações verticais “Rearing” (A) e número de bolos fecais (B) em grupos de ratos ovariectomizadas (OVX) repostas com estrogênio (OVX-E2) e tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT ou veículo.

## 6-DISCUSSÃO

### 6.1-Estudo dos parâmetros hidroeletrólítico diários (ingestão de água, salina, volume urinário, sódio urinário e osmolalidade urinária) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.

Já é descrito que o E2 diminui a ingestão de água e salina hipertônica numa variedade de espécies, incluindo ratos. A maioria dos estudos disponíveis sugere que este mecanismo é mediado por ações clássicas em receptores nucleares, efeitos genômicos. Adicionalmente, estudos recentes indicam que a diminuição da resposta dipsogênica e natriorexigênica parece ser mediada por receptores de E2 localizados na membrana. Particularmente, experimentos onde os autores administraram uma fórmula específica de E2 (impermeável à membrana plasmática) no terceiro ventrículo apresentaram inibição da ingestão de água (SANTOLLO et al. 2013). Dessa forma, esse efeito parece ser dependente tanto de receptores nucleares quanto de receptores de membrana. A maioria dos estudos que investigam o papel do E2 na sede e apetite por sódio não realiza acompanhamento diário, essa estratégia foi fundamental para traçarmos uma metodologia que reunia a visualização dessa resposta e verificação da utilização de um fármaco adequado para compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos nessa resposta mediada pelo E2 na regulação da ingestão de fluidos. Com isso, observamos uma redução da resposta dipsogênica e natriorexigênica observada no quarto e quinto dia no grupo tratado com E2 (figura 4 A e B), esse efeito parece depender de fatores periféricos e centrais. Dentre esses fatores podemos destacar a modulação do estrógeno na ativação do SRA periférico e central, na reabsorção renal de sódio, na regulação das ações periféricas e centrais de vasopressina e na modulação do sistema serotoninérgico, além de outros sistemas fisiológicos que regulam a homeostase hídrica (ROGERS et al. 2007; STACHENFELD et al 1998; DALMASSO et al. 2011).

Diferentemente da ingestão de água, a redução da resposta natriorexigênica foi observada no sexto dia de avaliação, dado esse que refletiu na redução da preferência por sódio e ainda na diminuição da excreção renal de sódio no grupo tratado com E2. Ou seja, parece existir um mecanismo renal compensatório para manutenção da homeostase hidroeletrólítica. Além desse mecanismo compensatório, a literatura já descreve que o E2 aumenta a reabsorção de sódio atuando diretamente no aumento da expressão renal de canais epiteliais de sódio (ENaC) do túbulo distal convoluto e ducto coletor (GAMBLING et al. 2004; PECHERE-BERTSCHI et al. 2002).

Tendo em vista a ampla ação do E2 na homeostase hidroeletrólítica regulando a saciedade ao sódio, inibindo sede e modulando outros parâmetros destacados aqui, consideramos relevante entender tais mecanismos e através da administração crônica de 8-OH-DPAT nos grupos OVX e OVX-E2 buscamos avaliar o papel do E2 associado a um fármaco que interfere na atividade do sistema serotoninérgico nestas respostas. Neste sentido, não observamos diferenças estatísticas em relação à ingestão diária de água após a administração de 8-OH-DPAT. Porém em relação à ingestão de salina hipertônica, observamos no primeiro e segundo dia que após a administração do fármaco houve uma resposta natriorexigênica significativa em ratas OVX tratadas com 8-OH-DPAT agudamente que foi atenuada pela reposição estrogênica. Essa resposta parece ser dependente do efeito agudo do fármaco, já que o uso agudo de agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub> parece reduzir a atividade do sistema serotoninérgico e com isso interferir na modulação deste sistema na ingestão de sal (FONSECA et al. 2009). A atenuação do E2 nesta resposta parece ser mediada por ação direta em receptores E $\beta$  localizados no NDR que aumenta a atividade neuronal (DONNER & HANDA, 2009). Ainda nessa linha de raciocínio, esse efeito também foi refletido na preferência específica por sódio no segundo dia.

Adicionalmente, o comportamento natriorexigênico refletiu no aumento da excreção renal de sódio e volume urinário nos animais OVX tratados com 8-OH-DPAT. Nesta abordagem, o E2 ao atenuar o comportamento natriorexigênico acaba promovendo respostas compensatórias nos outros parâmetros avaliados. Por outro lado, o tratamento crônico com 8-OH-DPAT no grupo OVX, que corresponderia ao décimo segundo dia de avaliação e sétimo dia de tratamento, diminuiu a concentração urinária de sódio sem alterar a ingestão de sal. Tal efeito parece ser mediado por mecanismos serotoninérgicos centrais (CAMARGO et al. 2010) que modulam a atividade simpática renal alterando o fluxo urinário e excreção renal de sódio (CHAMIENIA & JOHNS, 1994).

Finalizando essa abordagem, as respostas encontradas nessa avaliação temporal foram fundamentais para traçarmos estratégias para avaliação dos parâmetros que serão discutidos nos itens 6.3, 6.4 e 6.5. Dessa forma tais estratégias se concentraram numa avaliação de um possível efeito crônico do tratamento com 8-OH-DPAT associado a uma reposição prévia de E2 em ratas OVX.

## **6.2-Estudo dos parâmetros metabólicos diários: Ingestão de alimento e ganho de peso em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT.**

Nesses parâmetros estudados aqui, buscamos compreender se alteração na homeostase hidroeletrólítica poderia comprometer o balanço energético desses animais tratados com E2. Evidências experimentais e estudos epidemiológicos demonstram que o balanço energético em fêmeas pode variar com as oscilações dos hormônios gonadais (WADE, 1972; BUTERA, 2010). Dentre os hormônios gonadais, está bem documentado que o estrogênio suprime a ingestão de alimentos. Esse comportamento anorexígeno mediado pelo E2 apresenta mecanismos periféricos que resultam no aumento da leptina plasmática, e central que medeiam a expressão diferencial de mRNA de neuropeptídeos no hipotálamo (SILVA et al. 2010).

A ovariectomia induz ganho de peso relacionado principalmente a um aumento da ingestão alimentar (MYSTKOWSKI & SCHWARTZ, 2000). A administração sistêmica e central de E2 em ratas OVX parece impedir essas mudanças (GEARY et al 200; BUTERA & CZAJA, 1984). Curiosamente, observamos em nossos resultados que no segundo dia após a ovariectomia os animais OVX-E2 reverteram a perda relativa de peso corporal em relação aos animais OVX, essa perda após a ovariectomia é comum, porém o E2 reverteu essa perda sem interferir na ingestão alimentar, retenção hídrica e ingestão de fluidos. Diferente do presente trabalho, a maioria dos estudos experimentais que demonstram efeitos anorexígenicos mediados pelo E2 não avalia os primeiros dias de cirurgia, dessa forma é necessário mais estudos para entender as bases fisiológicas desse efeito agudo do E2 em reverter a perda de peso nos primeiros dias de ovariectomia.

Posteriormente, observamos em nossos resultados que ratas OVX tiveram um ganho de peso relativo em relação à reposição com E2 no quarto e quinto dias. Como OVX-E2 apresentaram perda de peso corporal, esse efeito pode ser explicado em parte pela menor ingestão de fluidos e uma tendência a resposta anorexígena do E2. Além disso, possivelmente outros sistemas que alteram os efeitos metabólicos que apesar de não ter sido avaliado neste trabalho, podem estar sendo recrutados pela reposição de E2. Um desses sistemas poderia ser a modulação da sinalização leptinérgica nos neurônios do hipotálamo que regulam o apetite (FRIEDMAN E HALAAS, 1998; DHILLON et al. 2006). Vale lembrar que os estudos que demonstram uma inibição do apetite e a consequente redução do tamanho da refeição, têm sido associadas à sinalização de colecistocinina (CCK) liberada do intestino delgado durante as

refeições, um sinal de retroalimentação negativo que regula o tamanho das refeições (GEARY, 2001).

A administração de 8-OH-DPAT no dia seguinte promove ganho de peso no grupo OVX, não sendo suficiente para aumentar no grupo OVX-E2, apesar de observamos uma tendência a esse ganho em relação ao grupo OVX-E2 controle. Como discutido anteriormente essa resposta pode ser em parte vinculada a maior ingestão de salina hipertônica nesse grupo, sendo o sal um íon osmoticamente ativo que pode interferir no peso corporal. Como mencionado anteriormente, nosso foco neste trabalho envolveu alterações na homeostase hidroeletrolítica. Todavia, possíveis alterações nos parâmetros metabólicos tais como diminuição da sinalização leptinérgica associada à diminuição da atividade serotoninérgica pelo tratamento agudo com agonista 5-HT<sub>1A</sub> pode está atrelado a essa resposta. Essa hipótese é sustentada por evidências experimentais que demonstram que animais ob/ob, animais geneticamente modificados que apresentam deficiência na produção de leptina, apresentam diminuição dos transportadores de 5-HT no NDR, sugerindo que há controle da sinalização leptinérgica ao nível de NDR no controle da atividade serotoninérgica (COLLIN et al 2000). Ainda nesta linha, estudos eletrofisiológicos em animais Zucker, com ausência de receptor de leptina, demonstraram que os neurônios serotoninérgicos desses animais são hiperexcitáveis em comparação aos ratos magros (OHLIGER-FRERKING et al. 2003). No último dia de avaliação que corresponde ao décimo segundo dia, o efeito do tratamento crônico de 8-OH-DPAT potencializou E2 na resposta anorexígena. Possivelmente, a soma desses efeitos pode ter resultado no aumento da concentração extracelular de 5-HT em algumas áreas do prosencéfalo (ARTIGAS et al. 1996). Porém para variação de peso, o tratamento crônico de 8-OH-DPAT foi fundamental para promover tal perda, já que a diferença estatística foi significativa em relação ao grupo OVX-E2. Essa resposta não foi associada à alteração da ingestão alimentar e nem ingestão de fluidos o que em parte pode estar associado a alguma modulação no metabolismo energético.

Dessa forma, apesar do metabolismo energético não ser o foco deste trabalho tais resultados nós intrigaram e possivelmente um levantamento mais apurado envolvendo E2, neurônios 5-HT no NDR e circuitos cerebrais envolvidos no comportamento ingestivo deverão ser mas cautelosamente investigado.

### **6.3-Estudo dos parâmetros hidroeletrolíticos (ingestão de água, salina, preferência por sódio, volume urinário, sódio urinário e plasmático, osmolalidade urinária e plasmática, proteína plasmática, hematócrito) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT: em condição basal e após depleção de sódio.**

O papel do E2 na homeostase dos fluidos corporais tem sido investigado, embora a natureza precisa desses efeitos fisiológicos do E2 não seja totalmente esclarecida (CURTIS, 2009). Certamente, as alterações comportamentais e neuroendócrinas moduladas pelo E2 estão relacionadas ao papel desse hormônio no equilíbrio hidroeletrolítico em ratas (CHATAIGNEAU & SCHINI-KERTH, 2005).

Os comportamentos de ingestão de água e sal são exemplos de estado motivado caracterizado por sinais fisiológicos integrados de controle do mecanismo de regulação de volume e osmolalidade. Dessa forma, destacam-se mecanismos humorais e centrais que medeiam essa regulação. Neste sentido, evidenciamos que o E2 promove uma diminuição da resposta dipsogênica em condição basal, durante o intervalo de 120 minutos de avaliação durante a manhã. Já no comportamento natriorexigênico observamos redução tanto em condição basal quanto em condição de depleção de sódio (condição essa que induz sede e

apetite ao sódio intensamente). Ademais, a administração sistêmica de E2 inibe a resposta natriorexigênica induzida pela privação de sódio em ratas OVX (STRICKER et al. 1991; FITZSIMONS, 1998). Atrélado a isso, evidenciamos no presente trabalho o mesmo efeito da reposição com E2 nas ratas OVX tratada com agonista 5-HT1A durante sete dias. Estudos realizados pelo grupo de Ciccocioppo demonstraram que a administração sistêmica aguda de agonistas 5-HT1A (COOPER et al. 1988; COOPER & CICCOCIOPPPO, 1993) aumentava a ingestão de sal em animais submetidos à privação hídrica. Por outro lado, a administração sistêmica por longo prazo de agonistas serotoninérgicos de receptores 5-HT1A provoca alterações na plasticidade dos autorreceptores somatodendríticos o que possivelmente explicaria a inibição da ingestão (FONSECA et al. 2009). Adicionalmente, na condição de depleção de sódio evidenciamos ainda um efeito adicional do E2. Tal efeito promoveu uma potencialização do tratamento crônico com 8-OH-DPAT na inibição específica da ingestão de salina hipertônica. Dessa forma, essa resposta observada no comportamento ingestivo parece depender dos efeitos do E2 na modulação do sistema serotoninérgico, tal hipótese é ainda reforçada por estudos de DALMASSO et al. 2011 que demonstraram em condição de depleção, inibição do apetite por sódio durante a fase ingestiva, mediada pelo aumento de células imunorreativas de Fos/5-HT no NDR.

o papel deste hormônio na regulação central da homeostase hidroeletrolítica tem sido atribuído através da demonstração de receptores estrogênicos (ER) em núcleos cerebrais (SOMPONPUN, 2007). Por lado, efeitos periféricos parecem modular essa resposta. Mulheres durante o período pré-ovulatório, apresentam aumento do volume extracelular (STEPHENNSO & KOLKA, 1988). Além disso, durante a gravidez observamos uma retenção de água e sódio (STACHENFELD, 2005). Evidenciamos uma diminuição do volume urinário nos animais tratados com E2 na condição de depleção de sódio. Tal observação foi associada à maior retenção de sódio. A utilização de um diurético de alça promove perda de água, devido à maior perda de sódio e retenção de potássio, sendo o sódio um íon osmoticamente ativo, ele carrega água e com isso há eliminação de uma urina altamente diluída. Porém o E2 atenuou essa perda e consequentemente não compromete a concentração plasmática de sódio, mesmo apresentando comportamento antinatriorexigênico. Estudos experimentais têm atribuído esse efeito de retenção de sódio à regulação renal da expressão de canais de sódio, como discutido anteriormente. Essa hipótese é reforçada visto que, o E2 parece modular a atividade simpática renal, regulando os níveis de catecolaminas, uma vez que ratas OVX apresentam aumentados níveis plasmático e renal de catecolaminas e o E2 atenua esse aumento (GRACELI et al. 2013). Evidências experimentais, demonstram que E2 pode inibir a secreção e liberação de catecolaminas adrenal (FERNANDEZ-RUIZ et al. 1988) e pré-sináptica (HEESCH & ROGERS, 1995). Como a atividade simpática via receptores  $\alpha 1b$ , diminui a excreção renal de sódio (DIBONA, 2005) e o E2 modula negativamente a liberação de catecolaminas como descrito anteriormente, essa diminuição do sódio urinário induzido pelo E2 parece não envolver atividade simpática renal.

Em contrapartida, essa abordagem mencionada acima parece ser alvo do sistema serotoninérgico central na modulação da excreção renal de sódio via atividade simpática. A administração icv de 5-HT promove natriurese. Tal efeito parece ser dependente de uma diminuição da atividade simpática renal, visto que a desnervação renal abole essa resposta (MONTES & JOHNSO, 1990). Ainda nesta linha de raciocínio, a injeção aguda bilateral de 8-OH-DPAT na área lateral septal aumentou a excreção urinária em ratos privados de água (CAMARGO et al. 2010). Desde 1991, Reis e colaboradores demonstraram uma importante influência do sistema serotoninérgico na taxa de excreção renal de sódio via administração icv de fármacos que modula a atividade serotoninérgica (REIS et al. 1991). No presente trabalho demonstramos que o tratamento crônico com 8-OH-DPAT diminui o volume de urina e a excreção renal, e a associação deste tratamento com a reposição hormonal potencializam essa

diminuição. Essa modulação serotoninérgica na regulação da excreção renal parece envolver inervação simpática, porém a sinalização periférica e central possivelmente envolvem mecanismos específicos.

Em condição basal, observamos um aumento da concentração plasmática de sódio, quando associamos a terapia estrogênica e o tratamento crônico com agonista 5-HT<sub>1A</sub>. Esse aumento da concentração plasmática parece influenciar a inibição do apetite específico por sódio nesta condição. Porém é curioso que esse aumento da concentração plasmática de sódio, não ter induzido aumento da excreção renal. Neste sentido, é interessante ressaltar que esse aumento do sódio plasmático numa condição de reposição com E2 e tratamento prolongado com 8-OH-DPAT pode comprometer a homeostase hidroeletrólítica e a atividade elétrica das células. Ainda com relação à fase de consumo, o padrão de resposta com relação ao volume e excreção renal de sódio, após o período de ingestão parece depender tanto do tratamento com E2, quanto do tratamento com 8-OH-DPAT, ou seja, a diminuição da excreção renal de sódio influencia a redução do volume urinário.

A manutenção da osmolalidade e a regulação do volume dos fluidos corporais são fundamentais para manter as condições fisiológicas dos mamíferos. Dessa forma, observamos que a depleção de sódio provoca uma diminuição da osmolalidade plasmática no grupo OVX, em contrapartida tanto o tratamento com agonista 5-HT<sub>1A</sub>, quanto à reposição e associação dos dois efeitos atenuam essa redução da osmolalidade observada pela depleção de sódio. Adicionalmente, o percentual do volume ocupado pelos eritrócitos em uma amostra de sangue é quantificado como hematócrito (ou volume celular condensado). Neste parâmetro, observamos que a depleção de sódio promove uma tendência de hemoconcentração devido à desidratação, em contrapartida o tratamento com E2 atenua essa redução de volume na condição de depleção. No hemograma, os valores de referência para o hematócrito em mulher é inferior a de homens, com uma média em mulheres em torno de 40% e em homens de 45%. O tratamento com E2 por uma semana é capaz de reduzir o hematócrito em condição basal (VILHENO-FRANCO et al. 2011). Em contrapartida, não foram observadas alterações do hematócrito após 90 min, 24 e 48 após a administração de E2 em ratas OVX (GRAVES et al. 2011) em condição basal. Estudos in vitro demonstraram uma diminuição da agregação de eritrócitos em amostras de sangue de mulheres na pós-menopausa submetidas à terapia hormonal, o que poderia impedir uma alta viscosidade do sangue (GONÇALVES et al. 2001). Dessa forma, essa diminuição observada no grupo OVX-E2 em relação ao grupo OVX em condição de depleção de sódio, parece ser modulada via E2 na agregação das hemácias. Outro parâmetro utilizado para avaliação de volume plasmático é a proteína plasmática. O tratamento com E2 aumenta proteína plasmática, que normalmente é uma indicação de volume plasmático reduzido. Esse efeito é observado tanto na condição basal quanto na depleção de sódio. Já é descrito que em mulheres no terço final de gestação há um aumento da síntese de proteínas, que parece ser dependente de E2 (LAURELL & RANNEVIK, 1979). Esse efeito parece ser dependente de uma ação direta de E2 no fígado, promovendo a modulação da síntese hepática de proteínas plasmática (EISENFELD et al. 1976). Embora concentração de proteína do plasma e a dosagem de hematócrito são comumente usadas para indicar as alterações no volume plasmático, visualizamos respostas distintas do E2, ou seja, pela avaliação de proteína plasmática o grupo OVX-E2 reduziu o volume circulante, já através da mensuração de hematócrito o E2 atenua essa redução, porém ambas são medidas indiretas de volume plasmático.

Em síntese, podemos sugerir que tanto o tratamento crônico com 8-OH-DPAT quanto à reposição com E2 são fundamentais em atenuar a desidratação gerada pela depleção de sódio em determinados parâmetros discutido no presente trabalho.

#### **6.4-Avaliação por radioimunoensaio dos parâmetros neuroendócrinos (ANG I, ANGII, OT, AVP, ANP, CORT) em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.**

Em circunstâncias normais a alteração da homeostase dos fluidos corporais é corrigida primariamente pelos rins. O papel renal nesta função é de impedir alterações nos níveis de sódio via ativação do SRAA. Tal sistema é acionado mediante uma condição de hiponatremia, que consequentemente induz a liberação de renina, a principal molécula responsável pela ativação do SRAA (TIGERSTEDT & BERGMAN, 1898; BUONINCONTI, 1966; DAVIS & FREEMAN, 1976; FITZSIMONS, 1998). Estudos experimentais demonstram a influência dos hormônios esteróides ovarianos na manutenção do equilíbrio dos fluidos corporais, via mediação SRA periférico e encefálico (KISLEY et al., 1999; KUROSKI, 1999). No presente trabalho, curiosamente não evidenciamos alteração da ANG I plasmática no tratamento com E2 em ratas normohidratadas e normovolemicas, porém evidenciamos um aumento da ANG I no grupo tratado com 8-OH-DPAT associado à reposição com E2, em relação ao grupo tratado somente com o agonista 5-HT1A. Em contrapartida, essa resposta foi contrária nos animais depletados, ou seja, essa associação provocou queda de ANGI. Dessa forma, essa diferença no padrão de geração de ANGI nessas condições sugere que esse aumento na condição basal possivelmente contribuiu para uma diminuição da resposta do SRA numa condição que naturalmente deveria estimular a sua geração. A administração periférica de antagonista de 5HT2 em humanos promove queda da pressão arterial média, tal efeito foi associado ao aumento da atividade de renina e aumento dos níveis plasmáticos de ANG II em indivíduos depletados de sódio (ZOCALLI et al. 1983). No nosso estudo, o tratamento crônico com agonista 5-HT1A parece aumentar a atividade serotoninérgica do NDR provavelmente através da dessensibilização do receptor (ALBERT et al. 1996; BLIER et al. 1998; ASSIÉ et al. 2006) e com isso, o efeito é oposto do observado no tratamento com antagonistas. Esse efeito possivelmente parece ser atribuído à potencialização indireta do E2 na resposta periférica do sistema serotoninérgico aumentando ANG I, visto que os efeitos diretos do E2 são: diminuição de renina plasmática e diminuição da síntese e da atividade da enzima conversora de angiotensina (HARVEY et al.1999; SCHUNKERTH et al. 1997) efeitos esses que resultaria em diminuição de ANGI. Por outro lado, em condição de hiponatremia que induz aumento de ANGI e ANGII, observamos uma atenuação desse aumento modulada pelo E2. Em consonância, os níveis circulantes ANG II são menores em macacos OVX repostos com E2 (BROSNIHAN et al.1997). Tal efeito parece ser mediado pela diminuição da atividade de ECA no plasma e no pulmão, com o tratamento com E2 em níveis suprafisiológicas (GALLAGHER et al. 1999).

Os núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO) e a neurohipófise desempenham papel crucial na manutenção da homeostase dos fluidos corporais. Tal modulação ocorre devido à secreção de AVP e OT frente a diversos estímulos (ANTUNES-RODRIGUES et al. 2004). Neste sentido, nossa avaliação demonstrou um aumento de OT, porém não de AVP em condição basal no grupo tratado cronicamente com agonista 5-HT1A e repostado com E2 em relação ao grupo que foi repostado somente com E2. Estudos realizados em nosso laboratório evidenciaram um aumento significativo na concentração plasmática de OT e AVP em ratos tratados sistemicamente com sertralina (inibidor da recaptação de serotonina) por 21 dias (MAGALHÃES-NUNES et al. 2007). Neste contexto, apesar de não ter sido observado efeito do E2 na concentração plasmática de OT em condição basal, o E2 vem sendo implicado em modular a liberação de OT de forma positiva (YAMAGUCHI et al. 1979). Lembrando que neste protocolo os animais depletados tiveram acesso à água, desta forma a diurese provocada pela furosemida era repostada apenas parcialmente pois os animais ficavam numa condição de hiponatremia intensa que é um estímulo de inibição da liberação de OT. Dessa forma, a

depleção diminuiu a concentração plasmática de OT no grupo OVX, mas tal efeito não foi observado nos demais grupos, resultado este que reforça o envolvimento de sistema serotoninérgico e E2 na modulação de OT tanto em condição basal quanto após desafios homeostáticos. Estudos experimentais evidenciaram a presença de terminais serotoninérgicos em neurônios ocitocinérgicos, localizados no NPV e NSO (SAWCHENKO et al. 1983). Especificamente no NPV e NOS, locais de síntese de OT, foram demonstrados através de hibridização *in situ* que o receptor estrogênico do tipo beta (ER- $\beta$ ) está amplamente distribuído (SIMERLY et al. 1990). Na depleção de sódio, a reposição com E2 eleva a concentração plasmática de OT em relação à OVX, assim como o tratamento crônico com agonista 5-HT1A. Achados experimentais de FRANCHINI & VIVAS (1999) em ratos submetidos à diálise peritoneal demonstraram um aumento de c-Fos durante a fase de consumo de sódio induzida pela diálise, e que o sistema ocitocinérgico do NPV parece ser ativado por neurônios serotoninérgicos localizados no NDR. Ativação do sistema serotoninérgico através da administração de fenfluramina aumenta os níveis plasmáticos de OT e isso refletiu num aumento da expressão de Fos em neurônios ocitocinérgicos da porção magnocelular do NPV (MIKKELSEN et al. 1999). O aumento de OT plasmática, bem como da atividade de neurônios ocitocinérgicos torna-se expressivo após a ingestão de sal, sendo este mecanismo fisiológico de inibição de apetite mais específico ao sódio (GODINO et al. 2007). Adicionalmente, evidências experimentais demonstraram que a terapia estrogênica restaurou a “up-regulation” de OT em animais OVX submetidos a estímulo osmótico (CROWLEY & AMICO, 1993). Com isso, essa interação do sistema serotoninérgico E2 e OT parece representar um dos principais mecanismos que explica a diminuição do apetite por sódio, apesar da fervorosa discussão a cerca da importância de OT plasmático na regulação do apetite ao sódio. Mas esse achado pode em parte representar o envolvimento do sistema ocitocinérgico na resposta antecipada do comportamento antinatriorexigênico evidenciada no grupo OVX-E2, OVX-8-OH-DPAT e OVX-E2-8-OH-DPAT em condição que induz exagerada resposta natriorexigênica.

Já em relação ao AVP, evidenciamos um aumento da concentração plasmática após a depleção em todos os grupos quando comparados a si mesmo em condição basal. A secreção de AVP induzida por hipovolemia ocorre através da redução da frequência de disparo de receptores de baixa pressão localizados no átrio, que inibem tonicamente a liberação de AVP, através de uma via que envolve o NTS (BISSET & CHOWDREY 1988; SHARE 1988). Estima-se que o limiar para induzir a liberação de AVP seja uma perda de volume de sangue da ordem de 10 a 20% do volume total (SHARE, 1988). O AVP atua nos ductos coletores renais aumentando a reabsorção de água, uma vez que aumenta a inserção de aquaporina 2 na membrana apical dos ductos coletores. Como já foi descrito por KLUSSMANN et al. 2000, em que a expressão de aquaporinas 3 e 4 na membrana basolateral não são moduladas por AVP, estas são definitiva e assim a água é reabsorvida da urina para o sangue. O aumento AVP observado neste trabalho pode ser decorrente da diurese induzida pela furosemida após 24 horas sem privação hídrica. Com relação à condição de depleção de sódio, observamos um aumento de AVP plasmática induzida pelo tratamento crônico com 8-OH-DPAT. Atrelado a isso, foi observada a presença de terminais serotoninérgicos em terminais vasopressinérgicos (SAWCHENKO et al. 1983), o que em parte explica a modulação da síntese de AVP pelo sistema serotoninérgico. Esses terminais são originados no NDR e MRN que modula a secreção de AVP através da ativação de receptores 5-HT2A e 5-HT2C (ANDERNSON et al. 1992). A visualização dessa resposta foi ainda observada por estudos farmacológicos com microinjeção de agonista de receptor 5-HT2A (DOI) e 5-HT2C (mCCP) no ventrículo lateral que induziu aumento dos níveis plasmático de AVP acompanhado com aumento de RNAm de AVP no NPV (JØRGENSEN et al. 2003). Dessa forma, essa resposta observada no presente

trabalho reforça um aumento da atividade serotoninérgica do NDR ascendente a essas estruturas prosencefálicas.

Dados da literatura têm estabelecido que após situações de hipovolemia, há uma redução na concentração plasmática de ANP (ZONGAZO et al. 1992). Ao contrário, quando a oferta dietética de NaCl é excessiva desenvolve-se um aumento da liberação do ANP (MAACK, 1996). Nesta condição, a hipernatremia induz a uma elevação do volume do líquido extracelular (LEC), que promove um aumento do retorno sanguíneo ao átrio direito, distensão da parede atrial e resultante estimulação da liberação de ANP, que é potencializada pela OT (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Na situação de depleção de volume, condição de hiponatremia, observamos uma redução da concentração plasmática de ANP em todos os grupos. Entretanto, o tratamento com E2 não interferiu em tal resposta. A colocação de receptores para estradiol em cardiomiócitos atriais apoia a ideia de que o E2 desempenha um papel importante na regulação da síntese de ANP (BACK et al. 1989). Além disso, já é bem estabelecido que o aumento da síntese e da concentração plasmática de ANP é potencializado pelo tratamento com E2 (BELO et al. 2008). Porém no presente trabalho não evidenciamos qualquer efeito significativo do tratamento com E2 sobre a secreção de ANP em condições basais e após depleção de sódio. A única diferença estatística encontrada entre os grupos foi o aumento significativo da concentração de ANP em condição de depleção de volume no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao OVX-E2. Resultado este, que norteou nossa discussão sobre um possível aumento da atividade serotoninérgica do NDR por esse tratamento crônico. Tal hipótese é sustentada por trabalhos executados pelo nosso grupo, onde lesões eletrolíticas do NDR (situação contrária a do presente trabalho) reduzem drasticamente a liberação de ANP em condições basais ou após expansão de volume do LEC (REIS et al. 1994). Além desses efeitos podemos atribuir esse aumento de ANP no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2 através do aumento de OT plasmático também evidenciado neste grupo. Tal relação pode ser associada através de estudos que demonstraram que administração de OT periférica e central, aumenta os níveis plasmáticos de ANP (HAANWINCKEL et al. 1995). Outra explicação que poderia potencializar esse aumento de ANP em condição de depleção seria o sódio plasmático que está também aumentado em condição basal, o que possivelmente induziu um aumento da liberação de ANP após a depleção.

Evidências experimentais têm associado à atividade do eixo HPA aos esteróides gonadais, tendo em vista um maior aumento de CORT em fêmeas em comparação aos machos (KITAY, 1961) e principalmente durante o proestro (ATKINNSO & WADDELL, 1997). Dessa forma, nossos resultados corroboram com os dados da literatura, uma vez que o tratamento com E2 aumentou a concentração plasmática de CORT tanto em condição basal quanto em depleção de sódio. Evidências científicas, demonstram que em ratas OVX, o tratamento com E2 potencializa a secreção de CORT em condição basal e após estímulos estressores. Esse aumento parece ser dependente do aumento de ACTH (CAREY et al. 1995). Essa modulação parece envolver mecanismos centrais, evidências experimentais mostraram que ratas intactas apresentaram uma maior expressão de RNAm para CRH no NPV ventral durante o período de proestro (BOHLER et al. 1990) assim como ratas OVX-E2 (OCHEDALSKI et al. 2007). E a CORT parece modular a sinalização estrogênica, uma vez que a adrenalectomia reduziu a expressão de RNAm para ER- $\beta$  (diminui a expressão de CRH) no NPV, enquanto o tratamento com CORT reverteu este efeito de forma dependente (ISGOR et al. 2003). Com relação aos resultados do efeito do tratamento crônico com 8-OH-DPAT no grupo OVX, visualizamos uma redução dos níveis plasmáticos de CORT em condição basal, tal efeito possivelmente pode ser em parte mediado por ativação de vias ascendentes do sistema serotoninérgico do NDR modulando neurônios CRHérgicos NPV. Essa hipótese é sustentada através de trabalho em que a microinjeção aguda de agonista de 5-HT<sub>1A</sub> no NPV, aumenta a concentração plasmática de ACTH (PAN & GILBERT, 1992) que é o principal estímulo para

síntese e liberação de CORT. Essa resposta evidenciada aqui em condição basal parece estar vinculada a uma possível diminuição na sinalização intracelular de receptores 5-HT1A no NPV. Como demonstrado por trabalhos em que a administração de agonista de receptores de 5-HT2A diminuiu a concentração plasmática de ACTH e tal achado é associado a uma dessensibilização transiente funcional, ou seja, sem alterar a expressão do receptor 5-HT1A no hipotálamo (ZHANG et al. 2001).

Essas respostas endócrinas são fundamentais para ajustar a homeostase hidroeletrolítica, ou seja, atenua ou potencializa os sistemas fisiológicos controladores.

#### **6.5-Estudo da expressão gênica no NDR (5-HT1A, TPH2 e GAD) e síntese protéica de TPH2 em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT em condição basal e após depleção de sódio.**

A atividade ascendente dos neurônios serotoninérgicos da rafe mesencefálica é modulada pela liberação local de serotonina. Estudos têm demonstrado que o resultado desta modulação é via autoreceptores somatodendríticos do subtipo 5-HT1A que levam à redução na transmissão e na liberação do neurotransmissor em sítios prosencefálicos (AGHAJANIAN et al. 1987; BLIER et al. 1998; HJORTH et al. 2000; HENSLER, 2003). Como nossas evidências têm atribuído as respostas verificadas nesta discussão a uma possível dessensibilização desses receptores evocada pelo tratamento crônico com 8-OH-DPAT, verificamos o RNAm deste receptor para confirmar nossa hipótese. Dessa forma, observamos uma diminuição das unidades arbitrárias do RNAm somente no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT em relação ao grupo OVX-E2, em condição basal. Apesar de não verificarmos diferenças significativas no grupo OVX-8-OH-DPAT, observamos tendência à redução. Os trabalhos que advogam a hipótese de dessensibilização causada pela estimulação repetida dos autorreceptores 5-HT1A em condição basal observam esse achado num período de 2 a 3 semanas de tratamento com agonista (RIAD et al. 2001) nosso tratamento ocorreu apenas em 1 semana. Dessa forma essa redução significativa observada na condição basal pode ser atribuída à importância de tal associação na regulação da expressão do receptor 5-HT1A no NDR. Tem-se discutido que ratas OVX apresentariam uma supra-regulação dos autorreceptores 5-HT1A somatodendríticos no NDR ou aumento da expressão dos autorreceptores 5-HT1B em sub-região ventromedial do NDR, ambas revertidas pela reposição estrogênica (LU & BETHEA, 2002; BOUALI et al. 2003; HIROI & NEUMAIER, 2009). Diferentemente da literatura não evidenciamos diminuição da expressão do receptor 5-HT1A no tratamento com E2 em condição basal, possivelmente tal diferença pode ser explicada pelo tempo de tratamento, dose e a condição avaliada, já que em condição de depleção observamos uma redução da expressão de 5-HT1A que possivelmente explicaria o envolvimento deste sistema na resposta antinatriorexigênica e neuroendócrina. Ainda neste contexto, a depleção de sódio induz diminuição da imunomarcação de c-Fos/5-HT no NDR em animais que não tiveram acesso aos fluidos em relação aos animais que foram ofertados os fluidos (BADAUÊ et al. 2007). Diante desses resultados, parece que ao nível molecular há diferenças na modulação do E2 e sistema serotoninérgico nas respostas hidroeletrolíticas em relação à condição experimental em que o animal encontra-se. Ainda nesta linha de raciocínio, é necessário verificar a importância tanto do tempo de reposição hormonal quanto da dose, pois a literatura científica demonstra efeitos do E2 em intervalo de tempo e doses menores do que os utilizados neste trabalho.

A influência do estrogênio sobre a síntese de serotonina é amplamente discutida, e a maioria dos autores defende uma modulação positiva sobre esta síntese através do aumento da expressão da enzima TPH2 (BETHEA et al. 2000; GUNDLAH et al. 2005; NOMURA et al.

2005; SANCHEZ et al. 2005; DONNER & HANDA, 2009). Contrariando esses dados da literatura, nós fomos o primeiro grupo a mostrar uma modulação negativa do tratamento com E2 e expressão de TPH2. Essa modulação foi verificada em condição basal, ou seja, em animais submetidos à depleção não evidenciamos tal resposta. Neste sentido, estudo recente nos permite especular este achado aparentemente paradoxal, através de evidências encontradas em cadáveres de indivíduos que sofriam da chamada “Depressão Maior” com elevada expressão de mRNA da enzima TPH2 no NDR, apesar dos baixos níveis de serotonina (BACH-MIZRACHI, 2006). Dessa forma, essa resposta aparentemente adaptativa observada neste trabalho, parece ser uma tentativa do organismo em restaurar a homeostase neuroquímica, devido ao possível aumento da atividade serotoninérgica, mas tal especulação deve ser cuidadosamente interpretada, visto que não temos ainda, as avaliações de atividade serotoninérgica neste trabalho. Não podemos deixar de ressaltar que neste estudo, diferentemente dos trabalhos que visualizam aumento da expressão de TPH2, o tratamento com E2 foi realizado durante um intervalo de tempo maior (13dias) e com uma dose maior. Com tais diferenças, podemos especular uma possível diminuição da sinalização estrogênica devido ao tempo de tratamento e a dose elevada, que refletiria na menor resposta na sinalização mediada por receptor  $\beta$ ER (CLARK et al. 2013). Adicionalmente, nossos resultados podem representar uma tentativa do sistema serotoninérgico compensar a liberação excessiva de serotonina, resultando numa possível restauração da homeostase do sistema o que resultaria nessa diminuindo da expressão de mRNA e síntese da TPH2. Ainda nesta linha de raciocínio, estudos demonstraram que um nível de estado estacionário de TPH2 mantida pela biossíntese contínua é contrabalançado pela degradação rápida devido à proteólise dependente de ATP, a rápida proteólise é, obviamente, uma grande influência na determinação do teor de TPH na célula. A taxa de degradação pode ser sensível às condições fisiológicas da célula (HASEGAWA et al. 1995) . Dessa forma, possivelmente essa diminuição da proteína assim como seu RNAm pode está relacionada ao aumento da atividade do neurônio serotoninérgico do NDR.

O tratamento crônico com agonista seletivo de receptores 5-HT1A leva a uma considerável queda do mRNA da TPH2 no mesencéfalo de camundongos (POPOVA et al. 2010), o que explicaria em parte a diminuição da expressão de TPH2 no presente trabalho . Contudo, a associação do 8-OH-DPAT com E2 parece aumentar a atividade serotoninérgica em longo prazo o que resultaria nessa resposta. Entretanto, não sabemos de que forma este mecanismo seria acionado e executado. Para tanto investigamos a expressão de GAD, tendo em vista alguns trabalhos que discute uma possível relação entre a modulação gabaérgico interferindo na atividade dos neurônios do NDR, uma vez que há neurônios serotoninérgicos que expressa GAD (FU et al . 2010). O sistema gabaérgico tem sido relatado como um importante substrato neuronal de inibição da atividade de neurônios serotoninérgicos no NDR (WANG et al, 1992.; VARGA et al., 2001). Em contrapartida neste trabalho não foi evidenciado qualquer alterações da expressão relativa do RNAm para GAD entre os grupos ou entre a depleção e condição basal. Tendo em vista as perguntas levantadas neste trabalho acreditamos que este estudo será um marco importante para o entendimento não só da regulação da homeostase hidroeletrolítica, mas também para evidências futuras sobre os mecanismos de retroalimentação do sistema serotoninérgico. Após a descoberta de TPH-2 nosso conhecimento sobre a bioquímica da enzima, a distribuição do tecido, mecanismos que regulam a sua expressão e atividade, e o seu envolvimento potencial em doenças neuropsiquiátricas é substancialmente aumentada. O entendimento desses mecanismos poderá ser um divisor de águas na fisiologia moderna da neuroquímica do sistema serotoninérgico. Experimentos adicionais são extremamente necessários para fundamentar melhor as discussões a cerca deste achado aparentemente paradoxal, ou seja, a principal proteína

responsável pela síntese de serotonina pode ser negativamente modulada pelo aumento da sua liberação evidenciada pela atividade neuronal.

#### **6.6-Avaliação das respostas comportamentais em ratas OVX e OVX-E2 tratadas cronicamente com 8-OH-DPAT no teste de labirinto em cruz elevado e campo aberto.**

A maioria dos estudos da literatura tem descrito que o E2 promove respostas ansiolíticas em roedores. Além disso, nas mulheres, a redução dos níveis de E2 durante o período da menopausa tem sido associada a distúrbios afetivos. No entanto, altos níveis de E2 em mulheres durante a fase pré-ovulatória e a terapia de reposição hormonal podem provocar ansiedade (ARPELS, 1996). Com isso, no teste de LCE realizado neste trabalho observamos uma resposta ansiogênica similar nos animais tratados com E2 através da diminuição do tempo e número de entradas no braço aberto e da menor porcentagem da relação entre o número de entradas no braço aberto/braço fechado. Ainda neste contexto, evidenciamos uma diminuição do número de HD no braço aberto no grupo OVX-E2, que apesar de se tratar de um comportamento complementar, reforça essa resposta ansiogênica. Na literatura há evidências que reportam efeito dual do E2 em comportamentos ansiolíticos e ansiogênicos (KOSS et al. 2004; HIROI & NEUMAIER, 2006). Estes resultados reforçam a discussão dos mecanismos diferentes recrutados pelo E2 endógeno e pelo tratamento agudo, subcrônico e crônico com E2 exógeno.

Frente a isso, estudo tem sido realizado para explicar a neurobiologia dicotômica do E2 no comportamento de ansiedade. Para tanto, esses efeitos estão relacionados ao mecanismo de ação do E2 em receptores específicos. Estudos farmacológicos utilizando agonista de receptor ER $\alpha$  e ER $\beta$ , demonstraram que o ER $\beta$  especificamente é responsável pela resposta ansiolítica e que o ER $\alpha$  estaria envolvido na resposta ansiogênica (LUND et al. 2005). É importante ressaltar que E2 apresenta afinidade semelhante para ambos os receptores (KUIPER et al. 1997). Dessa forma, tanto a dose utilizada no presente trabalho quanto o tempo de administração, possivelmente pode ter alterado a resposta fisiológica mediada pelo receptor ER $\beta$  neste período de avaliação dos parâmetros comportamentais. Associado a isso, outros parâmetros como a diminuição da expressão de TPH2 e aumento dos níveis plasmáticos de CORT parecem reforçar essa hipótese da menor responsividade ao ER $\beta$ . Visto que a sinalização mediada por ER $\beta$  aumenta a expressão de TPH2 (DONNER & HANDA, 2009) e diminui os níveis plasmáticos de CORT em resposta ao estresse (LUND et al. 2006; WEISER et al. 2009b). Além dessa abordagem farmacológica, estudos usando animais geneticamente alterados para o receptor ER $\beta$  (knockout  $\beta$ ERKO) evidenciaram uma importância fundamental deste na resposta ansiolítica, mediada principalmente pelo NPV modulando a atividade do eixo HHA (OYOLO et al. 2012). Essa resposta ansiogênica do tratamento com E2 evidenciada no teste LEC não foi acompanhada por alterações na resposta de ansiedade (menor tempo de grooming) dos animais no campo aberto. Tal efeito pode ser justificado pela menor sensibilidade do campo aberto ao comportamento de ansiedade.

A utilização de antidepressivo a base de inibidor seletivo da recaptação de serotonina (citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina) em mulheres durante a menopausa parece comprometer a eficácia do tratamento devido à deficiência de E2 (PINTO-MEZA et al. 2006). Dessa forma, estudos em ratas OVX demonstram que o grupo OVX-E2 associado ao tratamento com fluoxetina aumenta o número de entradas e o tempo no braço aberto associado a um aumento da expressão do mRNA do transportador da serotonina (SERT) e TPH2 na rafe dorsal (CHAROENPHANDHU et al. 2011). Nossos resultados reportaram que a associação do tratamento crônico com agonista de receptor de 5-HT $1A$  e a reposição com E2 revertem o efeito ansiogênico mediado pelo E2. No estudo anterior, que discute um

efeito ansiolítico específico do E2, a dose utilizada foi de 10 µg/Kg e nós utilizamos uma dose de aproximadamente 80 µg/Kg, o que poderia justificar em parte esse resultado paradoxal.

Alterações na neurotransmissão serotoninérgica têm sido implicadas como um mecanismo central nos transtornos de ansiedade (RESSLER & NEMEROFF, 2000). Neste contexto, o E2 modula a atividade serotoninérgica através da regulação da síntese e degradação da serotonina e expressão de receptores pré e pós-sinápticos de serotonina. Essa resposta parece ser mediada por receptores ER  $\beta$  (OSTERLUND, 2010). Como evidenciamos uma redução da expressão do RNAm de 5-HT1A no NDR em animais OVX-E2-8-OH-DPAT, tal resposta em parte pode estar refletindo na reversão do efeito ansiogênico observada no grupo OVX-E2. Em contrapartida, só o tratamento com E2 em ratas OVX aumenta 5-HT1A e diminui TPH2 o que poderia justificar essa resposta ansiogênica. A dessensibilização de receptores 5-HT1A pode estar envolvida no efeito terapêutico em longo prazo de medicamentos ansiolíticos e antidepressivo.

Têm sido propostos que vias distintas de neurônios serotoninérgicos modulam diferentes tipos de ansiedade (DEAKIN & GRAEFF, 1991). Ativação do NDR através de projeções serotoninérgicas para a amígdala e o córtex frontal parece modular comportamentos de ansiedade (ZANGROSSI et al. 2001). Disfunção destas vias tem sido sugerida na etiologia de transtorno de ansiedade generalizada e desordem de pânico em seres humanos. Essa proposta sugere que 5-HT facilita a ansiedade por vias serotoninérgicas do NDR através de estímulos condicionados na amígdala, e inibição do pânico por vias serotoninérgicas inibitórias do NDR na substância cinzenta periaquedutal (SCP) (GRAEFF, 2004). Dessa forma, a resposta ansiogênica da sinalização de 5-HT seria mediada pela amígdala e a ansiolítica pela SCP.

O papel da modulação serotoninérgica do NDR na SCP foi evidenciada através da estimulação elétrica no NDR, que projeta fibras 5-HT para a SCP, diminuindo o comportamento de medo (KISER et al. 1980). Dessa forma, o envolvimento dos subtipos de receptores 5-HT localizados no SCP tem sido explorado para entender a sinalização serotoninérgica que estaria envolvida na modulação das respostas ansiolíticas. Com isso, estudos demonstraram que a microinjeção de agonista de receptor 5-HT1A e 5-HT2A na SCP dorsal promoveu inibição da aversividade de uma maneira dose-dependente (NOGUEIRA & GRAEFF, 1995). Neste sentido, o efeito do tratamento crônico com 8-OH-DPAT no grupo OVX-E2 parece ter envolvida essa sinalização serotoninérgica a partir do NDR, que promoveu uma diminuição da aversão ao braço aberto. Analisando esta questão da aversão ao braço aberto, percebemos que dois tipos de ameaças e estratégias de defesa ocorrem quando o rato está explorando o labirinto em cruz elevado, ou seja, há um predomínio da aversão ao braço aberto, visto que nesta situação o animal é exposto a um estímulo de medo inato e realiza um caminho de fuga, buscando a segurança dentro de um dos braços fechados.

Apesar de ser bem descrito o papel dos neurônios gabaérgico em modular as respostas de praticamente todos neurotransmissores centrais, neste modelo não observamos alterações da expressão relativa de GAD, ou seja, parece que tal resposta não foi mediada por este parâmetro molecular que altera o sistema gabaérgico.

São necessários mais estudos que investiguem os efeitos do estresse sobre expressão de TPH2 em subpopulações topograficamente organizadas de neurônios serotoninérgicos, para entender os mecanismos fisiológicos das vias neurais envolvidas nessa resposta. Perante este cenário, a hipótese do duplo efeito do sistema serotoninérgico do NDR na facilitação das estratégias de defesa, que são principalmente integradas na amígdala, possivelmente não esteve envolvida na reversão da resposta ansiogênica observada pelo tratamento com E2. Ao mesmo tempo, as reações de defesa organizada no SCP dorsal parecem ter sido inibidas pela atividade serotoninérgica do NDR.

## 7-CONCLUSÕES

A influência da terapia estrogênica no equilíbrio hidroeletrolítico, resposta neuroendócrina e avaliação de comportamento de ansiedade e locomoção em ratas ovariectomizadas parecem envolver a sinalização serotoninérgica. Tal abordagem pode ser evidenciada pelos seguintes resultados:

- Os dados obtidos sugerem que a terapia estrogênica influencia a sinalização serotoninérgica, atenuando o comportamento de ingestão de sódio, água, excreção renal de sódio, ingestão alimentar que influenciou a perda de peso.
- Essa influencia parece depender de alterações hidroeletrolíticas ao nível de diminuição da excreção renal de sódio, que consequentemente altera o volume urinário. Essa resposta de diminuição da excreção renal mediada pelo E2 e sistema serotoninérgico é responsável pela atenuação da perda de sódio e água principalmente quando os animais são submetidos a desafio experimental de depleção de sódio.
- A resposta neuroendócrina observada neste estudo pode ser mediada tanto pelo tratamento com E2 quanto pelo receptor 5-HT1A e ainda pela associação dos mesmos. A produção de ANGI e ANGII parece envolver mecanismo diferente que depende da condição do animal, ou seja, o tratamento com 8-OH-DPAT associado ao E2 em condição basal aumenta a concentração plasmática de ANGI e o E2 parece atenuar a ativação do SRA em condição de depleção de sódio. A liberação de OT e CORT em condição basal parece ser potencializada pela associação dos dois tratamentos, e o E2 em condição de depleção parece aumentar a liberação de ambos, já em relação ao CORT este aumento atenuaria a condição da perda de sódio e água, pois o padrão de liberação é o mesmo pra ambas as situações. Em relação à AVP e ANP o tratamento com 8-OH-DPAT parece ser crítico para potencializar a liberação de ambos em condição de depleção.
- A modulação central do sistema serotoninérgico (NDR) parece recrutar mecanismos moleculares diferentes com relação à condição do animal. Em condição basal, observamos uma diminuição de da expressão relativa do receptor 5-HT1A mediada predominantemente pelo tratamento crônico com 8-OH-DPAT. Com relação à diminuição de TPH2 essa mediação foi evidenciada no tratamento com E2. Este achado paradoxal sugere um possível mecanismo de retroalimentação neste sistema monoaminérgico. Já em condição de depleção o E2 parece mediar um possível aumento da atividade serotoninérgica pela diminuição da expressão de 5-HT1A e oposto no grupo OVX-E2-8-OH-DPAT.
- A reposição com E2 neste modelo apresentou efeitos ansiogênico-símiles que foram em parte revertidos pela associação com o tratamento crônico com 8-OH-DPAT. Tal resposta parece ser revertida pela diminuição da expressão de 5-HT1A no NDR, que tem sido utilizado como um possível marcador de aumento da atividade de neurônios serotoninérgicos. Esse aumento possivelmente deve ter envolvido sinalização serotoninérgica na SCP. Apesar da síntese e expressão do RNAm de TPH2 estarem baixos, possivelmente a resposta do E2 neste parâmetro pode está atrelada uma possível diminuição da sensibilidade do receptor ER $\beta$ .

As respostas neuroendócrinas e respostas hidroeletrolíticas podem ser alteradas em condições de desafios homeostáticos e tanto a sinalização serotoninérgica quanto a estrogênica pode ser considerada sistemas controladores da homeostase hidroeletrolítica. A modulação central do sistema serotoninérgico (NDR) parece recrutar mecanismos

moleculares diferentes com relação à condição do animal. O possível aumento da atividade/sinalização 5-HT pode mediar alterações de contrarregulação ao nível da sua própria síntese. Considerando que o sistema serotoninérgico e a sinalização estrogênica estão estreitamente implicados com o controle da conduta afetiva e possivelmente com a regulação hedônica de comportamentos homeostáticos. Este estudo poderá influenciar pesquisas futuras com o propósito de buscar soluções psicofarmacológicas, cardiovasculares e metabólicas para aplicação aos animais (especialmente os pequenos animais de companhia) e seres humanos objetivando reduzir efeitos colaterais da associação desses fármacos.

## 8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J. K.; JOHNNSO, P. L.; HOLLIS, J. H.; LOWRY, C. A. *Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus*. Ann New York Acad Sci 1018: 46-57, 2004.

AGHAJANIAN, G. K.; SPROUSE, J. S.; RASMUSSEN, K. *Physiology of the midbrain serotonin system*. In: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, New York, Raven Press, p. 141-149, 1987.

ALBERT, P. R.; ZHOU, Q. Y.; VANTOLI, H. H. M., BUNZOW, J. R.; CIVELLI, O. *Cloning, functional expressicon, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine1A receptor gene*. J. Biol. Chem. 265:5825–5832, 1990.

ALBERT, P. R.; LEMBO, P.; STORRING, J. M.; CHAREST, A.; SAUCIER, C. *The 5-HT1A receptor: signaling, desensitization, and gene transcription*. Neuropsychopharmacology, 1:19-25, 1996.

AMICO, J. A.; MORRIS, M.; VOLLMER, R. R. *Mice deficient in oxytocin manifest increased saline consumption following overnight fluid deprivation*. Am. J. Physiol., 281:1368-73, 2001.

ANDERNSO, I. K.; MARTIN, G. R.; RAMAGE, A. G. *Central administration of 5-HT activates 5-HT1A receptors to cause sympathoexcitation and 5-HT2/5HT1C receptors to release vasopressin in anaesthetized rats*. Br J Pharmacol, 107: 1020–1028. 1992.

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

ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L. K.; VALENÇA, M, M.; McCANN, S. M. *Neuroendocrine control of body fluid metabolism*. Physiol. Rev. 84: 169-208, 2004.

ARARAGI, N & LESCH, K. P. *Serotonin (5-HT) in the regulation of depression-related emotionality: insight from 5-HT transporter and tryptophan hydroxylase-2 knockout mouse models*. Curr Drug Targets. 5:549-70, 2013.

ARGYROPOULOS, S.V.; SANDFORD, J. J.; NUTT, D. J. *The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: pharmacological treatments of anxiety*. Pharmacol Ther, 88:213–227. 2000.

ARPELS, J. C. *The female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data*. J Reprod Med 41:633–639, 1996.

ARTIGAS, F.; ROMERO, L.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P. *Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists*. Trends Neurosci 19:378–383, 1996.

ASHER, J.; MICHPOPOULOS, V.; REDING, K. M.; WILNSO, M. E.; TOUFEXIS, D. *Social stress and the polymorphic region of the serotonin reuptake transporter gene modify*

*oestradiol-induced changes on central monoamine concentrations in female rhesus monkeys.* J Neuroendocrinol, 25:321-328. 2013

ASSIÉ, M. B.; LOMENECH, H.; RAVAILHE V.; FAUCILLON, V.; NEWMAN-TANCREDI A. *Rapid desensitization of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors by chronic administration of the high-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> agonist, F13714: a microdialysis study in the rat.* Brit J Pharmacol 149: 170-178, 2006.

AZMITIA, E. C.; GANNON, P. J.; KHECK, N. M. Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. Neuropsychopharmacology 14: 35–46, 1996.

ATKINNSO, H. C & WADDELL, B. J. *Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle.* Endocrinol, 138:3842-3848, 1997.

AZMITIA, E.C. *The CNS serotonergic system: Progression toward a collaborative organization.* In: Psychopharmacology: The Third Generation of Progress, New York, Raven Press, p. 61-73, 1987.

AZMITIA, E. C. & SEGAL, M. *An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat.* Journal of Comparative Neurology, 179: 641-668.1978.

BACH-MIZRACHI, H.; UNDERWOOD, M. D.; KASSIR, S.A.; BAKALIAN, M.J.; SIBILLE, E.; TAMIR, H.; MANN, J. J.; ARANGO, V. *Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide.* Neuropsychopharmacology, 31:814-24, 2006.

BACK H, FORSSMANN WG, STUMPF WE. *Atrial myoendocrine cells (cardiodilatin atrial natriuretic polypeptide-containing myocardiocytes) are target cells for estradiol.* Cell Tissue Res, 255: 673–674. 1989,

BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; VENTURA, R. R.; SILVA L. F. S.; OLIVARES, E. L.; REIS, L. C. *Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite of euthyroid and hypothyroid rats.* Exp Physiol, 88: 251-260, 2003.

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

BAKER, K.G.,et al. *Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus.* J. Comp. Neurol. 301: 147–161, 1990.

BAUDRIE, V.; OLIVER, C.; CHAOULOFF, F. *Corticosterone response to the serotonergic agonist D-fenfluramine may be independent from corticotropin-releasing factor (CRH).* Neurosci Lett. 156:121-4, 1993.

BELO, N. O.; SAIRAM, M. R.; DOS REIS, A. M. *Impairment of the natriuretic peptide system in follitropin receptor knockout mice and reversal by estradiol: implications for obesity-associated hypertension in menopause.* Endocrinol, 149:1399-1406, 2008.

BETHEA, L. C.; MIRKES, J. S.; SHIVELY, A. C.; ADAMS, R. M. *Steroid Regulation of Tryptophan Hydroxylase Protein in the Dorsal Raphe of Macaques.* BIOL PSYCHIATRY 47:562–576, 2000.

BISSET, G. W. & CHOWDREY, H. S. *Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes.* Q J Exp Physiol. 73:811-72. 1988.

BLIER, P.; PIÑEYRO, G.; EL MANSARI, M.; BERGERON, R.; DE MONTIGNY, C. *Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission.* Annals New York Academy of Sciences, 861: 204–216, 1998.

BOSLEY & DESCARRIES, J. *Monoamine innervation of the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT): a high resolution radioautographic study in the rat.* Comp Neurol, 272:545-561, 1988.

BOUALI, S.; EVRARD, A.; CHASTANET, M.; LESCH, K. P.; HAMON, M.; ADRIEN, J. *Sex hormone-dependent desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in knockout mice deficient in the 5-HT transporter.* Eur J Neurosci, 18: 2203-2212, 2003.

BOUALI, S.; EVRARD, A.; CHASTANET, M.; LESCH, K-P.; HAMON, M.; ADRIEN, J. *Sex hormone-dependent desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autorreceptors in knockout mice deficient in the 5-HT transporter.* European Journal of Neuroscience, 18: 2203-2212, 2003.

BOHLER, H. C. JR.; ZOELLER, R. T.; KING, J. C.; RUBIN, B. S.; WEBER, R.; MERRIAM, G.; R. *Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat.* Brain Res Mol Brain Res, 8:259-262, 1990.

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

BROSNIHAN, K. B.; WEDDLE, D.; ANTHONY, M. S.; HEISE, C.; LI, P.; FERRARIO, C. M. *Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys.* J Hypertens 15:719–726, 1997.

BRUNTON, P. J. & RUSSELL, J. A. *Endocrine induced changes in brain function during pregnancy.* Brain Res, 10:198-215. 2010

BUONINCONTI, R. *The juxtaglomerular apparatus: physiopathology and clinical aspects of renin-angiotensin system,* Recent Prog Med, 41:81-165, 1966.

BURNET, P. W. J.; EASTWOOD, S. L.; LACEY, K. *The distribution of 5HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain.* Brain Res, 676: 157–168, 1995.

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

BUTERA, P. C. *Estradiol and the control of food intake.* Physiol Behav, 99: 175-180, 2010.

CALOGERO, A. E.; BAGDY, G.; MONCADA, M. L.; D'AGATA, R. *Effect of selective serotonin agonists on basal, corticotrophin-releasing hormone- and vasopressin-induced ACTH release in vitro from rat pituitary cells.* J Endocrinol, 136:381-7. 1993.

CAMARGO, G. M. A.; CAMARGO, L. A. A.; SAAD, W. A. *On a possible dual role for the lateral septal area 5-HT(1A) receptor system in the regulation of water intake and urinary excretion.* Behav Brain Res. 215:122-82, 2010.

CAREY, M. P.; DETERD, C. H.; DE KONING, J.; HELMERHORST, F.; DE KLOET, E. R. *The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat.* Endocrinol, 144:311-321, 1995.

CARLBERG, K. A.; FREGLY, M. J.; FAHEY, M. *Effects of chronic estrogen treatment on water exchange in rats.* Am J Physiol., 247: 101-110, 1984.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. *Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice.* Behavioral Brain Research, 134: 49-57, 2002.

CAVALCANTE-LIMA, H. R.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; DE-LUCCA, J. R. W.; LIMA, H. R. C.; COSTA-e-SOUSA, R. H.; OLIVARES, E. L.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; REIS, R. O .; MEDEIROS, M. A.; CÔRTEZ, W. S.; REIS, L. C. *Chronic excitotoxic lesion of dorsal raphe nucleus induces sodium appetite.* Braz J Med Biol Res, 38: 1669-1675. 2005<sup>a</sup>.

CAVALCANTE-LIMA, H. R.; LIMA, H. R. C.; COSTA-e-SOUSA, R. H.; OLIVARES, E. L.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; REIS, R. O.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; DE-LUCCA, J. R. W.; MEDEIROS, M. A.; CÔRTEZ, W. S.; REIS, L. C. *Dipsogenic stimulation in ibotenic NDR-lesioned rats induces concomitant sodium appetite.* Neurosci Lett, 374: 5-10, 2005b.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; DE SOUZA, E. B. *Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRH2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRH1 receptor mRNA expression.* J Neurosci. 10:6340-6350, 1995.

CHAMIENIA, A. L. & JOHNS, E. J. *The renal functional responses to 5-HT1A receptor agonist, flesinoxan, in anaesthetized, normotensive rat.* Br J Pharmacol. 112:214-218, 1994.

CHATAIGNEAU, T & SCHINI-KERTH, V. B. *Vascular effects of ovariectomy and chronic oestrogen treatment in rats: controversy or experimental protocol diversity?* Brit J Pharmacol. 144:161–163, 2005.

CHAROENPHANDHU, J.; TEERAPORNPUNTAKIT, J.; NUNTAPORNSAK, A.; KRISHNAMRA, N.; CHAROENPHANDHU N. *Anxiety-like behaviors and expression of SERT and TPH in the dorsal raphe of estrogen- and fluoxetine-treated ovariectomized rats.* Pharmacol Biochem Behav. 98:503-510. 2011.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. *A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 25: 235-260, 2001.

CLARK, J. A.; ALVES, S.; GUNDLAH, C.; ROCHA, B.; BIRZIN, E. T.; CAI, S. J.; FLICK, R.; HAYES, E.; HO, K.; WARRIER, S.; PAI, L.; YUDKOVITZ, J.; FLEISCHER, R.; COLWELL, L.; LI, S.; WILKINNSO, H.; SCHAEFFER, J.; WILKENING, R.; MATTINGLY, E.; HAMMOND, M.; ROHRER, S. P. *Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim tes.* Neuropharmacology. 63:1051-1063, 2012.

CLARK, M. S.; MCDEVITT, R. A.; NEUMAIER, J. F. *Quantitative mapping of tryptophan hydroxylase-2, 5-HT1A, 5-HT1B, and serotonin transporter expression across the anteroposterior axis of the rat dorsal and median raphe nuclei.* J Comp Neurol 498: 611-623, 2006.

CLARK, J. T.; CHAKRABORTY-CHATTERJEE, M.; HAMBLIN, M.; WYSS, J. M.; FENTIE, I. H. *Estrogen depletion differentially affects blood pressure depending on age in Long-Evans rats.* Endocrine 25: 173-186, 2004.

. COLLIN, M.; HÅKANSSO-OVESJÖ, M. L.; MISANE, I.; OGREN, S. O.; MEISTER, B. *Decreased 5-HT transporter mRNA in neurons of the dorsal raphe nucleus and behavioral depression in the obese leptin-deficient ob/ob mouse.* Brain Res Mol Brain Res, 81: 51-61, 2000.

COOPER, S. J.; FRYER, M. J.; NEILL, J. C. *Specific effect of putative 5-HT1A, agonists, 8-OH-DPAT and gepirone, to increase hypertonic saline consumption in the rat. Evidence against a general hyperdipsic action.* Physiol Behav, 43: 533-537, 1988.

COOPER, S. J. & CICCOCIOPPO R. *Effect of selective 5-HT1 agonists in water deprived rats on salt intake in two-choice tests.* Pharmacol Biochem Behav, 45: 513-518, 1993.

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

CURTIS, K. S. *Estrogen and the central control of body fluid balance.* Physiol Behav. 97:180-92, 2009.

DAENDEE, S.; THONGNSOG, B.; KALANDAKANOND-THONGNSOG, S. *Effects of time of estrogen deprivation on anxiety-like behavior and GABAA receptor plasticity in ovariectomized rats.* Behav Brain Res, 246:86-93, 2013.

DAHLSTROM, A. & FUXE, K. *Localization of monoamines in the lower brain stem*, *Experientia* 20: 398–399, 1964.

DALMASSO, C.; AMIGONE, J. L. M.; VIVAS, L. *Serotonergic system involvement in the inhibitory action of estrogen on induced sodium appetite in female rats*. *Physiology & Behavior* 104: 398-407, 2011.

DAY, H. E.; GREENWOOD, B. N.; HAMMACK, S. E.; WATKINS, L. R.; FLESHNER, M.; MAIER, S. F.; CAMPEAU, S. *Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRH-R1, and CRH-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus*. *J Comp Neurol*, 474: 364-378, 2004.

DAVIS, J. O. & FREEMAN, R. H. *Mechanisms regulating renin release*. *Physiol Rev*, 56:1-56. 1976.

DEAKIN, J. F. W. & GRAEFF, F.G. *5-HT and mechanisms of defence*. *Psychopharmacol*, 5: 305-315. 1991.

DEMETRIO, F. N.; RENNÓ, J. JR.; GIANFALDONI, A.; GONÇALVES, M.; HALBE, H. W.; FILHO, A. H.; GORENSTEIN, C. *Effect of estrogen replacement therapy on symptoms of depression and anxiety in non-depressive menopausal women: a randomized double-blind, controlled study*. *Arch Womens Ment Health*, 14:479-86, 2011.

DHILLON, H.; ZIGMAN, J. M.; YE, C.; LEE, C. E.; MCGOVERN, R. A.; TANG, V.; KENNY, C. D.; CHRISTIANSEN, L. M.; WHITE, R. D.; EDELSTEIN, E. A.; COPPARI, R.; BALTHASAR, N.; COWLEY, M. A.; CHUA, JR. S.; ELMQUIST, J. K.; LOWELL, B. B. *Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis*. *Neuron* 49, 191–203, 2006.

DIBONA, G. F. *Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289:633-641. 2005.

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

DUBEY, R. K & JACKSON, E. K. *Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical and molecular mechanisms*. *Am J Physiol Renal Physiol*;280:365–388. 2001

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

EISENFELD, A. J.; ATEN, R.; WEINBERGER, M.; HASELBACHER, G.; HALPERN, K.; KRAKOFF, L. *Estrogen receptor in the mammalian liver*. *Science*, 19:862-865, 1976.

EINSO, A. S.; TEMPLE, D. L. *Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on the mechanism of action*. Am J Med, 80:1–9. 1989.

ESCHER, G. *Hyperaldosteronism in pregnancy*. Ther Adv Cardiovasc Dis. 3:123-132. 2009.

ESTRADA-CAMARENA, E.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; HERNÁNDEZ-ARAGÓN, A.; MEJÍA-MAURIES, S.; PICAZO, O.; *Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants*. J Psychopharmacol. 10:1365-1377, 2011.

FARGIN, A.; RAYMOND, J. R.; LOHSE, M. J.; KOBILKA, B. K.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J.; *The genomic clone G-21 which resembles a  $\beta$ -adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor*. Nature, 335:358–360, 1988.

FERNANDEZ-RUIZ, J. J.; BUKHARI, A. R.; MARTINEZ-ARRIETA, R.; TRESGUERRES, J. A.; RAMOS, J. A. *Effects of estrogens and progesterone on the catecholaminergic activity of the adrenal medulla in female rats*. Life Sci; 42: 1019- 1028, 1988.

FINDLAY, A. L.; FITZSIMONS, J. T.; KUCHARCZYK J. *Dependence of spontaneous and angiotensin-induced drinking in the rat upon the oestrous cycle and ovarian hormones*. J Endocrinol 82: 215-225, 1979.

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

FRANCHINI, L. F. M. & VIVAS, L. *Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis*. Am J Physiol 276: 1180-11187, 1995.

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

FREGLY, M. J. *Effect of an oral contraceptive on NaCl appetite and preference threshold in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1:61–65, 1973.

FREGLY, M. J. & THRASHER, T. N. *Attenuation of angiotensin-induced water intake in estrogen-treated rats*. Pharmacol Biochem Behav 9: 509-514, 1978.

FRIEDMAN, J. M. & HALAAS, J. L. *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature 395, 763–770. 1998.

FRYE, C.A.; SUMIDA, K.; DUDEK, B. C.; HARNEY, J. P.; LYDON, J. P.; O'MALLEY, B. W.; PFAFF, D. W.; RHODES, M. E. *Progesterone's effects to reduce anxiety behavior of aged mice do not require actions via intracellular progestin receptors*. Psychopharmacology, 63:312-322. 2006.

FONSECA, F. V.; MECAWI, A. S.; ARAUJO, I. G.; ALMEIDA-PEREIRA, G.; MAGALHÃES-NUNES, A. P.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; REIS LC. *Role of the 5-HT<sub>1A</sub>*

*somatodendritic autoreceptor in the dorsal raphe nucleus on salt satiety signaling in rats.* Exp. Neurology, 217: 353-360, 2009.

FU, W.; LE MAÎTRE, E.; FABRE, V.; BERNARD, J. F.; DAVID, XU. ZQ.; HÖKFELT, T. *Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain.* J Comp Neurol, 518:3464-3494. 2010.

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

GALLAGHER, P. E.; LI, P.; LENHART, JR.; CHAPPELL, M. C.; BROSNIHAN, K. B. *Estrogen regulation of angiotensin converting enzyme mRNA.* Hypertension 33: 323–328, 1999.

GALEEVA, A. Y.; TUOHIMA, A. P.; SHALYAPINA, V. G. *The role of sex steroids in forming anxiety states in female mice.* Neurosci Behav Physiol., 3:415-420. 2003

GARTSIDE, S. E.; UMBERS, V.; HAJOS, M.; SHARP, T. *Interaction between a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist and na SSRI in vivo: Effects on 5-HT cell firing and extracellular 5-HT.* Br J Pharmacol, 115:1064–1070, 1995.

GEARY, N.; ASARIAN, L.; KORACH, K.S.; PFAFF, D. W.; OGAWA. S. *Deficits in E2dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice.* Endocrinology, 142: 4751–4757, 2001.

GEARY, N. *Estradiol, CCK and satiation.* Peptides, 22: 1251–1263, 2001.

GERRITS, M.; GROOTKARIJN, A.; BEKKERING, B. F.; BRUINSMA, M.; DEN BOER, J. A.; TER HORST, G. J. *Cyclic estradiol replacement attenuates stress-induced c-Fos expression in the NPV of ovariectomized rats.* Brain Res Bull. 67:147-155, 2005.

GODINO, A.; GIUSTI-PAIVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. *Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats.* Neuroscience 133: 493-505, 2005.

GODINO, A.; DE LUCA, L. A. Jr.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS L. *Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers?* Am J Physiol 293: 1027-1036, 2007.

GONÇALVES, I.; SALDANHA, C.; MARTINS E SILVA, J. *Beta-estradiol effect on erythrocyte aggregation--a controlled in vitro study.* Clin Hemorheol Microcirc, 25:127-134. 2001.

GRAEFF, F. G. *Serotonin, the periaqueductal gray and panic.* Neurosci Biobehav Rev, 28: 239-259. 2004.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G.; DEAKIN, J. F.; *Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression.* Pharmacol Biochem Behav, 54:129-141, 1996.

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

GRIEBEL, G. *5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research.* *Pharmacol Ther*, 65:319-395, 1995.

GRIGNASCHI, G.; INVERNIZZI, R. W.; FANELLI, E.; FRACASSO, C.; CACCIA, S.; SAMANIN, R. *Citalopram-induced hypophagia is enhanced by blockade of 5-HT<sub>1A</sub> receptors: Role of 5-HT<sub>2C</sub> receptors.* *Br J Pharmacol*, 124:1781–1787, 1998.

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

GUNDLAH, C.; ALVES, E. S.; CLARK, A. J.; PAI, L-Y.; SCHAEFFER, M. J.; ROHRER, P. S. *Estrogen Receptor- $\beta$  Regulates Tryptophan Hydroxylase-1 Expression in the Murine Midbrain Raphe.* *Biol. Psychiatry*, 57: 938–942, 2005.

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

HAMON, M.; BOURGOIN, S.; EL MESTIKAWY, S.; GOETZ, C. *Central serotonin receptors.* Oxford: Blackwell science. 107-143. 1982.

HANDLEY, S. L. & MITHANI, S. *Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.* *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 327:1-5, 1984.

HARIKUMAR, K. G.; JOHN, P. T.; CHATTOPADHYAY, A. *Role of disulfides and sulfhydryl groups in agonist and antagonist binding in serotonin<sub>1A</sub> receptors from bovine hippocampus.* *Cell Mol Neurobiol*, 2: 665-681, 2000.

HARIKUMAR, K. G. & CHATTOPADHYAY, A. *Modulation of agonist and antagonist interactions in serotonin <sub>1A</sub> receptors by alcohols.* *FEBS Lett*, 438: 96-100, 1998.

HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; KOYAMA, T. *Effects of the coadministration of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists with na SSRI in conditioned fear stress- induced freezing behavior.* *Pharmacol Biochem Behav*, 58:471–475, 1997.

HASEGAWA, H.; KOJIMA, M.; OGURO, K.; NAKANISHI, N. *Rapid turnover of tryptophan hydroxylase in serotonin producing cells: demonstration of ATP-dependent proteolytic degradation.* *FEBS Lett*, 368:151-154. 1995

HARVEY, P. J.; WING, L. M.; SAVAG, E. J.; MOLLOY, D. *The effects of different types and doses of oestrogen replacement therapy on clinic and ambulatory blood pressure*

and the renin-angiotensin system in normotensive postmenopausal women. *J Hypertens* 17:405–411, 1999.

HENSLER J. G. *Regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in brain following agonist or antidepressant administration.* *Life Science*, v.72, p.1665-1682, 2003.

HERITAGE, A. S.; STUMPF, W. E.; SAR, M.; GRANT, L. D. *Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones.* *Science*, 207:1377–1379, 1980.

HETEM, L. A.; DE SOUZA, C. J.; GUIMARÃES, E. S.; ZUARDI, A. W.; GRAEFF, F. G. *Effect of d-fenfluramine on human experimental anxiety.* *Psychopharmacology*. 127:276-282, 1996.

HEESCH, C. M. & ROGERS, R. C. *Effects of pregnancy and progesterone metabolites on regulation of sympathetic outflow.* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 136-142, 1995.

HINOJOSA-LABORDE, C.; LANGE, D. L.; HAYWOOD, J. R. *Role of female sex hormones in the development and reversal of dahl hypertension.* *Hypertension*, 35: 484-489, 2000.

HINOJOSA-LABORDE, C.; CRAIG, T.; ZHENG, W.; JI, H.; HAYWOOD, JR.; BERG, K. *Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats.* *Hypertension*, 44: 405-409, 2004.

HIROI, R.; MCDEVITT, R. A.; NEUMAIER, J. F. *Estrogen Selectively Increases Tryptophan Hydroxylase-2 mRNA Expression in Distinct Subregions of Rat Midbrain Raphe Nucleus: Association between Gene Expression and Anxiety Behavior in the Open Field.* *Biol Psychiatry* 2006.

HIROI, R. & NEUMAIER, J. F. *Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle.* *Behav Brain Res*, 166: 93-100. 2006.

HIROI, R. & NEUMAIER, J. F. *Estrogen decreases 5-HT<sub>1b</sub> autoreceptor mrna in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field.* *Neuroscience*, 158: 456–464, 2009.

HJORTH, S.; BENGTSSON, H. J.; KULLBERG, A.; CARLZON, D.; PEILOT, H.; AUERBACH S. B. *Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action.* *Journal of Psychopharmacology*, 4: 177-182, 2000.

HRABOVSKY, E.; KALLO, I.; STEINHAUSER, A.; MERCHENTHALER, I.; COEN, C. W.; PETERSEN, S. L. et al. *Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies.* *J Comp Neurol* 2004; 473: 315-333, 2012.

ISGOR, C.; CECCHI, M.; KABBAJ, M.; AKIL, H.; WATNSO, S. J. *Estrogen receptor beta in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone*. Neuroscience, 121:837-845, 2003.

JACOBS, B. L. & AZMITIA, E. C. *Structure and function of the brain serotonin system*. Physiol Rev, 72:165-229, 1992.

JONKLAAS, J. & BUGGY J. *Angiotensin-estrogen interaction in female brain reduces drinking and pressor responses*. Am J Physiol 247: 167-172, 1984.

JONKLAAS, J. & BUGGY, J. *Angiotensin-estrogen central interaction: localization and mechanism*. Brain Res 326: 239-249, 1985.

JØRGENSEN, H.; KJAER, A.; KNIGGE, U.; MØLLER, M.; WARBERG, J. *Serotonin stimulates hypothalamic mRNA expression and local release of neurohypophysial peptides*. J Neuroendocrinol, 15:564-571. 2003

LARSEN, P. J.; HAY-SCHMID, T. A.; VRANG, N.; MIKKELSEN, J. D. *Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study*. Neuroscience 70:963–988 1996.

LAURELL, C. B. & RANNEVIK, G. J. *A comparison of plasma protein changes induced by danazol, pregnancy, and estrogens*. Clin Endocrinol Metab. 5:719-725, 1979.

LIMA, H. R. C.; CAVALCANTE-LIMA, H. R.; CEDRAZ-MERCERZ, P. L.; COSTA-E-SOUSA, R. H.; OLIVARES, E. L.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; MEDEIROS, M. A.; CÔRTEZ, W. S.; REIS, L. C. *Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation*. An Acad Bras Cienc 76: 85-92. 2004.

LIND, R. W. *Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system*. Brain Res, 384:250-261, 1986.

LU, N. Z. & BETHEA, C. L. *Ovarian steroid regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding and G protein activation in female monkeys*. Neuropsychopharmacology 27: 12-24, 2002.

LUND, T. D.; ROVIS, T.; CHUNG, W. C.; HANDA, R. J. *Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors*. Endocrinology 146:797-807, 2005.

KALIPATNAPU, S.; PUCADYIL, T. J.; HARIKUMAR, K. G.; CHATTOPADHYAY, A. *Ligand binding characteristics of the human serotonin<sub>1A</sub> receptor heterologously expressed in CHO cells*. Biosci Rep, 24:101-115, 2004.

KASTENBERGER, I.; LUTSCH, C.; SCHWARZER, C. *Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces anxiogenic effects in mice, similar to oestradiol*. Psychopharmacology 221:527-535, 2012.

KENSICKI, E.; DUNPHY, G.; ELY, D. *Estradiol increases salt intake in female normotensive and hypertensive rats*. J. appl. Physiol. 93:476-483, 2002.

KIA, H. K.; BRISORGUEIL, M. J. HAMON, M. *Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors in rat brain.* J. Neurosci. Res. 46: 697–708. 1996.

KISLEY, L. R.; SAKAI, R. R.; FLUHARTY, S. J. *Estrogen decreases hypothalamic angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor binding and mRNA in the female rat.* Brain Res. 844: 34-42, 1999.

KISER, R. S.; BROWN, C. A.; SANGHERA, M. K.; GERMAN, D. C. *Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior.* Brain Res, 191:265–72. 1980.

KITAY, J. I. *Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat.* Endocrinol, 68:818–824, 1961.

KLUSSMANN, E.; MARIC, K.; ROSENTHAL, W. *The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct.* Rev Physiol Biochem Pharmacol, 141:33-95, 2000.

KOBILKA, B. K.; FRIELLE, T.; COLLINS, S.; YANG-FENG, T.; KOBILKA, T. S.; FRANCKE, U.; LEFKOWITZ, R. J.; CARON, M. G. *An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins.* Nature, 329:75–79. 1987.

KORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M.; WINGFIELD, J. C.; MCEWEN, B. S. *The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease.* Neurosci Biobehav Rev, 29:3–38. 2005.

KOSS, W. A.; GEHLERT, D. R.; SHEKHAR, A. *Different effects of subchronic doses of 17-beta estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats.* Horm Behav, 46:158–164. 2004

KRAUSE, E. G.; CURTIS, K. S.; DAVIS, L. M.; STOWE, JR.; CONTRERAS, R. J. *Estrogen influences stimulated water intake by ovariectomized female rats.* Physiol Behav, 79: 267-274, 2003.

KUROS, K. I.; DE BOLD, M. L. *Estrogen, natriuretic peptides and the renin-angiotensin system.* Cardiovasc Res, 41:524–53, 1999.

KUIPER, G. G.; CARLSNSO, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSNSO, S.; GUSTAFSNSO, J. A. *CompariNSO of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.* Endocrinology, 138:863–870. 1997.

LEMO, J. C.; ROTH, C. A.; MESSINGER, D. I.; GILL, H. K.; PHILLIPS, P. E.; CHAVKIN, C. *Repeated stress dysregulates  $\kappa$ -opioid receptor signaling in the dorsal raphe through a p38 $\alpha$  MAPK-dependent mechanism.* J Neurosci. 36:1225-1236, 2012.

LUND, T.; ROVIS, T.; CHUNG, W.; HANDA, R. *Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors.* Endocrinology, 146:797–807. 2005.

LUND, T. D.; HINDS, L. R.; HANDA, R. J. *The androgen 5alpha-dihydrotestosterone and its metabolite 5alphaandrostan- 3beta, 17beta-diol inhibit the hypothalamo-pituitary-adrenal response to stress by acting through estrogen receptor beta-expressing neurons in the hypothalamus.* J Neurosci, 26:1448–1456. 2006.

MAACK, T. Role of atrial natriuretic factor in volume control. Kidney Int, 49: 1732–1737. 1996.

MAGALHÃES-NUNES, A. P.; BADAUÊ-PASSOS, Jr. D.; VENTURA, R. R.; GUEDES, Jr. D. S.; ARAÚJO, J. P.; GRANADEIRO, P. C.; MILANEZ-BARBOSA, H. K.; COSTA-e-SOUSA, R. H.; MEDEIROS, M. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; REIS, L. C. *Sertraline, a selective serotoninreuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats.* Exp Physiol, 92: 913-922, 2007.

MARGATHO, L. O.; GIUSTI-PAIVA, A.; MENANI, J. V.; ELIAS, L. L.; VIVAS, L. M.; ANTUNESRODRIGUES, J. *Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus in renal and hormonal responses to isotonic blood volume expansion.* Am J Physiol, 297: 1190-1197. 2007.

MARGATHO, L. O.; GODINO, A.; OLIVEIRA, F. R.; VIVAS, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. *Lateral parabrachial afferent areas and serotonin mechanisms activated by volume expansion.* Journal of Neuroscience Research, 86:3613–3621, 2008.

MATTHES, S.; MOSIENKO, V.; BASHAMMAKH, S.; ALENINA, N.; BADER, M. *Tryptophan hydroxylase as novel target for the treatment of depressive disorders.* Pharmacology, 85:95-109, 2010.

MCQUEEN, J. K.; WILNSO, H.; FINK, G. *Estradiol-17b increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain.* Brain Res Mol Brain Res, 45:13–23, 1997.

MECAWI, A.S.; VILHENA-FRANCO, T.; ARAUJO, I.G.; REIS, L.C.; ELIAS, L.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. *Estradiol potentiates hypothalamic vasopressin and oxytocin neuron activation and hormonal secretion induced by hypovolemic shock.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 301: R905-15, 2011.

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

**MECAWI A. S.; LEPLETIER, A.; ARAUJO, I. G.; OLIVARES E. L.; REIS L. C.** *Assessment of brain AT1-receptor on the nocturnal basal and angiotensin-induced thirst and sodium appetite in ovariectomised rats.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 8: 169-175, 2007.

MEDEIROS, M. A.; REIS, L. C.; MELLO, L. E. *Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethaNSOe, diazepam and imipramine.* Neuropsychopharmacology 30: 1246-1256, 2005.

MIKKELSEN, J. D.; JENSEN, J. B.; ENGELBRECHT, T.; MORK, A. D-fenfluramine activates rat oxytocinergic and vasopressinergic neurons through different mechanisms. *Brain Res* 1999;851: 247–251.

MIYATA, S.; NAKASHIMA, T.; KIYOHARA, T. *Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations.* *Neurosci. Lett*, 175: 63-66, 1994.

MITCHELL, P. J. & REDFERN, P. H. *Potentiation of the time-dependent, antidepressant-induced changes in the agonistic behaviour of resident rats by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635.* *Behav Pharmacol*, 8: 585–606, 1997.

MYSTKOWSKI, P. & SCHWARTZ, M. W. *Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era.* *Nutrition*, 16: 937–946, 2000.

MONTES, R. & JOHNSON, A. K. *Efferent mechanisms mediating renal sodium and water excretion induced by centrally administered serotonin.* *Am J Physiol*. 259:1267-1273, 1990.

MOSIENKO, V.; BERT, B.; BEIS, D.; MATTHES, S.; FINK, H.; BADER, M.; ALENINA, N. *Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin.* *Transl Psychiatry*, 92:118-122, 2012.

NICOLL, R. A.; MALENKA, R. C.; KAUFER, J. A. *Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system.* *Physiol Rev*, 70:513-565, 1990.

NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. *Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of aversion generated in the dorsal periaqueductal gray.* *Pharmacol Biochem Behav*, 52:1–6. 1995.

NOMURA, M.; AKAMA, K.T.; ALVES, S. E. X. KORACH, V.; GUSTAFSSON, J.-A.; PFAFF D.W.; GAWA, O. *Differential distribution of estrogen receptor(ER)- and ER-β in the mid brain raphe nuclei and periaqueductal gray in male mouse: predominant role of ER-β in mid brain serotonergic systems.* *Neuroscience*, 130: 445–456, 2005.

OGHEDALSKI, T.; SUBBURAJU, S.; WYNN, P. C.; AGUILERA, G. *Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity.* *J Neuroendocrinol*, 19:189-197, 2007.

OEKERS, W. *Drospirenone, a progestogen with antimineralocorticoid properties: a short review.* *Mol. Cell. Endocrinol*. 217: 255–261. 2004.

OLIVARES, E. L.; COSTA-E-SOUSA, R. H.; CAVALCANTE-LIMA, H. R.; LIMA, H. R.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; REIS, L.C. *Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite.* *Braz. J. Med. Biol. Res*, 36: 1709–1716. 2003.

OHLIGER-FRERKING, P.; HORWITZ, B. A.; HOROWITZ, J. M. *Serotonergic dorsal raphe neurons from obese Zucker rats are hyperexcitable.* *Neuroscience*, 120: 627-634. 2003.

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

ORSHAL, J. M. & KHALIL, R. A. *Gender, sex hormones, and vascular tone*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol;286:233–249. 2004

OSHIMA, A.; FLACHSKAMM, C.; REUL, J. M.; HOLSBOER, F.; LINTHORST, A. C. *Altered serotonergic neurotransmission but normal hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in mice chronically treated with the corticotropin-releasing hormone receptor type 1 antagonist NBI 30775*. Neuropsychopharmacology, 28: 2148-2159, 2003.

OSTERLUND, M.K., 2010. *Underlying mechanisms mediating the antidepressant effects of estrogens*. Biochim. Biophys. Acta 1800: 1136-1144. 2010.

OYOLA, M. G.; PORTILLO, W.; REYNA, A.; FORADORI, C. D.; KUDWA, A.; HINDS, L.; HANDA, R. J.; MANI, S. K. *Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor- $\beta$  ( $ER\beta$ ) activation by a selective  $ER\beta$  agonist in female mice*. Endocrinology. 153:837-846. 2012.

PAN, L. & GILBERT, F. *Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype in the paraventricular nuclei of the hypothalamus induces CRH and ACTH release in the rat*. Neuroendocrinology, 56:797-802, 1992.

PANDARANANDAKA, J.; POONYACHOTI, S.; KALANDAKANONDTHONGNSOG, S. *Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system*. Behav Brain Res. 1981:142-148, 2009.

PAXINOS, G. & WATNSO C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London. 1986.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. J. *Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. Neurosci Methods, 14:149-167, 1985.

PECHERE-BERTSCHI, A.; MAILLARD, M.; STALDER, H. *Renal segmental tubular response to salt during the normal menstrual cycle*. Kidney Int, 61:425–431, 2002.

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

PISZCZEK, L.; SCHLAX, K.; WYRZYKOWSKA, A.; PISZCZEK, A.; AUDERO, E.; THIL, O.; GROSS, C. *Serotonin 1A auto-receptors are not sufficient to modulate anxiety in mice*. Eur J Neurosci, [Epub ahead of print], 2013.

PINTO-MEZA, A.; USALL, J.; SERRANO-BLANCO, A.; SUAREZ, D.; HARO, J. M. *Gender differences in response to antidepressant treatment prescribed in primary care. Does menopause make a difference?* J Affect Disord, 93:53–60. 2006

POPOVA, N. K.; NAUMENKO, V. S.; CYBKO, A. S.; BAZOVKINA, D. V. *Receptor-genes cross-talk: effect of chronic 5-HT(1A) agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin treatment on the expression of key genes in brain serotonin system and on behavior.* Neuroscience, 169:229-235, 2010.

RAMOS, A.; BERTON, O., PIERRE, M.; CHAUOFF, F. *A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains.* Behavioral Brain Research, 85: 57-69, 1997.

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T. W.; GREWAL, J. S. & GARNOVSKAYA, M. N. *Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction.* Pharmacol Ther, 92:179-212, 2001.

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GETTYS, T. W.; GARNOVSKAYA, M. N. *The recombinant 5-HT<sub>1A</sub> receptor: G protein coupling and signaling pathways.* Br. J. Pharmacol, 127:1751–1764, 1999.

RECKELHOFF, J. F. & FORTEPIANI, L. A. *Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension.* Hypertension 43: 918-923, 2004.

REIS, L. C. *Role of the serotonergic system in the sodium appetite control.* An Acad Bras Cienc 79: 261-283. 2007.

REIS, L. C.; RAMALHO, M. J.; FAVARETTO, A. L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. *Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release.* Proc Nat Acad Sci USA 91: 12022-12026. 1994.

REIS, L. C.; RAMALHO, M. J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. *Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control.* Braz J M Biol Res, 24: 633-641, 1991.

RESSLER, K. J. & NEMEROFF, C. B. *Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders.* Depress Anxiety 12: 2–19. 2000.

RIAD, M.; WATKINS, K.C.; DOUCET, E.; HAMON, M.; DESCARRIES, L. *Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors).* Journal of Neuroscience, 21: 8378–8386, 2001.

ROBICHAUD, M. & DEBONNEL, G. *Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats.* J Neuroendocrinol 17: 179-185, 2005.

ROGERS, J. L.; MITCHELL, A. R.; MARIC, C.; SANDBERG, K.; MYERS, A.; MULRONEY, S. E. *Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1*

receptors in female and male rats. *Am J Physiol Regul Integr. Comp Physiol*, 292:794–799, 2007.

ROSSI, D. V.; DAI, Y.; THOMAS, P.; CARRASCO, G. A.; DONCARLOS, L. L.; MUMA, N. A, LI, Q. *Estradiol-induced desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptor-beta*. *Psychoneuroendocrinology*. 7:1023-1033. 2010.

RUBINOW, D. R.; SCHMIDT, P. J.; ROCA, C. A. *Estrogen-serotonin interactions: implications for affective regulation*. *Biol Psychiatry*, 44:839–850, 1998.

RUGINSK, S.G.; LOPES DA SILVA, A.; VENTURA, R. R.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. *Central actions of glucocorticoids in the controlo f body fluid homeostasis: review*. *Braz J Med Biol Res*, 42: 61-67, 2007.

SANSOM, J.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. *Blood pressure assessment in healthy cats and cats with hypertensive retinopathy*. *Am J Vet Res*, 65: 245-252, 2004.

SIMONIAN, S. X. & HERBINSO, A. E. *Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus*. *J Neuroendocrinol*, 11:803-806, 1997.

SANTOLLO, J.; MARSHALL, A.; DANIELS, D. *Activation of membrane-associated estrogen receptors decreases food and water intake in ovariectomized rats*. *Endocrinology*, 154:320-229, 2013.

SCHUNKER, T. H.; DANSER, A. H.; HENSEH, W.; DERKX, F. H.; KURZINGE, R. S.; RIEGGER, G. A. *Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women*. *Circulation*, 95:39–45, 1997.

SHARE, L. *Role of vasopressin in cardiovascular regulation*. *Physiol Rev*. 68:1248-84, 1988.

SANCHEZ, L. R.; REDDYA, P. A.; CENTENOA, L. M.; HENDERNSOA, A. J.; BETHEA, L. C. *A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques*. *Molecular Brain Research*, 135: 194–203, 2005.

SILVA, L. E. C.; CASTRO, M. M.; AMARAL, F.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K. *Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43: 759-766, 2010.

SIMERLY RB, CHANG C, MURAMATSU M, SWANNSO LW. *Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study*. *J Comp Neurol*, 294:76–95, 1990.

SOUBRIÉ, P. *Serotonergic neurons and behavior*. *J Pharmacol*, 17:107-112, 1986.

STACHENFELD, N. S.; SILVA, C. S.; KEEFE, D. L.; KOKOSZKA, C. A.; NADEL, E. R. *Effects of oral contraceptives on body fluid regulation*. J Appl Physiol, 87:1016–1025, 1999

SUZUKI, H.; BARROS, R.P.; SUGIYAMA, N.; KRISHNAN, V.; YADEN, B.C.; KIM, H.J.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.Å. *Involvement of estrogen receptor  $\beta$  in maintenance of serotonergic neurons of the dorsal raphe*. Mol Psychiatry, 18: 674-80, 2013.

SOMPONPUN, S. J.; JOHNNSO, A. K.; BELTZ, T.; SLADEK, C. D. *Estrogen receptor- $\alpha$  expression in osmosensitive elements of the lamina terminalis: regulation by hypertonicity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 287: 661-669, 2004.

NSOG, D.; ARIKAWA, E.; GALIPEAU, D. M.; YEH, J. N.; BATTELL, M. L.; YUEN, V. G.; MCNEILL, J. H. *Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats*. Am J Hypertens 18: 1189-1194, 2005.

SOTELO, C.; CHOLLEY, B.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H.; HAMON, M. *Direct Immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors on serotonergic neurons in the brain raphe nuclei*. Eur. J. Neurosci, 2: 1144–1154, 1990.

STACHENFELD, N. S.; DIPIETRO, L.; PALTER, S. F.; NADEL, E. R. *Estrogen influences osmotic secretion of AVP and body water balance in postmenopausal women*. Am J Physiol, 274:187–195, 1998.

STEIN, J. M.; LIND, R. W.; JOHNNSO, A. K. *Central serotonergic influences on renal electrolyte and water excretion*. Neuropharmacology, 26: 1685-1692, 1987.

STEINBUSCH, H. W. *Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals*. Neuroscience, 6:557-618, 1981.

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

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

STRICKER, E. M.; THIELS, E.; VERBALIS, J. G. *Sodium appetite in rats after prolonged dietary sodium deprivation: a sexually dimorphic phenomenon*. Am J Physiol, 260: 1082- 1088, 1991.

STRICKER, E. M. & VERBALIS, J. G. *Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats*. Regul. Pept, 66:83-5, 1996.

SUMNER, B. E.; GRANT, K. E.; ROSIE, R.; HEGELE-HARTUNG, C.; FRITZEMEIER, K. H.; FINK, G. *Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine(2A) receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement*. Brain Res Mol Brain Res, 73: 119-128, 1999.

SUNDSTROM, E.; KOLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSNSO, E. B.; PSCHERA, H.; LUNELL, N. O.; *Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester*. Brain Res Dev Brain Res. 75:1–12, 1993.

TANAKA, J.; USHIGOME, A.; HORI, K.; NOMURA, M. *Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats*. Brain Research Bulletin, 45: 315-318, 1998.

TEREK, M. C.; KANIT, L.; DOĞAN, Y. H.; GÖZEN, O.; ZEYBEK, B. KESER, A. OZSENER, S.; POGUN, S. *Effects of hormone replacement and tamoxifen on depression in ovariectomized rats*. Ginekol Pol, 83:522-526, 2012.

TIGERSTEDT, R. & BERGMAN, P. *Niere und kreislauf*. Arch. Physiol, 8: 223–271, 1898.

TIPPETT, F. E.; PADGETT, G. A.; EYSTER, G.; BLANCHARD, G.; BELL, T. *Primary hypertension in a colony of dogs*. Hypertension, 9: 49-58, 1987.

TORRENTE, M. P.; GELENBERG, A. J.; VRANA, K. E. *Boosting serotonin in the brain: is it time to revamp the treatment of depression?* J Psychopharmacol, 26:629-635, 2012.

TOUFEXIS, D. J.; MYERS, K. M.; DAVIS, M. *The effect of gonadal hormones and gender on anxiety and emotional learning*. Horm Behav, 50:539–549, 2006.

TRILLAT, A. C.; MALAGIÉ, I.; MATHE-ALLAINMAT, M.; ANMELLA, M. C.; JACQUOT, C.; LANGLOIS, M.; GARDIER, A. M. *Synergistic neurochemical and behavioral effects of fluoxetine and 5-HT1A receptor antagonists*. Eur J Pharmacol, 357:179–184. 1998.

UMRIUKHIN, A. E.; WIGGER, A.; SINGEWALD, N.; LANDGRAF, R. *Hypothalamic and hippocampal release of serotonin in rats bred for hyper- or hypo-anxiety*. Stress, 5:299-305, 2002.

VARGA, V.; SZEKELY, A. D.; CSILLAG, A.; SHARP, T.; HAJO´ S, M. *Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones*. Neuroscience 106:783–792. 2001.

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*. J Neuroendocrinol, 23: 481-489, 2011.

VIJANDE, M.; COSTALES, M.; MARIN, B. *Sex difference in polyethylenglycol-induced thirst*. Experientia, 34: 742-743, 1978.

WADE, G. N. *Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight*. Physiol Behav, 8: 523-534, 1972.

WALF, A. A. & FRYE, C. A. *Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice*. *Physiol Behav*, 99:169-174, 2010.

WALTHER, D. J.; PETER, J. U.; BASHAMMAKH, S.; HORTNAGL, H.; VOITS, M.; FINK, H. *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. *Science*, 299:76, 2003.

WANG, C. C.; LIN, H. C.; CHAN, Y. H.; GEAN, P.W.; YANG, Y. K.; CHEN, P. S. *5-HT<sub>1A</sub>-receptor agonist modified amygdala activity and amygdala-associated social behavior in a valproate-induced rat autism model*. *Int J Neuropsychopharmacol*, Jul 3:1-13, 2013.

WANG, Q. P.; OCHIAI, H.; NAKAI, Y. *GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining*. *Brain Res Bull* 29: 943–948. 1992.

WEISER, M. J. & HANDA, R. J. *Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus*. *Neuroscience Volume* 159: 883–895, 2009a.

WEISER, M. J. HANDA, R. J. *Estrogen receptor beta (ERbeta) agonist diarylpropionitrile (DPN): biological activities of R- and S-enantiomers on behavior and hormonal response to stress*. *Endocrinology*, 150:1817-1825. 2009b.

YOUNG, E. A.; ALTEMUS, M.; PARKINSO, V.; SHASTRY, S. *Effects of estrogen antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats*. *Neuropsychopharmacology*, 25:881-891, 2001.

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

YAMAGUCHI, K.; AKAISHI, T.; NEGORO, H.; *Effect of estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats*. *Endocrinol Jpn*, 26:197–205, 1979.

ZHANG, Y.; D'SOUZA, D.; RAAP, D. K.; GARCIA, F.; BATTAGLIA, G.; MUMA, N. A.; VAN DE KAR, L. D. *Characterization of the functional heterologous desensitization of hypothalamic 5-HT(1A) receptors after 5-HT(2A) receptor activation*. *J Neurosci*, 21:7919-7927. 2001.

ZANGROSSI, H. JR.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. *Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze*. *Neurosci Biobehav*, 25:637-45. 2001.

ZIFA, E. & FILLION, G. *5-Hydroxytryptamine receptors*. *Pharmacol Rev*. 144:401-458. 1992.

ZOCCALI, C.; ZABLUDOWSKI, J. R.; ISLES, C. G.; MURRAY, G. D.; INGLIS, G. C.; ROBERTNSO, J. I.; FRASER, R.; BALL, S. G. *The effect of a 5-HT antagonist*,

*ketanserin, on blood pressure, the renin-angiotensin system and sympathoadrenal function in normal man. Br J Clin Pharmacol, 3:305-311, 1983.*

ZONGAZO, M. A.; CARAYON, A.; MASNSO, F.; ISNARD, R.; EURIN, J.; MAISTRE, G.; BARTHÉLEMY, C.; PROST, A. C.; LEGRAND, J. C. *Atrial natriuretic peptide during water deprivation or hemorrhage in rats. Relationship with arginine vasopressin and osmolarity. J Physiol Paris. 86:167-75, 1992.*