

Influência dos hormônios sexuais femininos e do nervo renal no balanço hidromineral de ratas Wistar

Jones Bernardes Graceli

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Biomédico
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, ES Agosto de 2005

Jones Bernardes Graceli

Influência dos hormônios sexuais femininos e do nervo renal no balanço hidromineral de ratas Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADORA

Profa Dra Margareth Ribeiro Moyses

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Biomédico
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, ES Agosto de 2005

Dedico este trabalho.....

Agradecimentos

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	06
Lista de Figuras.....	07
Lista de Abreviaturas.....	08
 RESUMO.....	 12
 ABSTRACT.....	 15
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. Animais Experimentais.....	36
3.2 Grupos Experimentais.....	36
3.3 Procedimentos Experimentais.....	37
3.3.1 Castração.....	37
3.3.2 Desnervação Renal.....	38
3.3.3 Massa dos órgãos.....	38
3.3.4 Dosagem das catecolaminas renais.....	39
3.3.5 Dosagem de sódio urinário.....	40
3.4 Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	42
5. DISCUSSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Valores médios de catecolaminas renais de fêmeas controle, castradas, desnervadas e, castradas+desnervadas 46

Tabela 2: Valores da relação entre peso dos rins direito (RD) e esquerdo (RE), dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) e, do útero(U) com peso final (PF), dos grupos controle, castrado, desnervado e, castrado+desnervado. 47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Valores da ingestão de água em fêmeas controle (n=8) , castradas (n=8), desnervadas (n=8) e, castradas e desnervadas (n=8). Os valores foram expressos como média±EPM.## p<0,01 e #p<0,05 quando comparado ao grupo desnervado.	42
Figura 2: Valores da excreção de água em fêmeas controle (n=8) , castradas (n=8), desnervadas (n=8) e, castradas e desnervadas (n=8). Os valores foram expressos como média±EPM.## p<0,01 e #p<0,05 quando comparado ao grupo desnervado.	43
Figura 3: Valores da excreção de sódio em fêmeas controle (n=8), castradas (n=8), desnervadas (n=8) e, castradas e desnervadas (n=8). Os valores foram expressos como média±EPM.††p<0,01 quando todos comparados ao grupo castrado.	44
Figura 4: Valores da concentração das catecolaminas renais em fêmeas controle (n=13), castradas (n=11), desnervadas (n=7) e, castradas+desnervadas (n=9). Os valores foram expressos como média±EPM.** p<0,01 e *p<0,05 quando comparado ao grupo controle. ††p<0,01 quando comparado ao grupo castrado.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS

AA: ácido araquidônico
AJG: aparelho justaglomerular
AMPc: 3', 5' adenosina monofosfato cíclica
ANSR: atividade do nervo simpático renal
AI: angiotensina I
AII: angiotensina II
AP1: fator de transcrição AP1
AQP: aquaporina
ARP: atividade da renina plasmática
AT₁: receptor de angiotensina do subtipo 1
AVP: arginina vasopressina
AV3V: região anterior do terceiro ventrículo
BVLr: bulbo ventrolateral rostral
BVLM: bulbo ventrolateral medial
CA: catecolaminas
Cast+Desn: grupo castrado+desnervado
CLC-2: canal de cloreto do subtipo 2
CNaE: canal de sódio epitelial
COMT: catecol-o-metil-transferase
COX: ciclooxigenase
CNTC: cotransportador NaCl
CNA: núcleo central da amígdala
DAG: diacilglicerol
Desn: grupo desnervado
DCC: ducto coletor cortical
DNA: ácido desoxirribonucléico

ECA: enzima conversora de angiotensina
ENSR: eferência do nervo simpático renal
ERE: elemento responsivo ao estrogênio
FSR: fluxo sangüíneo renal
GABA: ácido-gama-amino-butírico
GnRH: hormônio liberador de gonadotropinas
HAD: hormônio antidiurético
IP3: inositol trifosfato
L₃: 3^a vértebras lombares
NMCs: neurônios magnocelulares
NMDA: n-metil-d-aspartado
mOsm; miliosmol
NOR: noradrenalina
NOS: núcleo supra-óptico
NPB: núcleo parabraquial
NPV: núcleo paraventricular
NTS: núcleo do trato solitário
OPMn: núcleo pré-óptico médio
OSF: órgão subfornical
OVLt: órgão vascular da lâmina terminal
PAM: pressão arterial média
PAR: pressão arterial renal
PPR: pressão de perfusão renal
PKA: proteína quinase do tipo A
PKC δ : proteína quinase do tipo C-delta
PKC α :- proteína quinase do tipo C-alfa
RE α : receptor de estrogênio alfa
RE β : receptor de estrogênio beta
RE: receptor de estrogênio
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
RVR: resistência vascular renal

SP1: fator de transcrição SP1

SRA: sistema renina angiotensina

SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona

SNC: sistema nervoso central

SNSR: sistema nervoso simpático renal

SNSP: sistema nervoso simpático periférico

SRN: subunidades dos receptores de NMDA

TCP: tubo convoluto proximal

TRP: tubo reto proximal

TFG: Taxa de Filtração Glomerular

T₁₁: 11^a vértebras torácicas

RESUMO

RESUMO

Os rins são os órgãos especializados na homeostase da água e sal no organismo, controlam o volume do fluido celular, com o balanço urinário de sódio e de água pela formação de urina concentrada e/ ou, diluída, de acordo com a necessidade fisiológica.

O rim é um importante alvo de expressão gênica do estrogênio e a incidência de doenças renais aumentam após a menopausa, sugerindo que o estrogênio previne o desenvolvimento e progressão da doenças renais.

O sistema nervoso simpático é um importante modulador do equilíbrio hidroeletrólítico, já que fibras simpáticas pós-ganglionares inervam os rins dos mamíferos, percorrendo os segmentos do néfron, estimulando, pela liberação de noradrenalina, a vasoconstricção renal, a diminuição do ritmo de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, o aumento da reabsorção de sódio e de água, bem como o aumento da liberação de renina. Contudo, poucos são os estudos que buscam analisar os efeitos dos hormônios sexuais femininos, em especial do estrogênio, do nervo renal e de sua interação, sobre o balanço hidromineral de ratas. Portanto, nosso objetivo foi investigar a ação dos hormônios sexuais femininos e do nervo renal, bem como a sua interação na ingestão hídrica, na excreção de água e de sódio em ratas *Wistar*, buscando identificar a contribuição de cada um deles e de sua interação nessa função fisiológica de tais animais.

Ratas *Wistar* foram divididas em 4 grupos: fêmeas controle, fêmeas ovariectomizadas, fêmeas desnervadas e fêmeas castradas+desnervadas. Os animais castrados foram estudados entre 7 e 14 dias após a castração. Os animais que sofreram desnervação renal foram estudados no mesmo período. No sexto dia após as cirurgias, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, onde tiveram a ingestão hídrica, a excreção de água e de sódio controladas diariamente. O volume da ingestão e da excreção de água eram medidos por uma proveta milimetrada e, para a medida da excreção de sódio, era coletada uma alíquota de urina. No décimo quarto dia, os animais foram retirados das gaiolas metabólicas, pesados e sob anestesia, sacrificados. Os rins, o útero e o coração foram isolados e, em seguida pesados. O rim esquerdo foi congelado em um frasco âmbar com solução salina a 0°C, para a dosagem das catecolaminas renais totais, pela leitura direta em espectrofotometria de fluorescência.

Nossos resultados mostraram que o grupo desnervado ($24,1 \pm 1,3$ mL) teve uma ingestão hídrica significativamente maior que os grupos castrado ($18,4 \pm 1,0$ mL) e castrado+desnervado ($20,2 \pm 1,3$ mL). A excreção de água teve um aumento significativo no grupo desnervado ($24,1 \pm 1,3$ mL), quando comparado ao grupo controle ($2,1 \pm 0,5$ mL), castrado

($2,5 \pm 0,4$ mL) e castrado+desnervado ($3,7 \pm 0,5$ mL). A excreção de sódio foi significativamente maior no grupo castrado ($986,8 \pm 161,5$ Eqg), quando comparado aos grupos controle ($143,1 \pm 24,4$ Eqg), desnervado ($310,0 \pm 45,5$ Eqg) e castrado+desnervado ($244,3 \pm 45,9$ Eqg). Além disso, observamos uma elevação significativa na liberação das catecolaminas renais no grupo castrado (1521 ± 438 ng/g), quando comparado os grupos controle (979 ± 221 ng/g), desnervado (293 ± 78 ng/g) e castrado+desnervado (284 ± 62 ng/g).

Enfim, concluímos que a ingestão hídrica é parcialmente dependente dos hormônios sexuais femininos, devido suas interações negativas com o hormônio antidiurético e com o sistema renina angiotensina e, dependente do nervo renal. O nervo renal possui uma contribuição importante no controle da excreção renal de água e sal, bem como na osmolaridade plasmática. Além disso, os hormônios sexuais femininos possuem um papel modulador na liberação das catecolaminas renais em ratas *Wistar*, mostrando um mecanismo renoprotetor do estrogênio, nos rim dessas fêmeas.

ABSTRACT

ABSTRACT

The kidney is an organ specialized in the homeostasis of water and salt in the body, regulation of extracellular volume, which excrete either concentrated or dilute urine in accordance with physiological needs.

The kidney is an important target for estrogen dependent gene expression and the incidence of end-stage renal diseases increases after menopause, suggesting that estrogen may prevent development or progression of renal diseases.

The sympathetic nervous system is essential from the regulation of hydrosaline equilibrium, already that the sympathetic post-ganglionic fibres which innervate the kidney from the mammalian. Those fibres penetrate to nephron and an noradrenaline is released from the varicosities, stimulating the renal vasoconstriction, with decreased glomerular filtration rate and blood flow, and increased renal tubular reabsorption of sodium and water throughout the nephron and, as well as the increase release of renin and renin angiotensin system activation. Nevertheless, the role of female hormones, of renal nerve and of its interaction in the balance hydrosaline from the female rats are unknown. Therefore, our objective went to investigate the role of female sexual hormones, of renal nerve and of its interaction in the water intake, urinary sodium and water excretion, from the female rats,, seeking the relative contribution of female hormones and renal nerve to the physiologic function renal.

Female rats *Wistar* were divided in 4 groups: control, castrated, denervated and castrated+denervated female rats. The castrated animals were studied between 7 and 14 days after the castration. The animals that suffered renal denervation were studied in the same period. In the sixth day after the surgeries, the animals were put in metabolic cages, where they had the ingestion of water, the excretion of water and of sodium controlled daily. The volume of the ingestion and of the excretion of water they were conceited for a test tube and, for the measure of the excretion of sodium, an urine bracket was collected. In the fourteenth day, the animals went removed of the cages metabolic, heavy and under anesthesia, sacrificed. The kidneys, the uterus and the heart were isolated and, soon afterwards heavy. The left kidney of each female rat was frozen in a flask amber with saline solution the 0°C, for the dosage of the total renal catecholamines, for the direct reading in fluorescence spectrofotometric.

Our results showed that the denervated group ($24,1 \pm 1,3$ mL) had an ingestion of water significantly larger than the group castrated ($18,4 \pm 1,0$ mL) and castrated+denervated ($20,2 \pm 1,3$ mL). The excretion of water had a significant increase in the group denervated ($24,1 \pm 1,3$ mL), when compared to the group controls ($2,1 \pm 0,5$ mL), castrated ($2,5 \pm 0,4$ mL) and

castrated+denervated ($3,7 \pm 0,5$ mL). The excretion of sodium was significantly larger in the castrated group ($986,8 \pm 161,5$ Eqg), when compared to the groups control ($143,1 \pm 24,4$ Eqg), denervated ($310,0 \pm 45,5$ Eqg) and castrated+denervated ($244,3 \pm 45,9$ Eqg). Besides, we observed a significant elevation in the release of the renal catecholamines in the castrated group (1521 ± 438 ng/g), when compared the groups control (979 ± 221 ng/g), denervated (293 ± 78 ng/g) and castrated+denervated (284 ± 62 ng/g).

We concluded that the ingestion of water is partially dependent of the female hormones, due their negatives interactions with the antidiuretic hormone and with renin-angiotensin system and, dependent of the renal nerve. The renal nerve possesses an important contribution in the control of the renal excretion of water and salt, as well as in the plasmatic osmolality. Besides, the feminine sexual hormones possess a paper modulator in the liberation of the renal catecholamines in female rats *Wistar*, showing mechanism the renal protective effects of the estrogen, in the kidney.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A água é um importante constituinte do corpo humano e, em adultos saudáveis corresponde a aproximadamente 60% do peso corporal (Guthrie & Yucha, 2004). A maior parte da água do corpo encontra-se no espaço intracelular, isto é, cerca de 55 a 75%. A porção extracelular é dividida entre os compartimentos intravascular (plasma) e extravascular (interstício). A composição dos solutos dos fluidos intracelular e extracelular são muito diferentes. Essas diferenças existem por causa dos muitos processos de transporte que as membranas celulares possuem, acumulando ou exportando ativamente solutos específicos (Thomas, 1972). Assim, sódio e cloreto estão presentes em maior quantidade no fluido extracelular, enquanto que o potássio, magnésio e vários ácidos orgânicos ou fosfatos são substâncias predominantemente encontradas no líquido intracelular (Robertson & Berl, 1986). Cerca de 99% do sódio filtrado pelo glomérulo é ativamente reabsorvido pelos túbulos renais, um processo de grande importância na regulação dos fluidos corporais e da pressão sangüínea (Beltowski e Wójcicka, 2002). Enquanto que a água é reabsorvida pela alça de Henle, túbulos distais e coletores. E neste dois últimos, e a reabsorção é dependente do ADH (Takata et al., 2004).

Os rins são os órgãos especializados na homeostase da água e sal no organismo (Takata et al, 2004), controlam o volume do fluido celular, com o balanço urinário de sódio e de água pela formação de urina concentrada e/ ou, diluída, de acordo com a necessidade fisiológica (Guthrie & Yucha, 2004). Além dessas funções, os rins também participam do estímulo para a ingestão diária de água e de sal (Schild, 2004). A regulação do volume e da osmolaridade dos fluidos corporais são inerentes

à vida, haja vista que uma alteração na retenção de sódio é uma característica comum de certas doenças, como a síndrome nefrótica, cirrose hepática, alguns modelos de hipertensão, falência cardíaca, entre muitas outras (Souza et al, 2004). Em virtude da habilidade com que regulam o volume sanguíneo, mantendo o equilíbrio hidrosalino, é atribuída aos rins o papel de controle da pressão a longo prazo (DiBona, 2002a), através de três mecanismos principais:

1. A excreção de sódio;
2. A secreção de renina;
3. A excreção de água;

Esses mecanismos renais são modulados pelo sistema nervoso simpático renal e por fatores humorais, como o SRAA. A inervação simpática renal é um importante regulador de todos os aspectos da fisiologia renal (DiBona & Sawin 2002a). O sistema nervoso simpático é um efetador muito importante no balanço hidroeletrólítico, já que fibras simpáticas pós-ganglionares que inervam os rins dos mamíferos, são originadas dos segmentos espinhais T₁₁ e L₃, variando pouco entre as espécies e individualmente. No rato há cerca de 2000 fibras em cada rins, representando uma inervação relativamente densa (DiBona & Kopp, 1997). Um outro ponto importante, é que os rins não recebem a inervação do sistema nervoso parassimpático. De maneira que as fibras simpáticas penetram primeiramente pelo córtex, seguem através da vasculatura e dos elementos tubulares renais. A noradrenalina é liberada pelas varicosidades dos terminais do nervo renal, nos vasos de resistência, causando vasoconstrição, determinando os níveis do fluxo sanguíneo renal (FSR) e da taxa de filtração glomerular (TFG) (Johns, 2002). A renina contida nas células granulares na base da arteríola aferente, exatamente na porção final do glomérulo, é ativada e liberada

pela ação da noradrenalina. As fibras também percorrem a porção final do túbulo proximal, a porção ascendente de alça de Henle e túbulo distal (Barajas et al., 1992), e estimulam as células epiteliais a aumentar o transporte e absorção de sódio. Portanto, o aumento da atividade do nervo simpático renal (ANSR) resulta em vasoconstrição renal, diminui a GFR, diminui a RFG, aumenta a resistência vascular renal (RVR), aumenta da reabsorção renal tubular de sódio e água, e, o aumento da liberação de renina e da NOR renal (Yamaguchi et al., 2000; DiBona, 2002b).

Um dos principais fatores humorais que participam da modulação da função renal é o SRAA, no qual a AII é o seu principal efector fisiológico, ao se ligar aos receptores AT_1 dos segmentos vasculares e tubulares, aumenta a reabsorção renal de sódio, cloreto e água, bem como a vasoconstrição (Wang & Gieisch, 1996; DiBona, 2000b). Além de estimular a liberação de aldosterona pelas células da zona glomerulosa da glândula suprarrenal, um dos mecanismos mais importantes no aumento da retenção de sal. O nível de reabsorção de sódio é primariamente determinado pela ação da aldosterona sobre os canais de sódio epiteliais (CNaE) no rim, ativando-os. Esses canais medeiam a reabsorção de sódio nos ductos coletores e distais renais, no pulmão e nas glândulas exócrinas (Shigaev et al., 2000). A aldosterona é um mineralocorticoide que promove a excreção de potássio e retenção de sódio, assim influenciando a homeostase do volume extracelular e a pressão sanguínea (Williams & Williams, 2003). Ela é o maior hormônio controlador da retenção de sódio nos vertebrados e sua ação é via aumento na reabsorção de sódio através dos epitélios do ducto coletor e distal no rim (Garty, 2000). Portanto, a ação da aldosterona é um fator determinante para o nível corporal de sódio e, assim do

controle da pressão a longo prazo. O sódio, ao ser reabsorvido, entra na célula tubular renal através dos CNaE da membrana apical e, em seguida é ativamente transportados para outras células via a Na^+,K^+ -ATPase da membrana basolateral. Além desse efeito, aldosterona como um hormônio esteróide, que atravessa a membrana plasmática da célula, age se ligando aos receptores citoplasmáticos, formando complexos de hormônio mineralocorticóide-receptor. Depois, podem se ligar a regiões responsivas ao complexo, nos cromossomos, que estimulam a expressão gênica, como um efeito indireto, a síntese e, a inserção de novos canais de sódio epiteliais (Eaton et al., 2001).

Um dos fatos que comprova a ação antinatriurética observada após a estimulação do SRAA, via baixa ingestão de sódio, é bloqueada por inibidor da enzima conversora de angiotensina II (ECA), captopril, prevenindo a formação de AII, assim confirmando o papel da AII na conservação do sódio corporal. Uma outra importante ação da AII no rim, ocorre através de mecanismos pré-sinápticos, ela estimula o nervo renal a liberar NOR nas células epiteliais tubulares e nos vasos. Portanto, fica evidente a interação entre o SRAA e o sistema nervoso simpático renal (SNSR), já que secreção de renina obtida pela estimulação de receptores β_1 -adrenérgicos nas células granulares do aparelho justaglomerular, ocorre por meio da liberação de NOR pelo nervo renal (DiBona, 2000a; DiBona, 2000b).

A renina é considerada um dos componentes chave da ativação do SRAA. Atualmente, já se sabe que existem enzimas que são capazes de converter o angiotensinogênio diretamente em angiotensina (AI) e, por conseguinte, ativar o sistema independente da renina (Price et al, 1997; Resende & Mill, 2002). Entretanto, o papel dessas enzimas na ativação do SRAA não está bem estabelecido como o da

renina. A secreção de renina pelas células justaglomerulares é controlada basicamente por três mecanismos: Dois com atuação local no rim e o terceiro atuando através do SNC e mediado pela liberação de NOR pelos nervos noradrenérgicos renais (Holmer et al., 1997).

♦ O primeiro mecanismo é intra-renal e é conhecido como “mecanismo da mácula densa”. A mácula densa situa-se adjacente às células justaglomerulares e é composta por células epiteliais colunares especializadas. Qualquer alteração na concentração de NaCl que passa através dessa região afeta diretamente a liberação de renina (Skott & Briggs, 1987). Ou seja, o aumento e a diminuição na concentração de NaCl nesta região inibem e estimulam a liberação de renina, respectivamente. Estudos mostram que esse mecanismo de liberação de renina é muito mais dependente da concentração de cloreto do que a de sódio. De fato, Lorenz e cols (1991) demonstraram através de experimentos realizados com o aparelho justaglomerular (AJG) isolado de coelhos, que a adição ao meio de uma alta concentração de NaCl promove redução na produção de renina, a qual permanece inalterada, quando a concentração de sódio é reduzida e a de cloreto permanece constante. Contudo, quando a concentração de cloreto é reduzida, a liberação de renina não diminui. Esses resultados indicam que a liberação de renina da mácula densa é mais dependente da concentração de cloreto e, provavelmente, está relacionada como mecanismo de cotransporte de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^{2-}$ existente na membrana das células justaglomerulares (Lorenz et al., 1991)

♦ O segundo mecanismo de controle renal de liberação de renina é o chamado “mecanismo barorreceptor intra-renal”, o qual controla a secreção de renina basicamente por aumento da pressão de perfusão renal (PPR) nos vasos pré-

glomerulares, que diminui a secreção da renina, ou redução na PPR, que eleva a secreção de renina (Skott et al., 1991).

♦ O terceiro mecanismo ocorre pela ativação do sistema nervoso simpático renal (SNSR). De maneira que a secreção de renina obtida pela estimulação de receptores β_1 -adrenérgicos nas células granulares do aparelho justaglomerular, ocorre via liberação de NOR dos terminais simpáticos do nervo renal (DiBona, 2000a; DiBona, 2000b). Contudo, outros autores acreditam que o controle da liberação de renina pelas alterações na concentração de NaCl seja um pouco mais complexo. Ou seja, que a liberação pode estar associada com atuação de substância como a prostaciclina e adenosina. Logo, o aumento no transporte de sódio acarretaria a liberação de adenosina, que através da atuação sobre receptores A_1 promoveria aumento na liberação de cálcio dos estoques intracelulares, vasoconstrição da arteríola aferente e, conseqüente inibição da liberação de renina (Itoh et al., 1985). Por outro lado, quando o transporte de sódio diminui ocorreria um aumento de prostaciclina, as quais ativariam enzima adenilato ciclase, ocasionando um aumento na formação de AMPc, promovendo a vasodilatação da arteríola aferente e, conseqüente estimulação na liberação de renina (Bader & Ganten, 2000).

O cloreto de sódio é um dos maiores determinantes do volume e da osmolaridade corporal. De maneira que a manutenção do volume e da osmolaridade do fluido celular são muito importantes para o equilíbrio hidromineral.

A frequência com que os rins excretam água é regulada pelo hormônio antidiurético (HAD) (Antunes-Rodrigues et al., 2004). Nos humanos e muitos outros mamíferos, esse hormônio é um nonapeptídeo conhecido arginina vasopressina

(AVP), produzido pelos neurônios magnocelulares (NMCs) do eixo hipotálamo-neurohipófise (Robertson & Berl, 1986). Os NMCs libertadores de ADH no hipotálamo exibem atividade elétrica dependendo de propriedades intrínseca da membrana e, são influenciadas por fatores extrínsecos como a osmolaridade plasmática, volume sangüíneo e pressão arterial (Armstrong et al., 1995). Estudos de Patch-clamp usando neurônios NSO de ratos demonstraram que estes neurônios despolarizam, via aumento e hiperpolarizam, via diminuição da osmolaridade extracelular e, que essas respostas resultam de mudanças na atividade de canais catiônicos mecanossensíveis (Bourque et al., 1994). Pequenas mudanças na osmolaridade plasmática, ocasionam mudanças rápidas no estímulo para a transcrição de AVP no NSO e NPV, sugerindo que o estoque de AVP seja liberado para a circulação sangüínea e, rapidamente repostado por novas sínteses, processando e transportando mais AVP (Arima et al., 1999).

A ação antidiurética do ADH envolve o efeito fisiológico de aumentar a permeabilidade à água nas células do ducto coletor, elevando a quantidade de água reabsorvida da urina para o sangue. O ADH circulante ao interagir com os receptores V_2 na membrana luminal tubular, leva a um aumento intracelular de AMPc, via proteína G, que ativa a fosforilação na parte COOH-terminal da proteína do canal de água-2 (AQP2) nas células tubulares e distais do néfron (Takata et al., 2004). O número e a distribuição das AQPs nas células do ducto coletor são reguladas pelo AVP via receptor V_2 (Hayashi et al., 1994), já que parece estimular a síntese de RNAm de AQP2 e também regular sua inserção na membrana luminal do túbulo coletor através de uma rápida exocitose pela membrana plasmática (Sasaki et al.,

1998; Saito et al., 1997; Knepper & Inoue, 1997). A presença de AQP2 na membrana apical causa um aumento da permeabilidade a água no ducto coletor. O transporte de água através da membrana basolateral para o interstício é facilitado pela expressão constitutiva e inserção de AQP3 e AQP4 (Klussmann et al., 2000). O receptor V_2 é responsável pela ação antidiurética do AVP, mas há mais dois subtipos, V_{1a} e V_{1b} . Os subtipos de receptor de ADH são acoplados a proteínas G diferentes (Erlénbach et al., 1998). Os receptores V_{1a} e V_{1b} são acoplados a família das proteínas Gq, com a resposta mediada pelo fosfatidilinositol (IP_3), uma vez que o receptor V_2 está acoplado a proteína Gs, ativando a enzima adenilato ciclase e, com resposta mediada pelo AMPc (Birnbauer et al., 1992). A expressão de receptores V_2 na alça ascendente, nas células principais e na medula interna, ducto coletor e nas membranas luminiais e basolaterais foi demonstrada por Nielsen (1995). A vasopressina regula a transcrição do gene da AQP2, através de seu segundo mensageiro, o AMPc (Matsumura et al., 1997).

Todos os vertebrados mantêm a osmolaridade plasmática e o volume extracelular através da interação entre a ingestão hídrica, excreção de água e de eletrólitos. Alterações no volume sanguíneo e na pressão levam a mudanças apropriadas no balanço hidromineral através de repostas adaptativas nervosas e endócrinas. Hipovolemia induz a liberação de AVP pelos NMCs, ativando a reabsorção de água no néfron. O limiar para a estimulação da liberação de AVP com a hipovolemia é geralmente entre 10-20% do volume sanguíneo em diferentes espécies (Yasin et al., 1993). Este fato foi demonstrado por Leng et al. (1999) em que uma redução de 6% no volume sanguíneo e de 10% no volume plasmático, em humanos geram aumento na concentração plasmática de AVP (Johnson et al., 1996).

Enquanto que, a expansão isotônica do volume sanguíneo resulta em redução da concentração plasmática de AVP (Leng et al., 1999). Um aumento mínimo da osmolaridade plasmática de 1-2% induz a sede e, a diminuição do volume extracelular, apesar de um menor estímulo, também é dipsogênico, dependente do HAD. Portanto, alterações na osmolaridade e no volume plasmático controlam a liberação do ADH e a geração da sede nos mamíferos.

Forsling (1981), observou que mulheres no período da ovulação, possuíam altos níveis plasmáticos de AVP, o que era menor no período da menstruação. A administração de estrogênio em mulheres pós-menopausadas está associada com altos níveis plasmáticos de AVP, se comparado com as não tratadas (Forsling et al., 1982). Sugerindo haver uma tendência de retenção de água durante altos níveis plasmáticos de estrogênio (Claybaugh et al., 2000). Contudo, o estrogênio e a sua combinação com progesterona tem inibido o efeito antidiurético do AVP em ratos (Wang et al., 1995). Além disso, o estrogênio e a progesterona reduzem a estimulação do AMPc pelo ADH em células medulares renais de rato e de homem (Hatano et al., 1988), sugerindo que os hormônios sexuais femininos possuem uma interação com a ação e/ ou a liberação do ADH. O estrogênio administrado em ratas ovariectomizadas tem mostrado atenuação da ação antidiurética do ADH (Wang et al., 1995). Além disso, o estrogênio pode influenciar na regulação central para a síntese e liberação do AVP, já que pode atravessar a barreira hemato-encefálica e, se ligar a núcleos cerebrais que controlam sua liberação.

Para a gênese da sede, admite-se a importância das células dos osmorreceptores de sódio, localizadas no OVLT (órgão vascular da lâmina terminal) e OSF (órgão subfornical), na região anterior do terceiro ventrículo (AV3V), em que

a barreira hemato-encefálica está ausente. Portanto, estão em contato com as concentrações iônicas plasmáticas e hormonais (McKinley et al., 1999). Essas células são neurônios altamente especializados capazes de perceber mudanças na pressão osmótica externa e enviar sinais elétricos, que ativam áreas do SNC envolvidas no controle da ingestão hídrica, na excreção de sal e água (Bisset et al., 1988). A infusão de solução hipertônica de cloreto de sódio na área AV3V é dos estímulos mais potentes para geração da sede (McKinley et al 1978).

A ingestão espontânea de água é modulada por estímulos não osmóticos, como certos tipos de hormônios. Estudos realizados por Tarttelin & Gorsk (1971) mostraram que o consumo de água varia durante o ciclo estral de ratas, com a ingestão sendo menor no dia do estro, quando o estrogênio se apresenta com níveis mais elevados. A ovariectomia aboliu a receptividade sexual do ciclo estral e as variações no consumo de água. Assim, o estrogênio parece ser um importante fator modificador do consumo espontâneo de água em fêmeas férteis (Krause et al., 2003). Estes dados sugerem uma importante função do estrogênio na regulação da ingestão hídrica.

Na literatura existem evidências que reforçam o papel do estrogênio como modulador central do tônus autonômico. Experimentos com ratos machos e fêmeas tem demonstrado uma mudança significativa no tônus autonômico, via efeitos diretos nos neurônios parassimpáticos e simpáticos pré-ganglionares no núcleo ambíguo e nas células da coluna intermédiolateral, respectivamente (Saleh et al., 1999; Saleh et al., 2000). Um fato que comprova isso é a presença dos RNAm dos receptores de estrogênio (RE) (Shurghurue et al., 1997) em certas regiões do SNC (Roselli et al., 1998),

A injeção do estrogênio no núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo ambíguo (NA), aumentaram o tônus parassimpático e na sensibilidade do barorreflexo. Já essa aplicação hormonal no NTS e no BVLM (bulbo ventrolateral rostral) diminuíram o tônus simpático (Saleh et al., 2000). A injeção do antagonista de receptor de estrogênio, ICI 182780, aboliram esses efeitos (Saleh et al., 2005). Saleh et al., (2000) observaram que a pressão e a ANSR diminuíram significativamente após 30 minutos da injeção de estrogênio nos núcleos do NTS, BVLM, NPB (núcleo parabraquial), NCA (núcleo central da amígdala) e espaço intratecal de ratas Wistar fêmeas. A redução da ANSR foi de 27%.

As ações do estrogênio, normalmente, são mediadas por dois tipos de receptores (RE) que são geneticamente diferentes, os receptores, RE α e RE β (Katzenellenbogen BS et al. 2000; Hall et al., 2001; Gustafsson, 2003), que possuem uma distribuição vasta em vários órgãos (Kuiper et al., 1997). Eles são membros da superfamília de receptores nucleares e com ações regulatórias variadas na transcrição gênica e, em sinais celulares. Além de estarem presentes também na membrana plasmática e no citoplasma (Nadal et al., 2003). Quando ligados ao hormônio, esses receptores sofrem rearranjos conformacionais, levando a formação de homo ou heterodímero de RE α e RE β . Ativados, interagem, com alta afinidade diretamente com regiões específicas do gene, chamados de elementos responsivos do estrogênio (ERE), como promotores ou indiretamente através de interações protéicas com fatores de transcrição como AP1 e SP1 (Hall et al., 2001). Ambos subtipos podem ativar a transcrição, contudo parece que o RE α é mais potente ativador que o RE β . Assim, a resposta dependente do estrogênio é expressa pela presença de um de seus subtipos de receptores (Turgeon et al., 2004).

O rim é um importante alvo de expressão gênica do estrogênio (Jelinsky et al., 2003) e a incidência de doenças renais aumentam após a menopausa, sugerindo que o estrogênio previne o desenvolvimento e progressão da doenças renais (Shim et al., 2004). Evidências indicam que o estrogênio é renoprotetor, já que a progressão da doença renal é menor em fêmeas na premenopausa, quando comparada com machos da mesma idade. A progressão da doenças renal é mais rápida em fêmeas na menopausa, do que nas férteis Dubey & Jackson (2001a). O mecanismo renoprotetor parece depender da conversão do estrogênio em hidroxiestrogênio e metoxoestrogênio pela via do citocromo P450 e da catecol-o-metil-transferase (COMT), respectivamente (Dubey et al., 2004b). Esses metabólicos inibem a proliferação celular e a produção da matrix extracelular, diminuindo a injúria vascular e, ocasionando o efeito antimitogênico do estrogênio (Dubey et al., 2000; Dubey & Jackson 2001a; Dubey & Jackson 2001b; Zacharia et al., 2001). O aumento dos níveis de catecolaminas parece que prejudicam essa renoproteção, já que competem com a COMT e inibem a conversão do estrogênio em hidroxi e metoxiestrogênio. As catecolaminas ativam fatores de crescimento, mediados por receptores α - e β -adrenérgicos (Nakaki et al., 1990). Um fato que comprova isso, foi demonstrado por Dubey et al., (2003), em que as catecolaminas bloqueiam o efeito antimitogênico de estrogênio em células mesangiais glomerulares humanas e, em células musculares lisas de artérias coronárias humana (Dubey et al., 2004b).

Embora a progesterona e o estrogênio controlem primariamente as funções reprodutivas femininas, receptores desses hormônios esteróides podem ser encontrados em órgão não reprodutivos, como o cérebro (Numan et al., 1999),

sistema cardiovascular (Orshal & Khalil, 2003; Dubey & Jackson, 2001) e nos túbulos renais (Mosselman et al., 1996; Dubey & Jackson, 2001a). Esses receptores nos túbulos renais estão envolvidos na regulação de sódio, de potássio e de cálcio (Brunette & Leclerc, 2001; Brunette & Leclerc, 2002). O estrogênio modula o equilíbrio de sal e de água corporal de pessoas em repouso e em situações como a desidratação, sobrecarga de sódio e a hiponatremia (Stachenfeld et al., 1999), por efeitos diretos nos túbulos renais (Brunette & Leclerc, 2001; Verlander et al., 1998; Stachenfeld et al., 2003).

A função renal anormal é um dos pré-requisitos para o desenvolvimento da hipertensão, como em muitos tipos de disfunção renal que contribuem para esse estado, incluindo um aumento na RVR, na retenção de sódio e água, e, aumento na liberação de renina, catecolaminas e outras substâncias vasoativas (DiBona, 2002).

O sódio está presente em maior quantidade no fluido extracelular e a sua regulação é muito importante para o balanço hidroeletrolítico. O canal de sódio epitelial amiloride-sensível (CNaE) está localizado principalmente nas células do túbulo convoluto distal, ducto coletor e ducto coletor cortical (DCC) nos rins dos mamíferos (Schmitt et al., 1999; Biner et al., 2002). O transporte de sódio é dependente do número e da atividade dos canais de CNaE localizados na membrana epitelial e, a frequência com que o sódio é transportado por esses canais (Petty et al., 1981). No trabalho de Gambling e cols. (2004) foi demonstrado que os hormônios sexuais femininos modulam diferentemente a expressão do canal de CNaE no rim de ratas fêmeas. Mostrando que o estrogênio possui um tipo de modulação na expressão desses canais e, conseqüentemente na reabsorção do sódio tubular renal.

Outro íon importante para a regulação dos fluidos corporais é o cloreto já que é o ânion predominante do ultrafiltrado glomerular, e é reabsorvido ao longo do néfron por mecanismos transepiteliais ou paracelulares (Aronson & Giebisch, 1997). O transporte transcelular de cloreto envolve muitas proteínas de membrana, incluindo canais de cloreto expressos ao longo dos túbulos renais (Morales et al., 1996; Uchida, 2000). Nascimento e cols. (2003) mostraram que o estrogênio modula diretamente os canais de cloreto no túbulo proximal no rim de ratas normais, em que as concentrações de estrogênio 10^{-10} , 10^{-9} e 10^{-8} M, induziram um aumento de 47, 84 e 140% na expressão do RNAm desse canal. Mostrando que é dose dependente. E, corroborando com mais um mecanismo estrogênico para a regulação dos fluidos e eletrólitos corporais. Já que a manutenção do sódio corporal, bem como do volume extracelular são uns dos mais importantes pré-requisitos para uma perfusão adequada dos órgãos, inclusive par a homeostase cardiovascular (Shnermann, 2003).

Outro hormônio feminino que possui um efeito na regulação do sódio, é a progesterona (Stachenfeld et al., 2005). Embora seja uma ação indireta, competindo com a aldosterona pelos receptores de mineralocorticóides no túbulo distal (Myles & Funder, 1996). A retenção de água e sal pela renina, AII e aldosterona aumentam cocomitantemente com a elevação da progesterona (Sealy et al., 1994).

A participação dos hormônios sexuais femininos para mulheres férteis e menopausadas, em relação a regulação do balanço renal hidroeletrólítico não esta muito clara e precisa de mais investigações.

Esses efeitos relatados de estrogênio e progesterona na regulação do balanço hidromineral possuem implicações clínicas importantes, durante o ciclo menstrual, como a hipotensão ortostática, a hipertensão e a retenção de sódio durante a gravidez. Ou ainda, durante outros estados de altos níveis de estrogênio e progesterona, como na síndrome de hiperestimulação ovariana e pré-clampsia (Stachenfeld et al., 2005).

Diversos estudos sugerem que os hormônios sexuais femininos exerçam seus papéis no balanço hidroeletrolítico de animais, merecendo um destaque, as suas ações no organismo feminino, marcado evidentemente pela fase reprodutiva em que existem ciclos menstruais, nas mulheres e, estrais, em outros mamíferos, como na rata por exemplo. Onde ocorrem alterações fisiológicas cíclicas nas concentrações séricas desses esteróides femininos. Os mecanismos pelos quais esses hormônios atuam são muito variados, desde ações nos principais órgãos reguladores desse balanço, com efeitos diretos, e/ ou até com efeitos indiretos causados pelos seus metabólicos. Contudo, o efeito da interação dos hormônios sexuais femininos e a atividade do nervo simpático renal no balanço hidromineral ainda não foram totalmente elucidado. Em virtude disso, nosso objetivo foi investigar a ação dos hormônios sexuais femininos, do nervo simpático renal e de sua interação, no balanço hidroeletrolítico e na liberação de catecolaminas renais (norepinefrina) em ratas *Wistar* normotensas, buscando identificar a participação deles na ingestão espontânea de água, na excreção de água e de sódio, bem como na liberação das catecolaminas renais.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar a ação dos hormônios sexuais femininos no balanço hidroeletrolítico e na liberação de catecolaminas (norepinefrina) renais em ratas Wistar normotensas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a participação dos hormônios sexuais femininos e do nervo simpático renal na ingestão espontânea de água em ratas normotensas controle, ovariectomizadas, desnervadas e ovariectomizadas + desnervadas.
- Verificar a participação dos hormônios sexuais femininos e do nervo simpático renal na excreção espontânea de água em ratas normotensas controle, ovariectomizadas, desnervadas e ovariectomizadas + desnervadas.
- Verificar a participação dos hormônios sexuais femininos e do nervo simpático renal na excreção espontânea de sódio em ratas normotensas controle, ovariectomizadas, desnervadas e ovariectomizadas + desnervadas.
- Verificar a participação dos hormônios sexuais femininos e do nervo simpático renal na concentração de catecolaminas (norepinefrina) renais em ratas normotensas controle, ovariectomizadas, desnervadas e ovariectomizadas + desnervadas.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1- Animais experimentais:

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem *Wistar (Ratus norvegicus albinus)* com peso variando entre 200 – 250 g, provenientes e mantidos pelo biotério do Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Neste experimento os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura controlada (20-24°C) e iluminação artificial de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa (FINEP). As gaiolas permitiram o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia pelo hidrato de cloral 10% (40mg/kg) e o término da cirurgia receberam antibiótico (Enrofloxacin 25mg/ml), por via intramuscular. Os animais foram pesados no início e no final dos tratamentos.

2- Grupos experimentais:

Os animais foram separados, pesados e divididos nos seguintes grupos experimentais:

- ♦ grupo controle (Controle, n=8)
- ♦ grupo castrado (Cast, n=8)
- ♦ grupo desnervado (Desn, n=8)
- ♦ grupo castrado+desnervado (Cast+Desn, n=8)

Durante o período após as cirurgias, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e tiveram 6 dias para sua recuperação. No sexto dia foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas, para uma aclimatação e mantidos por mais oito dias. No sétimo dia, os parâmetros analisados não foram considerados. Na gaiola metabólica, os animais tiveram seu acesso à ingestão de água controla por bebedores milimetrados que continham no máximo 160ml de água. Após a análise diária da ingestão hídrica, o volume do bebedouro era novamente completado. O acesso à ração era livre. Nesta gaiola coletamos também o volume urinário diário, isto é, a urina de 24 horas, para medida da concentração de sódio.

3. Procedimentos cirúrgicos

◆ **Castração**

Após a anestesia, as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele e celular subcutâneo, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura das tuba uterina e remoção dos ovários. Depois a cavidade peritonal foi suturada com catgut simples 0 esterelizado, a região limpa com gaze e a pele fechada com linha de nailon preto 6.0.

◆ **Desnervação Renal**

Após a anestesia, os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica, onde tiveram seus pêlos da região entre a última costela e a coxa cortados. Foi feita uma incisão nessa região, onde as camadas da pele foram divulsionadas, com exposição da cavidade peritoneal até a visualização dos rins. Os rins tiveram seu acesso cirúrgico nos flancos direito e esquerdo, expondo-se a área correspondente ao hilo renal. O procedimento consiste na remoção dos ramos simpáticos renais que trafegam junto ao tronco arterovenoso renal dos rins e pincelamento de solução de fenólica a 10% em álcool sobre a artéria renal, com a finalidade de se lesar possíveis pequenos ramos que trafegam junto a essa artéria. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de uma lupa (D. F. Vasconcelos S. A. Model 902 e Série 18140), que melhor evidência as terminações da inervação renal Terminando tal procedimento a ferida cirúrgica foi suturada em dois planos e os animais receberam antibiótico (Enrofloxacin 25mg/ml) intramuscular.

4. Massa dos Órgãos (Peso Úmido)

Após os 7 dias de coleta de urina e tratamentos dos animais nas gaiolas metabólicas, eles, sob anestesia pelo éter etílico, foram sacrificados e o coração, os rins e o útero foram isolados, lavados com solução fisiológica e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e, em seguida foram pesados. O coração teve suas câmaras separadas e pesadas separadamente, de maneira que o septo ficou junto ao ventrículo esquerdo.

5. Dosagem de Catecolaminas

Após o rim esquerdo ter sido pesado, era congelado em um frasco âmbar contendo em solução salina a 0°C. Depois de 7 dias dessa coleta, era feita a dosagem das catecolaminas. Para a dosagem das catecolaminas, os rins foram descongelados, o excesso de salina era retirado com papel toalha e totalmente fragmentados com o auxílio de um bisturi. Os tecidos foram homogeneizados em solução gelada 4mM EDTA, 7-10 volumes tamponadas com Tris-HCl em pH 7,4 em 2 excursões, durante 1 minuto. Todo processo de homogeneização foi realizado em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a $12.000 \text{ g} \times 10^4$, durante 10 minutos a + 4°C. Os volumes do homogenato e do sobrenadante foram anotados e separados. O volume do sobrenadante foi empregado para leitura direta de espectrofotometria de fluorescência, em um fluorímetro (HITACH Model F-200), com Ex: 285nm e En: 325nm, usando a Curva Padrão de Noradrenalina (NOR) em nmol/ml abaixo:

NOR (pmol/ ml)	F Ex: 285nm En:325nm
250	623,6
125	361,6
62,5	199,0
31,25	103,6
15,32	53,25
0	1,137

6. Dosagem de Sódio

O volume urinário diário foi mensurado e coletado amostras de 24 horas para quantificar a concentração de sódio, durante 7 dias. Essas amostras foram armazenadas em ependorffs e guardadas refrigeradas até o final do experimento. Ao final de 7 dias, as concentrações de sódio foram quantificadas através do fotômetro de Chama (Instrumental Laboratories, modelo 943). A unidade de medida foi Eqg.

7. Análise Estatística

As comparações entre os grupos foram analisadas pela ANOVA, seguida pelo Teste de Fisher.

Todos os resultados foram expressos com média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Estabelecemos um valor de $P < 0,05$ para indicar a diferença entre os grupos. Entretanto alguns resultados apresentaram significância com $P < 0,01$ e $P < 0,001$, os quais estão devidamente indicados nos gráficos e na tabela.

RESULTADOS

Resultados

Na figura 1 não observamos diferença nos valores da ingestão de água dos grupos controle, castrado, desnervado e, castrado+desnervado. Embora, pudemos observar que a ingestão foi significativamente maior no grupo desnervado do que nos grupos castrado e, castrado+desnervado.

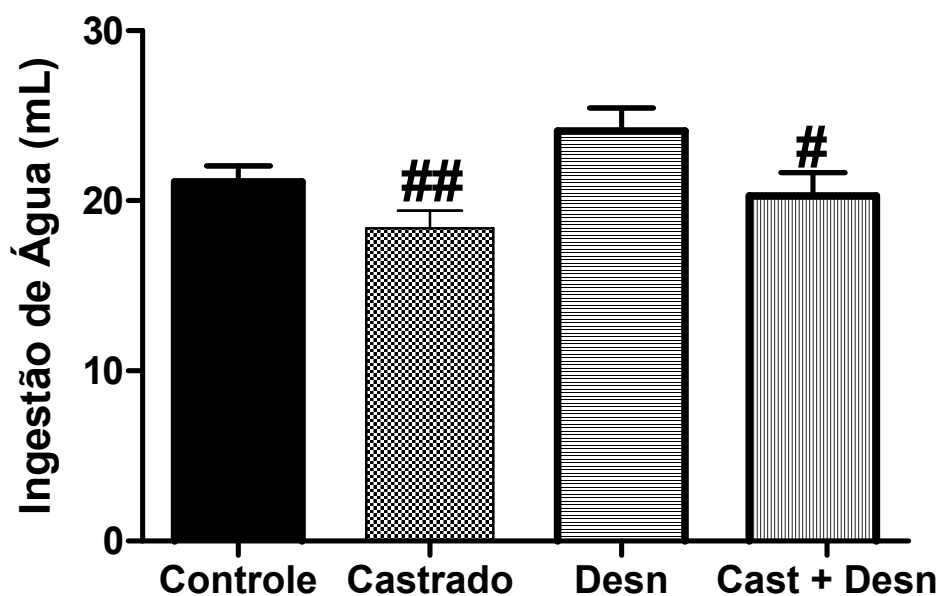


Figura 1: Valores da ingestão de água em fêmeas controle (n=8) , castradas (n=8), desnervadas (n=8) e, castradas+desnervadas (n=8). Os valores foram expressos como média±EPM.## p<0,01 e #p<0,05 quando comparado ao grupo desnervado.

Na figura 2, observamos que a castração não modificou o volume de água excretado, mas a desnervação o aumentou significativamente, em relação aos demais grupos, mostrando o papel do nervo simpático renal no controle do volume excretado. Porém, quando a desnervação foi associada a castração, a excreção foi reduzida a valores similares ao castrado e ao controle, elucidando a interação dos hormônios sexuais femininos com o nervo renal.

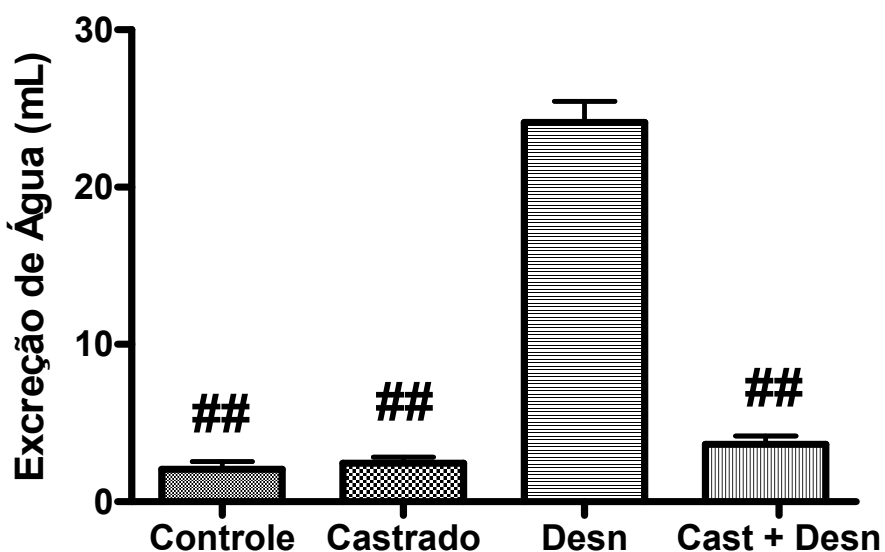


Figura 2: Valores da excreção de água em fêmeas controle (n=8) , castradas (n=8), desnervadas (n=8) e, castradas+desnervadas (n=8). Os valores foram expressos como média±EPM.## p<0,01 e #p<0,05 quando comparado ao grupo desnervado.

Na figura 3 observamos que a excreção de sódio foi significativamente maior no grupo castrado, quando comparado ao grupo controle, desnervado e castrado+desnervado. Esse aumento evidenciou o papel dos hormônios sexuais na regulação da natriurese.

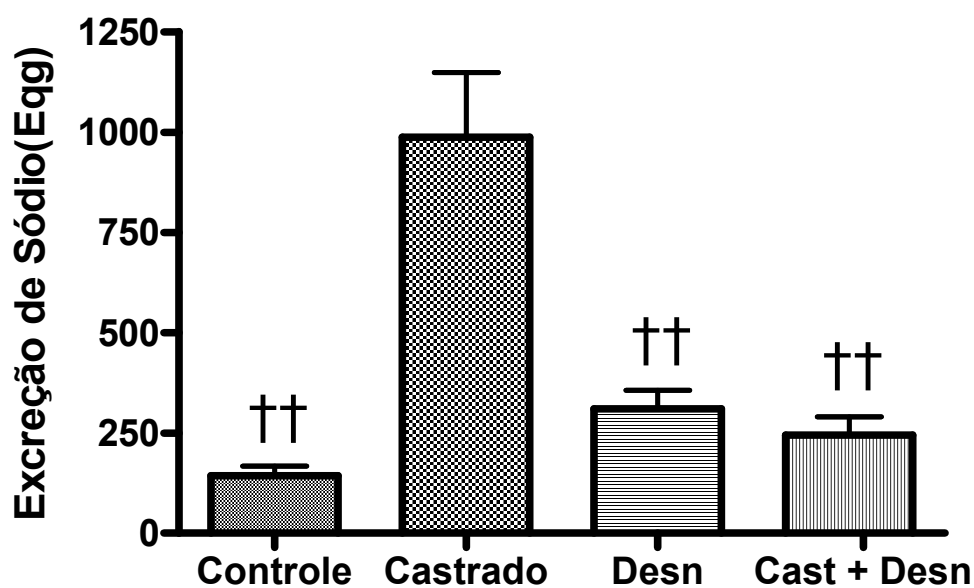


Figura 3: Valores da excreção de sódio em fêmeas controle (n=8), castradas (n=8), desnervadas (n=8) e, castradas+desnervadas (n=8). Os valores foram expressos como média±EPM. ††p<0,01 quando todos comparados ao grupo castrado.

Na figura 4 observamos que a concentração das catecolaminas renais foi menor nos grupos desnervado e castrado+desnervado, quando comparado ao grupo controle. Essa redução foi em média 70%, evidenciando a efetividade da desnervação renal. Além disso, encontramos um aumento da concentração das catecolaminas renais no grupo castrado, quando comparado ao grupo controle, desnervado e castrado+desnervado. Esse resultados também foram demonstrados na tabela 1.

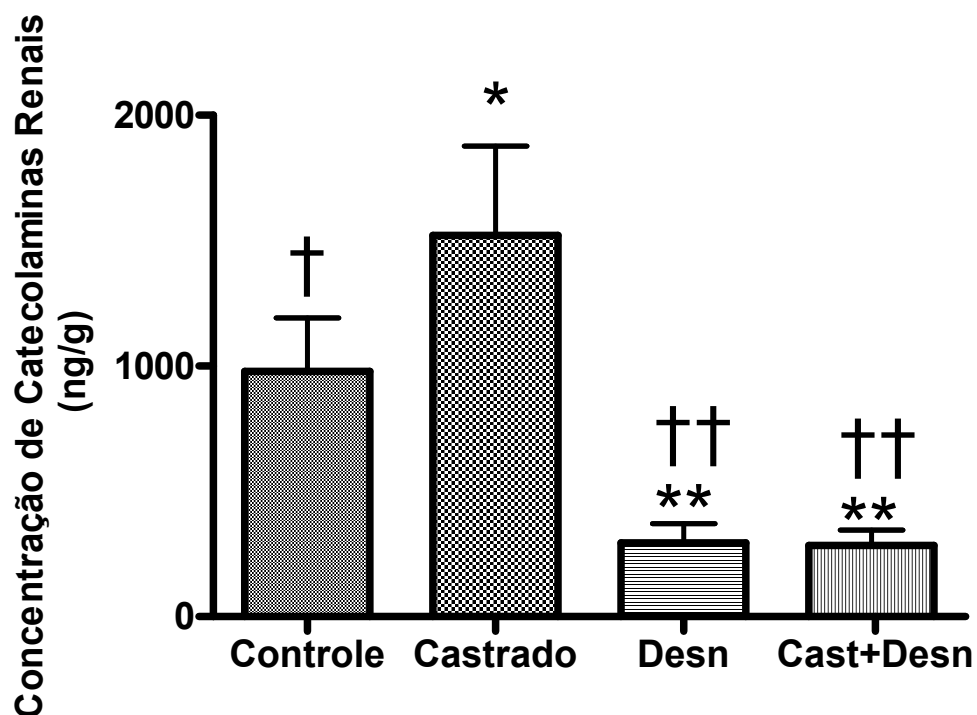


Figura 4: Valores da concentração das catecolaminas renais em fêmeas controle (n=13), castradas (n=11), desnervadas (n=7) e, castradas+desnervadas (n=9). Os valores foram expressos como média±EPM.** p<0,01 e *p<0,05 quando comparado ao grupo controle. ††p<0,01 quando comparado ao grupo castrado.

Tabela 1: Valores médios de catecolaminas renais de fêmeas controle, castradas, desnervadas e, castradas+desnervadas

Grupos	N	[NE] renal ng/g	Variação % da alteração de [NE] renal
Controle	13	979 ± 221†	100
Castrado	11	1521 ± 438*	+55
Desnervado	7	293 ± 78**††	-70
Cast+ Desnervado	9	284±62**††	-71

Valores expressos com média ±EPM. *p<0,05, **p<0,01 quando comparado ao grupo controle. ††p<0,01 e †p<0.05 quando comparado ao grupo castrado.

Tabela 2: Valores da relação entre peso dos rins direito (RD) e esquerdo (RE), dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) e, do útero(U) com peso final (PF), dos grupos controle, castrado, desnervado e, castrado+desnervado.

Grupos	Controle (n=8)	Castrado (n=8)	Desnervado (n=8)	Cast+Desn (n=8)
Relação RD/PF(mg/g)	2.9±0.1	2.8±0.2	3.0±0.1	3.1±0.2
Relação RE/PF(mg/g)	3.4±0.1	3.7±0.2	3.8±0.2	3.2±0.3
Relação VD/PF(mg/g)	0.6±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1
Relação VE/PF(mg/g)	1.9±0.1	1.7±0.1	1.7±0.1	1.9±0.1
Relação U/PF(mg/g)	1.8±0.1	0.5±0.1**	2.0±0.3	0.6±0.1##

Valores expressos como média ± EPM. **p<0,01 quando comparado ao grupo controle

.##p<0,01 quando comparado ao grupo desnervado.

Na tabela 2, observamos a relação do peso dos órgãos com o peso corporal e, verificamos uma redução na relação do peso uterino nos grupos castrados, comprovando a eficácia da castração. Já em relação aos rins e as câmaras cardíacas não notamos qualquer diferença entre os grupos estudados.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste estudo verificamos em ratas *Wistar* férteis e ovariectomizadas a participação dos hormônios sexuais femininos na ingestão espontânea de água e, na excreção urinária de água e sódio, bem como a contribuição do nervo simpático renal neste mecanismo. Nossa primeira observação foi quanto a ingestão de água, onde verificamos que a castração reduziu e a desnervação aumentou de forma significativa, uma em relação a outra, a sede dessas fêmeas. Contudo, não observamos diferença do grupo castrado, desnervado e castrado+desnervado, em relação ao grupo controle, resultados similares aos encontrados por DiBona & Sawin (1983), Kopp et al. (2003) e Jacob et al. (2003). Mostrando que há um envolvimento dos esteróides femininos e do nervo simpático renal na manutenção da ingestão de água nas fêmeas.

O grupo castrado mostrou uma ingestão espontânea menor que o grupo controle, porém não foi significativa, corroborando com nossos resultados o que foi demonstrado por Kisley et al. (1999) e Krause e cols. (2003) em que o consumo de água não teve diferença entre as fêmeas ovariectomizadas e as ovariectomizadas tratadas com benzoato de 17- β -estradiol. Estes resultados indicam que os hormônios sexuais femininos não participam diretamente do controle para o estímulo da ingestão espontânea de água e sim, modulando os estímulos do circuito neuronal da sede. Um fato que dá suporte a isso é que o consumo espontâneo de água varia durante o ciclo estral, com uma ingestão menor no dia do estro e, após a ovariectomia, a flutuação do consumo de água é abolida (Tarttelin & Gorski, 1971).

O estrogênio talvez seja um importante modificador do consumo espontâneo de água (Krause et al., 2003). Em 1999, Kisley et al. demonstraram que ao induzir a sede pela infusão de AII, este efeito era atenuado quando os animais eram tratados com estrogênio. Isso não ocorria com o tratamento com progesterona, mostrando que o estrogênio tem um efeito antidipsigênico, e a progesterona não. Ao combinar esses hormônios, o efeito do estrogênio não foi atenuado, isto é, o efeito antidipsigênico prevalecia.

Em outro estudo, realizado por Stachenfeld et al., (1998) foi observado que mulheres posmenopausadas com terapia estrogênica por 14 dias, não apresentaram diferença estatisticamente significativa no consumo espontâneo de água, após a infusão de solução salina hipertônica de 3%, ao serem comparadas ao grupo sem terapia estrogênica. Resultados similares foram observados em mulheres jovens em diferentes fases do ciclo menstrual e em outras que faziam uso de contraceptivos orais com estrogênio e progesterona, não tiveram modificação no balanço dos fluidos corporais, inclusive na ingestão hídrica (Stanchenfeld et al., 1999).

A influencia do estrogênio na redução do estímulo da sede e ingestão hídrica, parece ser mediado por mecanismos ativados no sistema nervoso central em que, segundo Krause et al., (2003) há uma inibição da ligação da AII aos seus receptores no OVLT, uma vez que foi observado que o estrogênio não inibe a síntese periférica de AII, após um tratamento estrogênico com a medição da concentração de AII sérica. Muitas investigações apontam para a interação entre o estrogênio e o SRA produzido no SNC, onde o estrogênio poderia modular a indução da sede causada pela AII (Fujisawa et al., 2001; Kisley et al., 1999), um fato que comprova isso é a presença de receptores AT_1 e de receptores de estrogênio no OSF (Kisley et al., 1999; Rosas-

Arellano, 1999; Simerly et al., 1990), em que o estrogênio estaria diminuindo a ligação e o número de receptores da AII no OSF (Simerly et al., 1990; Kisley et al., 1999), atenuando assim, a resposta dipsogênica induzida pela AII no OSF e no OPMn (núcleo pré-óptico médio) (Tanaka et al., 2003). Um outro dado relatado por Kisley et al. (1999) foi que o estrogênio poderia atenuar a responsividade do “circuito da sede” à AII, uma vez que foi observado no ciclo estral de ratas, no ciclo menstrual de mulheres e, ou no tratamento de reposição estrogênica, havia uma alteração na ingestão hídrica espontânea.

O circuito da sede é uma integração neuronal e humoral que geram os sinais que ocasionam a sede. Destacam-se os núcleos OVLT, sensível principalmente as alterações na osmolaridade plasmática, o OSF e o OPMn, que são afetados pelas concentrações de AII sistêmica e central. Esses três grupos de neurônios, presentes na região anterior do encéfalo, conectam-se através de sinapses que levam o estímulo até os centros integrativos superiores, para a resposta motora da sede. Há ainda o NPBL (núcleo parabraquial lateral), presente na região posterior, que recebe sinapses aferentes do NTS e da área postrema (AP), estimuladas pelos barorreceptores arteriais e cardiopulmonares, bem como os osmoceptores viscerais, conectando-se ao OPMn, para a integração dos sinais periféricos, com o circuito central (McKinley & Johnson, 2004).

Estes possíveis efeitos andipisiogênicos do estrogênio podem ser explicados através condutância iônica das membranas do OSF, diminuindo a possibilidade da propagação do potencial de ação para o estímulo da sede (Gu & Moss, 1996; Mermelstein et al., 1996), na alteração na sensibilidade dos neurotransmissores do circuito da sede (Wong et al., 1992), na regulação da atividade e/ou do número de receptores de AII no OSF (Kisley et al., 1999), na modulação da atividade do SRA central, na sensibilidade da AII no SNC (Tanaka et al., 1986) e nas vias sinápticas

angiotensinérgicas (Chung et al., 1988). Portanto, o estrogênio pode causar uma diminuição na expressão dos receptores AT₁ no SFO, explicando, pelo menos em parte, a diminuição do estímulo para sede .

A interação do estrogênio com SRAA é muito controversa, variando de acordo com: a metodologia utilizada, o órgão analisado, as fases do ciclo hormonal, as diferentes espécies e, a quantidade de sal na dieta. Além disso, não existe apenas o SRA sistêmico, mas vários SRA locais, tecidos-específicos, como o renal, cardíaco, cerebral, testicular (Dzau et al., 2001).

A interação do estrogênio com o SRA têm sido demonstrada em vários estudos (Olkers, 1996), em um deles castração foi capaz de aumentar a densidade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e a densidade dos receptores AT₁ nos núcleos OSF, NPV, OPMn e nos rins de fêmeas *Wistar* (Gallagher et al., 1999). Apesar de não haver uma modificação da ECA plasmática, houve uma redução na densidade da ECA pulmonar. O tratamento com o estrogênio aboliu o efeito da castração em todos os resultados. Ao avaliar a atividade da ECA em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, o tratamento com 17- β -estradiol por 18 a 20 dias, ocasionou uma diminuição significativa na expressão do RNAm da ECA nos rins, tanto na região córtex, quanto na medula renal, no pulmão e na aorta (Gallagher et al., 1999). Além disso, trabalhos realizados em nosso laboratório, mostraram que a ovariectomia aumentou a atividade da ECA plasmática e não alterou a atividade da ECA nas artérias coronarianas de ratos (Gonçalves et al., 2004). Contudo, no trabalho de Ahmed e cols. (2004) o uso de contraceptivos por mulheres jovens após uma infusão com AII, não parece estar associada com uma diminuição dos receptores AT₁ , já que houve um aumento no seu RNAm, se comparado aos da mulheres que não faziam uso dos contraceptivos. O uso

desses contraceptivos resulta em um dramático aumento na circulação dos componentes do SRAA, incluindo a AII (Kang et al., 2001). Portanto, os componentes do SRAA são regulados cooperativamente e por mecanismos compensatórios (Dean et al., 2005).

Portanto, muitos trabalhos elucidam o papel antidipsiogênico do estrogênio no SNC, mas nossos resultados não demonstraram esse efeito, provavelmente devido a um tempo pequeno de experimento. Contudo, isso foi comprovado por Verlander et al. (1998), demonstrando que em 8 semanas após a ovariectomia, as fêmeas castradas exibiram um consumo hídrico significativamente maior que as controle, mostrando que este mecanismo é tempo dependente.

Quando o rim é desnervado os efeitos preponderantes de retenção de sódio e liberação de renina são abolidos ou reduzidos. Neste estudo, verificamos que os animais desnervados apresentaram maior ingestão e excreção de água, que prova a importância do SNSR para o controle do balanço hidroeletrolítico. O nervo renal contribui significativamente para a regulação da atividade dos rins (DiBona, 1977; DiBona, 1982; Gottschalk, 1979; Kim et al., 1979). O aumento da atividade da eferência do nervo simpático renal (ENSR) resulta em aumento da resistência vascular renal (RVR), liberação de renina e retenção de sódio (Diz et al., 1982), podendo facilitar o desenvolvimento da hipertensão (Guyton e al., 1972). Há evidências que indicam que essas influencia neurais e renais na reabsorção de sódio são mediadas por adrenoreceptores localizados no espaço antiluminal do túbulo proximal e, possivelmente nos segmentos distais da parede do néfron (DiBona & Sawin, 1982).

O nervo simpático renal pode sofrer um estímulo de baixa (0.6Hz), de média (1.2Hz) e de alta (2.4Hz) frequência, ocasionando mudanças diferentes nas funções renais (DiBona & Sawin, 2004). A baixa frequência resulta em aumento da

atividade da renina plasmática (ARP) e diminuição da excreção do sódio urinário, sem alterações no fluxo sanguíneo renal (FSR) e frequência de filtração glomerular (FFG). Já a média e alta frequência, diminuem a excreção de sódio, aumentam ainda mais a ARP e, também diminuem a FFG e o FSR. Contudo, outros autores (DiBona & Kopp, 1997; Juste et al., 1998; DiBona & Sawin, 2004;) dividem este estímulo, em baixa frequência ($\leq 1.0\text{Hz}$), chamado de subvasoconstritor, que não alteram o FSR e FFG, apenas diminuem a excreção de sódio urinário e aumentam inicialmente a liberação de renina. E, alta frequência ($>1.0\text{Hz}$), o vasoconstritor, alterando os parâmetros anteriores e diminuindo a hemodinâmica renal. Em ratos, a atividade basal do NSR é baixa, portanto, apresenta uma baixa reabsorção de sal e água (DiBona & Kopp, 1997).

A importância da participação do nervo simpático renal no controle da excreção de sal e água foi demonstrada por nossos resultados, quando observamos um aumento de 89% na excreção de água no grupo desnervado. Estes resultados corroboram os estudos de Kline & Mercer (1980) e Moss & Harrigton (1981) demonstraram que a elevada excreção urinária de sódio, era atenuada com o retorno da resposta vascular renal nos ratos desnervados, em cerca de 14 dias após a cirurgia, devido à reinervação. A recuperação da resposta ao nervo renal, ocorre em paralelo, com o aumento da concentração de noradrenalina (NOR) renal. Embora, os resultados sejam conflitantes, já que em rins transplantados de humanos, passam a conservar sódio em cerca de 38 e/ou 46 dias após a cirurgia (Blaufox et al., 1969). Outros resultados, mostram que a reinervação ocorre com cerca de 16-17 dias em ratos (DiBona & Sawin, 1983). Por isso consideramos a reinervação renal ocorrendo em cerca de 15 dias e, adotamos um protocolo que durasse esse período.

A osmolaridade é a propriedade das soluções que determina a concentração efetiva total de todas as substâncias dissolvidas (solutos). A osmolaridade média dos fluidos corporais está em torno de 290-300 mOsm ou aproximadamente 1.8×10^{20} solutos/mL (Toney et al., 2003). Quaisquer alterações na osmolaridade pode ocasionar respostas neurohumorais complexas na tentativa manter o equilíbrio cardiovascular e dos fluidos corporais. Há consenso que as alterações na osmolaridade são percebidas pelo SNC, na parte anterior da lâmina terminal (McKinley et al., 1992a) e possivelmente pelos neurônios magnocelulares (NMCs) do hipotálamo (Bourques & Olict, 1997).

A sede é um subtipo de estímulo que leva os humanos e outros animais da ingestão espontânea de água, com o objetivo da manutenção dos fluidos corporais. Pequenas alterações no volume dos fluidos extracelulares e intracelulares, ocasionam sinais neuronais que levam a sede. Um aumento de 1-2% na osmolaridade sérica ou a desidratação intracelular ativa os neurônios dos osmoreceptores, localizados no OVLT e no OSF, levando a ingestão de água. Os OVLT e OSF estão presentes na região da parede anterior do terceiro ventrículo (3V), conhecido também como lâmina terminal, cuja barreira hemato-encefálica está ausente (McKinley & Johnson, 2004). Em particular, a parte dorsal do OVLT e a parte periférica do OSF são osmossensíveis no rato. O OPMn (órgão pré-óptico médio) está situado na parte longitudinal entre estes dois grupos de neurônios e integra a região do AV3V e, é fortemente ativada por estímulos osmóticos. Segundo Johnson et al., (1996) lesões na OPMn diminuem a geração da sede pelos neurônios OSF e OVLT. Além disso, a injeção intracerebrovascular de antagonista de AII, nos núcleos OPMn, atenua o estímulo para a sede, confirmando assim, a presença de vias angiotensinérgicas e de receptores de AT_1

nesses neurônios Parece claro que a lâmina terminal é a região cerebral em que as alterações na osmolaridade, na concentração de AII são percebidas e que acabam ocasionando a sede. Outras projeções de uma área do hipotálamo lateral, como o NPV o núcleo periaquedutal também estão envolvidas na geração da sede.

A ativação do SNS contribui para o aumento do tônus vascular, do retorno venoso, da frequência cardíaca, da contractilidade e da reabsorção de sódio e água, por vias eferentes como a do nervo simpático renal, que ativando a liberação de renina das células granulares do aparelho JG, leva a um aumento dos níveis circulantes de AII. Ou ainda por mecanismos intrarenais, como os barorreceptores renais, que levam a um aumento na liberação de renina, com diminuição da pressão de perfusão renal e, conseqüentemente AII. Esse aumento circulante de AII, ativa os receptores do OSF e as vias angiotensinérgicas, relacionadas com a geração do estímulo para a sede (McKinley & Johnson, 2004).

A administração de renina e AII sistêmica geram um forte estímulo para a sede (Johnson et al., 1996). Isso foi demonstrado em muitos mamíferos, como ratos, cães, cabras, ovelhas e humanos. Esse efeito dipsiogênico é maior ainda, quando a AII é administrada intracerebral, já que estimula os neurônios da lâmina terminal, como os OSF e MnPO, e ativa as vias sinápticas angiotensinérgicas (Johnson & Thunhorst, 1997).

A regulação homeostática da ingestão espontânea de água no SNC é multifatorial, merecendo destaque os sinais osmóticos, iônicos, hormonais, os circuitos neuronais convergentes e integrativos, bem como os diferentes estímulos para cada um deles (Tanaka et al., 2003). Portanto, mesmo que muitos trabalhos mostrem que o estrogênio iniba a sede, nós não encontramos isso em nossos resultados, talvez por um

tempo pequeno de experimento, mostrando que a ingestão hídrica é parcialmente dependente dos hormônios sexuais femininos em fêmeas férteis. A participação do nervo renal está relacionada com o balanço de água e sal renal, bem evidenciado em nossos resultados, elucidando, que a ingestão hídrica é dependente da integridade do nervo renal.

Nossos resultados mostraram que além de ingerirem mais água, as ratas desnervadas apresentaram uma maior excreção de água se comparadas aos demais grupos. Comprovando o envolvimento do sistema nervoso simpático renal no controle da excreção de água nesses animais. A ovariectomia, conseqüente ausência do estrogênio não alterou seu padrão de resposta. Parece que, neste caso, os hormônios sexuais femininos, não modulam diretamente, a excreção de água, pelo contrário, estariam aumentando a retenção de água e de sal, como mostrado nos resultados similares aos nossos verificados por Brooks et al., (2001) e Stachenfel et al. (2005).

A retenção de água corporal é comum em estados com altas concentrações de estrogênio, como imediatamente precedendo a ovulação (Veille et al., 1986), durante a gravidez (Davison et al., 1984) e com o uso de contraceptivos, com o estrogênio como preponderante (Blahd et al., 1974; Pechere-Bertschi et al., 2002). Essa retenção de fluidos corporais se deve pelo menos em parte, a um aumento na estimulação osmótica do HAD, o primeiro modulador da reabsorção renal de água. Estudos de Patch-clamp usando neurônios localizados no núcleo supraóptico (NSO) ratos demonstraram que estes neurônios respectivamente, despolarizam e hiperpolarizam via aumento e diminuição da osmolaridade extracelular e, que essas respostas resultam de mudanças na atividade de canais catiônicos mecanossensíveis (Bourque et al., 1994). Essas pequenas mudanças na osmolaridade plasmática, ocasionam mudanças rápidas no

estímulo para a transcrição de HAD no NSO e NPV, sugerindo que o estoque de HAD seja liberado para a circulação sangüínea e, rapidamente repostado por novas sínteses (Arima et al., 1999). O HAD é sintetizado pelos corpos celulares dos neurônios específicos, núcleos supraóticos e paraventricular, do hipotálamo anterior e, seus axônios, se projetam para áreas da hipófise posterior, cujo estoque e a liberação do HAD ocorrem pela a estimulação dos osmoceptores centrais, por alterações na osmolaridade plasmática (Stachenfeld et al., 1998).

A administração exógena de estrogênio em mulheres menopausadas (Forsling et al., 1982), demonstraram uma redução no volume urinário e na freqüência de excreção de sódio, indicando uma grande retenção de água e de sódio renal (Stachenfeld et al., 1998).. Apesar de alguns estudos não demonstrarem diferenças na concentração basal do HAD ao longo do ciclo menstrual (Vokes et al., 1988) ou entre homem e mulher (Zerbe et al., 1991). Stachenfeld et al., (2002) observaram uma grande retenção de água e sal, durante a administração do estrogênio, o qual está relacionada com mecanismos intrarenais. Isso também foi observado em nossos resultados, em que o grupo castrado, na ausência do estrogênio, apresentou uma elevada excreção de sal, em relação ao grupo controle, apresentando uma baixa natriurese.

Talvez a explicação disso seja que a ação antidiurética do HAD tenha atingido o seu nível máximo, apesar de uma baixa concentração urinária. Contudo, pouco se sabe da(s) influência(s) do estrogênio nos rins humanos. Alguns trabalhos têm sugerido que o estrogênio atenua a ação antidiurética do HAD no rato (Christie & Shaver, 1974) e outros, que module a ação do HAD no ducto coletor ao nível dos receptores (Stumpf et al., 1980), ou interfira na sensibilidade ao HAD ou em sua ação no

rim (Wang et al., 1995). Essa modulação ocorre provavelmente, ao nível de receptores de HAD (Stumpf et al., 1980). Stachenfeld et al. (2003) utilizando mulheres jovens e tratadas com GnRHa, antagonista do hormônio gonadotrófico, que mimetiza a menopausa, verificaram que o tratamento com estrogênio, havia aumentado a reabsorção de sódio no túbulo proximal. O clearance do HAD foi mais rápido, após sua infusão, só que não foi afetado pelo tratamento com o estrogênio, sugerindo que o estrogênio não afete a sensibilidade renal ao HAD. Estudos animais têm sugerido que o estrogênio não afete diretamente no metabolismo do HAD (Crofton et al., 1986; Wang et al., 1995), mas altere a ligação do HAD com proteínas (De Feo, 1996), certamente ocasionando um tipo de impacto em seu metabolismo. Além do mais, o HAD sofre clearance nos rins via seus receptores específicos, e que são inibidos pelos antagonistas de receptores V₂ (Keeler et al., 1991) e, esse receptor é sensível ao estrogênio (Wang et al., 1993; Dubey & Jackson, 2001a). Portanto, o efeito estrogênico na modulação do HAD, pode ocorrer a nível central.

Um fato que auxiliaria nesse efeito, seria é a presença dos receptores de estrogênio em células produtoras de HAD no camundongo (Sar et al., 1980), no rato (Li et al., 1997) e no núcleo NSO humano (Ishunina et al., 2000; Ishunina et al., 1999). Além do mais, a estimulação osmótica nos neurônios vassopressinérgicos foi maior em fatias cerebrais contendo o NOS, de ratas ovariectomizadas, após a administração do estrogênio (Barron et al., 1986). Portanto, parece que o estrogênio regula osmoticamente a liberação do HAD no SNC, já que pode atravessar a barreira hematoencefálica se ligando às regiões moduladoras do AVP no hipotálamo. Contudo, a ação do estrogênio na liberação do HAD no hipotálamo pode ser influenciada, pela ativação de um dos subtipos de receptores de estrogênio, o receptor de estrogênio beta (RE β) e o receptor de

estrogênio alfa ($RE\alpha$), que já foram identificados nos neurônios produtores de HAD, com o NSO (Ishunina et al., 2000). Em humanos, $RE\beta$ inibe e, $RE\alpha$ estimula a atividade neuronal dos neurônios produtores e libertadores de HAD como o NSO (Paech et al., 1997). Mulheres jovens expressam preferencialmente os $RE\beta$ nesses neurônios (Ishunina et al., 2000), contudo, os $RE\beta$ possuem uma menor afinidade pelo 17 β -estradiol que os $RE\alpha$ (Kuiper et al., 1997). O estrogênio poderia modular o metabolismo do HAD via seus receptores.

Os mecanismos responsáveis pela manutenção do volume urinário nas fêmeas seriam o SRA e o nervo renal e, ambos poderiam ser influenciados pelo estrogênio. Ao retirarmos a influência estrogênica, no grupo castrado, reduzimos a inibição do estrogênio sob o SRA, o que poderia explicar a manutenção da excreção de água similar ao controle. Além da reabsorção causada pela presença do nervo renal intacto, aliado ao SRA, que é um de seus efetadores. Liu & Cogan, (1988) demonstraram que o nervo renal intacto, auxiliado pelo SRAA é responsável por 75% reabsorção tubular proximal de água e cloreto de sódio no túbulo proximal. Elucidando a manutenção do volume urinário similar no grupo controle, explicando o grande volume excretado pelo grupo desnervado. Ao retirarmos a atenuação estrogênica sobre o metabolismo do HAD, ele poderia manter em equilíbrio os fluidos corporais, como observado no nosso grupo castrado.

Muitos estudos têm demonstrado que a liberação do HAD é reduzida quando os níveis de estrogênio são elevados (Spruce et al., 1985; Trigosso et al., 1996; Stachenfeld et al., 1998; Stachenfeld et al., 1999; Calzone et al., 2001; Stachenfeld & Keefe, 2002). Isso poderia explicar o baixo volume urinário no grupo castrado, apesar de

uma elevada excreção de sódio, em que ao retirar o efeito inibitório estrogênico sobre o HAD, ele atuaria no túbulo renais mantendo o fluxo urinário em equilíbrio.

O efeito do estrogênio no metabolismo do HAD no rim é difícil de ser analisado isoladamente em mulheres jovens, já que não há fase do ciclo menstrual normal que não haja uma elevação dos níveis séricos de estrogênio, sem os de progesterona (Myles & Fundes, 1996; Stachenfeld et al., 1998; Stachenfeld et al., 1999). Embora, Calzone et al. (2001), demonstrem que a progesterona não influencie na regulação osmótica do HAD.

Muitos estudos examinam os efeitos dos hormônios esteróides na estimulação osmótica do ADH. A gonadectomia previne o aumento da liberação do RNAm do HAD no hipotálamo em resposta a um aumento da osmolaridade, tanto em machos quanto em fêmeas (Crowley & Amico, 1993; O'Keefe et al., 1995). Embora, outros trabalhos mostraram que a castração de machos, aumente a expressão do RNAm do HAD em resposta a um estímulo osmótico (Swenson & Saldek, 1997). Após o tratamento com a testosterona não houve alteração nos níveis de HAD. Portanto, a testosterona parece não influenciar diretamente na regulação do HAD. O tratamento com estrogênio aboliu a resposta do estímulo osmótico à expressão do RNAm desse hormônio. A despolarização com KCl ocorre diretamente nos terminais dos axônios dos neurônios neurohipofisários, independente do tratamento com estrogênio ou testosterona, não afetando a liberação do HAD. Portanto, o efeito inibitório do estrogênio talvez ocorra por uma ação na membrana plasmática dos neurônios magnocelulares, já que a interação do estrogênio com PSB (proteína de soro bovino), não atravessando a membrana, continuou inibindo a resposta do HAD ao estímulo osmótico (Ke & Ramirez, 1990). Os receptores do hormônios esteróides não foram

encontrados nos NMCs (Axelson et al., 1990; Herbison, 1994). Portanto, um efeito genômico clássico seria pouco provável. Contudo, o efeito genômico poderia ser em outro local do circuito osmótico, como por exemplo em um grupo neuronal da lâmina terminal, como o OVLT (Johnson & Gross, 1993), envolvido na transmissão da alterações na osmolaridade para o NSO (McKinley et al., 2004).

Um fato de comprova isso é a presença dos receptores de estrogênio e androgênio nas membranas dos NSO (Sar & Stumpf, 1981). Assim, os hormônios esteróides podem inibir a liberação hormonal com ações não-genômicas nos NMCs ou, em outros neurônios do circuito neuronal (Swenson & Saldek, 1997). Já que no hipotálamo de primatas há uma maior quantidade do RNAm do RE β (Register et al., 1998). No NSO do rato, foi encontrado o RNAm do RE β , mas não RNA m do RE α (Shughrue et al., 1997). Além de que nos neurônios do HAD, demonstraram uma grande quantidade de RNAm e RE β (Hrabovszby et al., 1998; Alves et al., 1998). Eles podem agir diretamente nos neurônios do HAD, alterando sua permeabilidade iônica, como por exemplo o estrogênio inibe diretamente a liberação do GnRH, abrindo canais de potássio (Lagrange et al., 1995).

Recentes trabalhos, mostram um efeito não-genômico do estrogênio em neurônios hipotalâmicos, agindo sobre receptores acoplados a proteínas Gq, que por segundos mensageiros como IP₃, DAG, ativam a PKA que fosforila canais de potássio, como os canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância e os retificadores de influxo (Kelly et al., 2003; Qiu et al., 2003), ativando-os e levando a hiperpolarização, diminuindo a possibilidade de propagação de um novo estímulo, oriundo de alterações osmóticas. Além disso, podem alterar a liberação dos neurotransmissores, como o glutamato e o GABA (Swenson & Saldek, 1997). Ou aumentam o tônus GABAérgico na

área pré-óptica do hipotálamo e na imenência média, potencializando o efeito inibitório. De maneira que o estrogênio aumenta esse tônus nos NMCs e, esse tônus inibitório pode ignorar a excitação dos estímulos osmóticos e/ ou a estimulação dos N-metil-d-aspartado (NMDA) (Swenson et al., 1998).

Os aminoácidos excitatórios, glutamato e aspartato, são os mediadores primários da transmissão excitatória. O SNC e possuem um papel importante na regulação neuroendócrina (Renaud & Bourque, 1991). Seus tipos de receptores são N-metil-d-Aspartato (NMDA) e não-NMDA localizados em grande abundância no hipotálamo, especialmente do NSO (Hu & Bourque, 1991). A administração de um antagonista não-específico desses receptores, inibiu a liberação de HAD estimulada por um aumento na osmolaridade (Sladek et al., 1995). Mostrando, que os aminoácidos excitatórios participam da regulação osmótica para a liberação do HAD. Esses resultados foram similares ao trabalho de Swenson et al. (1998), que ao aplicar um antagonista não-específico, observou um resultado idêntico com a aplicação do estrogênio, mostrando que, o efeito inibitório do estrogênio no estímulo osmótico para liberação do HAD, é mediado pelos receptores de NMDA.

Ao avaliar a resposta dos receptores de NMDA, em ratos tratados com estrogênio ligados a proteína de soro bovino (PSB), não houve inibição para a liberação do HAD no hipotálamo, mostrando que talvez os mecanismos de membrana não sofreram efeitos inibitórios do estrogênio nos receptores de NMDA. A administração do NMDA estimulou a liberação do HAD, mas não na presença da genisteína, um fitoestrogênio com alta afinidade pelo RE β . E ao utilizar um agonista RE α e antagonista de RE β , a liberação do HAD pelos receptores NMDA não foi abolida. Mostrando que o efeito inibitório do estrogênio na liberação do HAD nos receptores de NMDA (RN) é

mediada pelo RE β (Somponpun & Saldek, 2002). Os receptores de NMDA possuem subunidades (SRN) funcionais, isto é SNR1 e SNR2, que são reguladas nos NMCs por estímulos osmóticos (Somponpun & Saldek, 2003). Os NSOs expressam as SNR1, SNR2B, SNR2C e SNR2D (Al-Ghoul et al., 1997). O mecanismo pelo qual o estrogênio poderia modular os receptores de NMDA, seria pela inibição da síntese das SRN, por alterações nos processos transcricionais das subunidades do receptor de NMDA, ao se ligar às regiões promotoras de seus genes (Somponpun & Saldek, 2003), ou ainda influenciando nos processos e complexos pós-transcricionais dessas subunidades, comprovando esses efeito inibitório (Safe, 2001). Em outros trabalhos, a diminuição dos RE β no hipotálamo, causa aumento da liberação do HAD durante estados de hipovolemia (Somponpun & Saldek, 2004). Outros trabalhos a ativação do RE α teria um efeito de diminuir essa inibição (Ishunina et al., 1999; Ishunina & Swaab, 1999). Embora estudos mostrem que o estrogênio iniba a liberação do HAD, não encontramos uma maior excreção de água no grupo castrado, quando relacionado ao controle. Além de que não podemos esquecer da influência do nervo renal na modulação dos fluidos corporais, para a manutenção do equilíbrio hídrico.

Os hormônios sexuais femininos, em especial o estrogênio, possuem efeitos hemodinâmicos, metabólicos e vasculares que podem explicar a cardioproteção observada na pré-menopausa (Dantas et al., 1999), contudo um mecanismo com que o estrogênio e a progesterona possam prejudicar a homeostase do sistema cardiovascular é na regulação dos fluidos e no balanço do sódio corporal (Stachenfel et al. 2005), que são regulados, principalmente, pelos rins, através das influências de sua inervação simpática.

Muitos trabalhos tem estudado a reposta a desnervação renal *versus* a inervação renal em cães avaliando as mudanças no volume dos fluidos corporais (Sadowski et al, 1980). Esses resultados tem produzido alguns conflitos a respeito do papel do nervo renal na reposta a mudanças agudas no volume dos fluidos do organismo (hemorragia, expansão de volume) em estados conscientes (Lifschitz, 1978). Ao comparar ratos da raça Sprague-Dawley com desnervação renal e intactos, com 15 dias de experimento, DiBona & Sawin (1983) observaram que a fração de excreção e o volume urinário foram similares, apesar do animais desnervados excretaram mais água que o controles.

Kopp & DiBona (1987) , mostraram que ativação da eferência do nervo simpático renal causa retenção de sódio e água, via secreção de renina, aumentando a reabsorção tubular de sal e água, diminuindo a FFG e o FSR. A retenção de sódio causada pela ativação o NSR, é um dos mecanismos mais importantes de ação renal, potencialmente envolvidos na reabsorção tubular renal de água e de sódio (DiBona, 1985; Kopp & DiBona, 1987), como observado no nosso grupo controle. Além do mais, a carga simpática, indiretamente, determina a retenção de sódio e água, via estimulação do SRAA (Ammons, 1982). Contudo, em animais normais, atividade basal no NSR é baixa, portanto, apresenta uma baixa reabsorção de água e sal (DiBona & Kopp, 1997). Sob a circunstância de desnervação renal, a reposta dos rins consiste em aumentar a excreção urinária de sódio e de água e, diminuir a secreção de renina, sem alteração na FFG e no FSR. Essas repostas sugerem que, que em condições basais, há um tônus neural simpático renal, que aumenta a reabsorção tubular de sódio a secreção de renina, mas que não há um tônus neural simpático renal vasoconstritor (DiBona & Sawin, 2004). Isso poderia explicar o maior volume urinário que observamos no grupo

desnervado. Contudo, no trabalho de Liu & Cogan (1988), foi mostrado que após a desnervação renal, a AII foi capaz de aumentar a reabsorção tubular proximal de água e NaCl em cerca de 25%, resultado causado por ações diretas da AII nos receptores localizados no túbulo proximal. Essa ação da AII poderia explicar nosso resultado do grupo castrado+desnervado, em que observamos baixos níveis excretados de água e de sal. Auxiliado isso com a castração, em que há a retirada da inibição estrogênica sobre o SRAA e AII (Olkers, 1996), possibilitaria uma ação mais eficiente da AII na reabsorção dos fluidos corporais a valores similares ao controle.

A desnervação renal unilateral em cães resultou em diurese e natriurese, quando comparado com o rim intacto, contudo não apresentou mudanças no FSR, na FFG e na pressão arterial (Barger et al., 1959). No trabalho de Jacob et al.(2003) a excreção urinária de água em ratos com desnervação renal e controles não foi diferente, mesmo quando os ratos foram tratados com diferentes dietas de sal. A desnervação renal unilateral em ratos causam uma elevação na excreção de sódio, quando comparados com os rins contralaterais intactos (Miki et al, 1989a). Os rins intactos apresentaram uma antinatriurese, após aumento da atividade do NSR, mostrando uma menor excreção de sódio. Já com a desnervação de ambos os rins, a antinatriurese foi abolida (Miki et al, 1989b). Nossos resultados mostram uma elevada diurese no grupo desnervado, com a natriurese similar ao controle. Isto poderia indicar que o simpático renal estaria controlando a diurese e, que a natriurese não foi tão intensa, devido a ação da AII, promovendo a reabsorção de sódio.

Esses efeitos dissociados na atividade do SNSR nos rins, como os observados neste trabalho, em que o grupo desnervado mostrou uma diurese aumentada, com uma natriurese similar ao controle, pode ser explicado pelos diferentes níveis de

estimulação da eferência simpática renal, de modo que certos estudos indicam que a baixa frequência de estimulação não altera na hemodinâmica renal (DiBona & Kopp, 1997; Johns, 2002; DiBona & Sawin, 2004) devido a autoregulação renal.

A autoregulação do FSR, em condições normais, é afetada de forma diferente pela intensidade de estimulação do nervo simpático renal. Ela pode ser subvasoconstritora e a vasoconstritora (DiBona, 1988; Persson et al., 1990). A primeira afeta pouco a autoregulação, mas a intensidade vasoconstritora do NSR, diminui o FSR em cerca de 20%, resultando em progressiva elevação do limiar de autoregulação, isto é, a diminuição da pressão arterial renal (PAR), em paralelo com a redução do FSR. O FSR basal e a dinâmica de autoregulação do FSR, não são afetadas pela remoção do SNSR via desnervação renal ou bloqueio ganglionar com hexametonium (Abu-Amarah et al., 1998; Just et al., 1998; Osborn et al., 1981). Estudos fisiológicos realizados *in vitro* mostram que a autoregulação do FSR é ajustada momento-a-momento, de acordo com as oscilações da pressão arterial renal, necessárias para manter o FSR constante. Essa espontânea ou dinâmica autoregulação do FSR estende-se pelas variações de frequência da pressão de perfusão renal (PAR) (DiBona & Sawin, 2004).

Estudos em cães normais e ratos indicam que não há alteração na autoregulação do FSR, após a remoção do ANSR, via desnervação renal ou bloqueio com hexametonium (Abu-Amarah et al., 1998; Just et al., 1998; Osborn et al., 1981), mas a situação é diferente em coelhos. A desnervação renal resultou no aumento do FSR em 42% (Malpas & Evans, 1998) e 55% (Malpas et al., 1998), sugerindo que o nível basal da ASNR seja maior nesses animais, que em cães e ratos. A desnervação renal aumentou o FSR renal em ratos com doença cardíaca e SHR, mas não o alterou, em ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* (DiBona & Sawin, 2004).

A atividade do nervo simpático renal talvez seja um dos maiores determinante do volume dos fluidos extracelulares e da pressão sangüínea. Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* elucidam direta e indiretamente o papel do sistema adrenérgico na regulação do FSR e FFG (DiBona & Kopp, 1997; Malpas & Leonard, 2000). A presença dos receptores adrenérgicos tem sido demonstrada em muitos segmentos do néfron, incluindo as células do ducto coletor medular interno (Garg, 1992; DiBona & Kopp, 1997), que podem ser acompanhadas por uma estímulo direto da inervação. Assim os fatores neurais liberados pelos terminais dos nervos simpáticos nos fluidos intersticiais e nos rins, como as catecolaminas, que podem também ser originados da circulação, possuem um importante papel modulador no transporte hidroeletrolítico no ducto coletor.

Estudos de cultura celular, mostram a presença dos receptores β -adrenérgicos e α_2 -adrenérgicos em membranas de células do ducto coletor de ratos, de coelhos e de humanos (Yasuda et al., 1991; Edwards et al., 1992; Yasuda & Jeffries, 1998). Outros trabalhos elucidam que agonistas dos β -adrenérgicos ativam a produção intracelular de AMPc, via estimulação de uma proteína Gs em células do ducto coletor medular interno de ratos. Já os agonistas α_2 -adrenérgicos estão acoplados a uma proteína Gi e, sua estimulação prejudica a formação do AMPc (Jeffries & Pettinger, 1989; Edwards et al., 1992; Rouch & Kudo, 1996; Yasuda et al., 1996; Yasuda et al., 1997).

A interação entre o sistema adrenérgico e a regulação hidroeletrolítica no ducto coletor é muito complexa, devido as interações do nervo renal, com os outros hormônios circulantes, os efetores do sistema renal, a expressão e a regulação dos receptores adrenérgicos. Além das diferentes capacidades de ligação dos hormônios adrenérgicos nos receptores alfa e beta. Geralmente, a epinefrina e norepinefrina

induzem a antinatriurese em animais intactos, com a redução do FSR, da FFG e aumentando a fração de reabsorção de solutos nos segmentos dos túbulos proximais e coletores renais (Wallace et al., 2004).

Embora o grupo castrado tenha apresentado uma menor ingestão de água e uma diurese similar ao grupo controle, foi o que demonstrou a maior excreção de sódio, na ordem de 76% se comparado aos demais grupos, corroborado por uma maior natriurese demonstrado por (Stachenfeld et al., 1998; Verlander et al., 1998; Stachenfeld et al., 2005). Recentemente, trabalhos têm mostrado que os hormônios sexuais femininos regulam as expressões dos transportadores em diferentes tecidos corporais. No pulmão, por exemplo, o estrogênio combinado com a progesterona levaram a um aumento na expressão dos canais de sódio e nos canais de cloreto (Johannesson et al., 2000). Nas células dos rins de cães da raça *Madin-Darby*, o tratamento com estrogênio, aumentou a expressão do RNAm dos co-transportadores de sódio/ sulfatos (Lee et al., 2000). Assim, os hormônios sexuais femininos também exercem efeitos no transporte iônico através das células.

O canal de sódio epitelial amiloride-sensível (CNaE) está localizado principalmente nas células do túbulo convoluto distal, ducto coletor e ducto coletor cortical (DCC) nos rins dos mamíferos (Schmitt et al., 1999; Biner et al., 2002). Estudos mostram que a atividade deste canal é um fator limitante para a reabsorção de sódio no DCC de coelhos (Petty et al., 1981). Anormalidades que aumentam atividade do CNaE, levam aumento na recaptção de sódio, retenção de fluidos e hipertensão, em geral, a síndrome de Liddle (Shimkes et al., 1994), ou a diminuição na atividade do canal, resulta em perda de sal e hipotensão, geralmente a pseudohipoaldosteronemia tipo I (Chang et al., 1996). O transporte de sódio é dependente do número de CNaE

localizados na membrana epitelial e a frequência com que o sódio é transportado por eles. O canal de ENaC é composto por três subunidades α , β e γ (Canessa et al., 1994) e a abundância do RNAm dessas subunidades é um importante fator determinante da atividade do canal. A aldosterona é modulador do RNAm e das proteínas da α CNaE, mas não das outras subunidades no rim de ratos (Masilamani et al., 1999; Stokes et al., 1998). Gambling e cols. (2004) observaram que não havia diferença na expressão das três subunidades α , β e γ do CNaE em ratas *Wistar* de ambos sexos ao nascer, contudo, após 10 e 16 semanas de idade houve um aumento na expressão das três subunidades na fêmeas, ao serem comparadas aos machos. Essa diferença na expressão das subunidades do CNaE foi abolida após à ovariectomia, sugerindo que os hormônios sexuais femininos modulariam a expressão desses canais nos rins das ratas. E, conseqüentemente também a reabsorção de sódio nos segmentos tubulares renais. Essa modulação estrogênica explicaria a maior excreção de sódio observado no grupo castrado, já que essa ausência hormonal diminuiria a quantidade desses canais e, conseqüentemente a reabsorção de sódio, nos rins desses animais.

Outro íon importante para a regulação dos fluidos corporais é o cloreto, um ânion predominante do ultrafiltrado glomerular e reabsorvido ao longo do néfron por mecanismos transepiteliais ou paracelulares (Aronson & Giebisch, 1997). O transporte transcelular de cloreto envolve muitas proteínas de membrana, incluindo canais de cloreto expressos ao longo dos túbulos renais (Morales et al., 1996; Uchida, 2000). Estudos prévios, elucidam que o canal de cloreto, ClC-2, é membro da abundante família dos canais de cloreto e, foi isolado originalmente no coração e cérebro de rato, além de ser expresso em células epiteliais adultas, incluindo as de rim. Como possui

uma expressão elevada no rim, esse canal de cloreto pode ter um importante papel na reabsorção de cloreto ao longo do néfron (Thiemann et al., 1992).

Nascimento e cols. (2003) utilizando os rins de ratas *Wistar*, mostraram que a ovariectomia ocasionou uma redução na ordem de 28% na expressão do RNAm do ClC-2, quando comparada ao grupo controle. A castração reduziu a expressão dos ClC-2 em 42% e 52%, túbulo convoluto proximal (TCP) e no túbulo reto proximal (TRP), respectivamente. Quando foi realizado o tratamento com terapia estrogênica de baixa e de alta dose, aumentou na expressão desses canais a valores similares ao controle e, nos TCP e TRP na ordem de 38 e 86%, respectivamente. Assim, esses resultados sugerem que o estrogênio é um modulador fisiológico da expressão dos canais de cloreto ClC-2, agindo diretamente no túbulo proximal, uma região do néfron responsável por 60% da reabsorção de sal e água do filtrado glomerular (Jacobson, 1981). Essa modulação estrogênica explicaria a excreção de uma urina mais concentrada no grupo castrado, já que com essa ausência hormonal haveria uma diminuição na quantidade desses canais e, conseqüentemente a reabsorção destes íons.

Muitos outros trabalhos suportam a idéia de que uma das ações do estrogênio na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico seja atuando diretamente nos túbulos renais, através de diferentes mecanismos de ação (Verlander et al., 1998; Brunette & Leclerc, 2001; Brunette & Leclerc, 2002; Stachenfeld et al., 2003). Um deles, seria um mecanismo não-genômico, dependente da ativação da proteína quinase c-delta (PKC δ), que fosforilaria a proteína quinase a (PKA), para ativar o transportador trocador Na⁺/H⁺, aumentando a absorção de sódio no túbulo distal. A aldosterona pela proteína quinase c-alfa (PKC α), ativa o mesmo trocador. Além disso, esses dois hormônios possuem uma via em comum, ativando a fosfolipase-A₂ (FLA₂), que cliva o

ácido araquidônico (AA) da membrana, e através da via da cicloxigenase (COX), libera as PGE₂, para ativar o trocador Na⁺/H⁺ em rins de ratas férteis (Harvery et al., 2002). Outro trabalho que demonstra essa ação estrogênica nos túbulos renais foi o de Verlander et al. (1998) demonstrando, que fêmeas castradas apresentaram uma excreção de sal maior, se comparado ao grupo controle. Resultados idênticos ao nosso grupo ovariectomizado. Os grupos sham e os ovariectomizados+estrogênio, não apresentaram diferença significativa excreção de sal. De maneira que o estrogênio reduziu a excreção de sódio nesses animais, como demonstrado em nossos resultados, em que o grupo controle apresentou uma baixa excreção de sódio.. Ao avaliar o *Western blots* do cotransportador NaCl (CTNC) nos rins de fêmeas, Verlander et al., (1998) observaram que a intensidade da banda foi marcadamente reduzida pela castração, em cerca de 34%. O tratamento com estrogênio elevou a densidade dos CTNC. Esses resultados elucidam o efeito direto do estrogênio nas células do túbulo coletor distal, aumentando a densidade dos CTNC, já que existem receptores de estrogênio ao longo do néfron, possibilitando a sua modulação e mostrando um outro mecanismo em que o estrogênio causaria absorção de sódio.

Esse mecanismo estrogênico de absorção de sódio também foi comprovado por Tran et al. (1998) em que o estrogênio *in vitro* aumentou a expressão das proteínas do cotransportador NaCl e da Na-K-ATPase em cultura de células de túbulos renais distais. Assim a ovariectomia e a terapia de reposição estrogênica teriam um efeito significativo no transporte de NaCl no túbulo convoluto distal, acarretando alterações clínicas importantes particularmente nas mulheres posmenopausadas, ou ainda, contribuindo para uma alteração no balanço dos fluidos corporais em mulheres na idade reprodutiva, como a hipertensão na gravidez (Verlander et al., 1998).

Brunette & Leclerc (2001) em uma incubação durante 15 minutos com 17- β -estradiol (10^{-8} M) em células dos túbulos proximal e distal de rins de coelhos, encontraram um forte aumento na recaptção de sódio, tanto nos segmentos proximais, quanto nos distais, mostrando que o efeito direto do estrogênio se daria da mesma forma que os co-transportadores NaCl (Verlander et al., 1998), e a bomba Na-K-ATPase (Tran et al., 1998), ocorrendo por mecanismos não-genômicos.

O estrogênio é um hormônio esteróide, cujo mecanismo de ação clássico é pela ligação a receptores intranucleares. O hormônio atravessa a membrana plasmática das células-alvo e se liga aos receptores intracelulares específicos, formando o complexo hormônio receptor (Nadal et al., 2001; Norman et al., 2004). Esse complexo então se desloca para o núcleo, aonde atua como cofator de transcrição, ligando-se a regiões específicas do DNA (Silberger & Magleby, 1999), regulando a expressão de genes-alvo (Tsai & O'Malley, 1994). A ligação do complexo hormônio receptor ao DNA induz ou inibe (Norman et al., 2004) a transcrição gênica, que é seguida pelo processo de tradução e, caso não tenha sido inibida, aumenta os níveis de RNAm, o que leva a formação de proteínas específicas (O'Malley & Means, 1974). As proteínas estão relacionadas a respostas celulares (Santos et al., 2004). Além desse mecanismo genômico clássico, o estrogênio age em receptores presentes na membrana plasmática, que ativam respostas celulares por segundos mensageiros específicos.

Todos esses mecanismos de ações estrogênicas diretas e indiretas na regulação da reabsorção de sal e de água, explicariam o porquê que as ratas castradas, com essa ausência hormonal, apresentariam uma menor expressão desses

transportadores de sódio e, conseqüentemente uma maior excreção do mesmo, observado em nossos resultados.

Embora o funcionamento dos túbulos renais de fêmeas férteis seja influenciado pelos esteróides femininos, devido a presença de seus receptores específicos (Dubey & Jackson, 2001a), a função renal é também modulada pela inervação simpática, representada pelo nervo renal, que possui três neuroefetores: a vasculatura, os túbulos renais e as células granulares do aparelho justaglomerular (DiBona & Kopp, 1997; DiBona & Sawin, 2003). Outros trabalhos mostram que a ativação dos nervos renais liberam norepinefrina, que estimula os receptores α_1 -adrenérgicos pós-sinápticos, localizados na membrana basolateral das células epiteliais tubulares do néfron, que com subseqüentes sinais intracelulares, aumentam a atividade da bomba de sódio-potássio-ATPase, que resulta no aumento do transporte e na reabsorção de sódio transepitelial (DiBona, 2003b).

Há um crescente número de estudos que mostram o importante papel do nervo simpático renal na manutenção da função renal e da pressão arterial (Le Fevre et al., 2003). E, este efeito do nervo renal na pressão arterial, é pelo menos em parte, mediado através dos níveis basais de AII (Wagner et al., 1999). Alguns autores sugerem que o bloqueio da AII, diminui a antinatriurese e a antidiurese, mesmo com ativação do nervo renal (Handa & Johns, 1985; Handa & Johns, 1987), haja vista que quando o SRAA é estimulado por uma baixa ingestão de sal, a atividade do SNSR também aumenta, e quando a ECA é bloqueada, a resposta antinatriurética e antidiurética é abolida (Johns, 1987), mostrando que a resposta renal a uma estimulação do NSR, é em parte, mediada pela AII (Le Fevre et al., 2003).

A AII pode atuar por mecanismos pré-sinápticos, potencializando a liberação de noradrenalina (NOR) pelos terminais dos nervos simpáticos e aumentar a resposta vasoconstritora pela ativação do nervo renal (Suzuki et al., 1992; Takishita et al., 1994). Especialmente, o efeito da AII na excreção de sódio ocorre, predominantemente via aumento da liberação da NOR nesses terminais simpáticos. E com a desnervação renal, há uma redução dos efeitos da AII na reabsorção tubular proximal, de cloreto de sódio e água, em cerca de 75% (Liu & Logan., 1988). Mas, outros autores discordam destes resultados, como é o caso de Le Fevre et al.(2003), eles observaram que o rim esquerdo, apesar de desnervado, mostrou uma significativa redução na frequência de excreção urinária, que foi abolida com o tratamento com inibidor da AII, indicando o efeito direto da AII na função excretória renal. Esses dados foram similares ao nosso grupo desnervado, que embora tenha sofrido desnervação renal, não apresentou diferença em relação ao controle na excreção de sódio urinária. Um outra observação semelhante, foi no grupo castrado+desnervado, que apesar de desnervado, não apresentou uma excreção de sódio significativamente maior que do grupo controle. Portanto, o SRAA intacto é essencial para uma ativação satisfatória do nervo simpático renal, causando antinatriurese e antidiurese. Le Fevre et al.(2003) observaram que o bloqueio da AII atenua significativamente, mas não aboli a reposta de antinatriurese e antidiurese do rim com estimulação simpática, sugerindo em efeito indireto da AII e um efeito direto do nervo, sinergicamente, na função excretória renal. Na verdade há uma interação entre os efeitos diretos do nervo renal, os efeitos indiretos da AII e os ajustes mediados pela autoregulação renal, realizados momento-a-momento (DiBona & Sawin, 2004) que pode amenizar mudanças ocasionadas pelos dois primeiros, para tentar manter o FSR constante.

Além da ação do SRA sistêmico há, o SRA central que possui um importante papel no nível basal da atividade do SNSP. Esses efeitos podem ser observados com microinjeções de antagonistas de receptor de AII do tipo AT₁ no bulbo ventrolateral rostral (BVLr) de ratos normais, com dieta com baixo sódio, levando a estímulos paralelos para atividade da renina plasmática (ARP) e, diminuição da pressão arterial e da ANSR. Isso não foi observado em animais com uma dieta normal e alta de sódio (DiBona, 2002b). Portanto, há fortes evidências que a AII, provavelmente originada do SNC, estimularia a atividade do sistema nervoso simpático periférico, via ação no SNC, em seus núcleos regulatórios. Muitas evidências reforçam que a atividade do sistema nervoso simpático renal seja um elo entre o sistema nervoso central e os rins, para o desenvolvimento da hipertensão arterial. Além do mais, os efeitos do aumento da atividade do SNSR afetam em vários aspectos da função renal, que são semelhantes a diminuição da habilidade dos rins de excretarem sódio e água, definindo assim, uma disfunção excretória renal pelo balanço alterado de sal e água, levando a um aumento da pressão arterial (DiBona, 2002a; DiBona, 2002c).

Embora, muitos trabalhos mostrem que o nervo renal estimule diretamente a reabsorção de sódio, a desnervação renal, resulta em natriurese e diurese aguda (Rogenes & Gotschalk, 1982; Jezierska-Kompanowska et al, 2001). Resultados mostram que isso poderia influenciar na regulação da pressão em um prazo maior que 7 dias, com uma dieta diferenciada de sódio, contudo o nervo pode suportar variações na pressão arterial, em dietas normais de sódio (Jacob et al., 2003). Portanto, embora alguns estudos mostrem que com a desnervação renal há um aumento na excreção urinária de sódio (Miki et al., 1989a; DiBona, 2003b), existem outros resultados que não encontraram diferenças significantes (DiBona & Sawin, 1983; Kopp et al., 2003), como

mostrado pelos nossos resultados, tanto no grupo desnervado, como no castrado+desnervado. Provavelmente, por uma interação de fatores como a autoregulação, mantendo o FSR constante (DiBona & Sawin, 2004), o efeito compensatório realizado pelo SRAA, após a desnervação (Liu & Logan, 1988), a dieta normal de sódio, que afeta pouco o nervo renal e, ou um tempo curto de experimento (Jacob et al., 2003), como demonstrado em outros trabalhos com resultados similares aos nossos nos grupos desnervados (DiBona & Sawin, 1983; Kopp et al., 2003).

O nervo simpático renal libera catecolaminas pelas suas varicosidades, alterando as funções renais. Portanto a ocorrência natural de catecolaminas (CA) plasmáticas, marcadamente, tem atraído grande interesse para a atividade adreno-simpática em humanos normais, bem como estados patológicos. A epinefrina (EPI) é um hormônio que é liberado pela medula adrenal diretamente para a corrente sanguínea, após estímulos fisiológicos ou sobre situações estressantes. Seus efeitos mais característicos são a lipólise, a glicogenólise, o aumento da frequência e da força de contração no músculo cardíaco (Eriksson, et al., 1993). A norepinefrina (NOR) é o hormônio precursor da EPI, com função de neurotransmissor no sistema nervoso central, bem como no sistema nervoso periférico, estando envolvida no controle da pressão e fluxo sanguíneo. A dopamina (DO) é precursora das duas anteriores e, também é neurotransmissora no SNC (Eriksson, et al., 1993).

A importância fisiológica da catecolaminas (CA) é bem estabelecida nos mamíferos. Em resposta ao estresse, a NOR é liberada pela ativação dos terminais do sistema nervoso simpático localmente com inervações teciduais. Além disso, a NOR e a EPI são secretadas pelas glândula adrenal, e juntamente com outros hormônios atingem

os tecidos pela circulação (Floysand & Serck-Hanssen, 1991). A liberação de NOR é usada como indicador da atividade dos nervos simpáticos em vários órgãos, uma vez que o aumento local da quantidade de NOR tecidual, pode ser dado pela sua maior liberação e menor recaptção dos terminais simpáticos (DiBona, 2002c). Em pacientes com hipertensão essencial há uma liberação cardíaca de NOR maior que em pacientes normotensos, enquanto que a recaptção de NOR cardíaca é menor nos pacientes hipertensos, que nos normotensos (Rumanir et al., 2000). Embora trabalhos não demonstrem a liberação de CA renais em hipertensos e normotensos, nosso trabalho avaliou essa concentração em ratas normotensas, ovariectomizadas, desnervadas e castradas+desnervadas. Mostrando que a concentração de catecolaminas renais do grupo castrado apresentou um aumento significativo, apesar do seu nervo renal intacto, em cerca de 55%. O grupo desnervado apresentou uma redução na ordem de 70% se comparado ao grupo controle, evidenciando a efetividade da desnervação renal. Nossos resultados foram corroborados por Jacob et al. (2003), que afirmaram que a quantidade de NOR nos rins é marcadamente reduzida nos ratos com desnervação renal, apesar de diferentes protocolos (Jacob et al., 2003). Nós mostramos que há uma interação dos hormônios sexuais femininos na liberação da catecolaminas renais de ratas *Wistar* férteis. Outro trabalho que mostra essa interação de hormônios sexuais femininos e catecolaminas é o trabalho de Pechere-Bertschi et al. (2002), em que os níveis de catecolaminas plasmáticas aumentaram significativamente nas mulheres na fase lútea, quando comparadas a outras presentes na fase folicular do ciclo menstrual.

Apesar de outros trabalhos considerarem a efetividade da desnervação com uma redução das CAs renais de 95% (DiBona & Sawin, 1983; DiBona, 2003b), eles utilizam uma metodologia mais específica, como HPLC. Contudo, Di Marco et al.,

(2003) mostraram que as células mensageiras do glomérulo possuem a maquinaria celular biossintética necessária para a produção de catecolaminas, sugerindo que possam atuar de forma parácrina e autócrina na regulação da hemodinâmica glomerular, e na microcirculação renal. Portanto, os valores basais de CA que encontramos em nossos grupos desnervados, talvez sejam produzidos pelas próprias células renais.

O SNSR quando é ativado libera a NOR nos túbulos renais, aumentando a reabsorção de água e sal e, o estrogênio estaria modulando esta ativação. Assim quando o animal é ovariectomizado haveria uma diminuição da reabsorção de sódio, por conseguinte, apresentaria um aumento na excreção do mesmo, devido ausência das ações estrogênicas específicas nos túbulos renais, como mostrado por estudos anteriores (Verlander et al., 1998; Brunette & Leclerc, 2001; Nascimento et al., 2003; Gambling et al., 2004). Por outro lado, em relação aos níveis de CA renais, o grupo castrado mostrou um aumento em sua liberação, de modo que podemos constatar que o estrogênio atenuaria a liberação de NOR pelo nervo renal, nos rins das ratas férteis, apresentando assim, uma baixa excreção de sódio, como mostrado em nosso grupo controle.

Existem muitos trabalhos que indicam que uma das funções protetoras do estrogênio no sistema cardiovascular seja via modulação do sistema nervoso autônomo (He et al., 1998; Saleh et al., 2000; Saleh et al., 2000; Saleh et al., 2005). Os receptores de estrogênio já foram identificados nas regiões do SNC envolvidas com a regulação cardiovascular, em geral, a área préóptica, o núcleo paraventricular, o núcleo supraótico, o núcleo do trato solitário, bulboventrolateral e área postrema (Pelletier et al., 1988; Simonian & Herbison, 1997). Experimentos com ratos machos e fêmeas tem demonstrado uma mudança significativa no tônus autônomo, via efeitos diretos do estrogênio nos neurônios parassimpáticos e simpáticos pré-ganglionares no núcleo

ambíguo e nas células da coluna intermédialateral, respectivamente (Saleh et al., 1999; Saleh et al., 2000). Há um aumento do tônus parassimpático após a injeção de estrogênio no NTS e no núcleo ambíguo. E uma diminuição do tônus simpático após a injeção de estrogênio no NTS e no BVLR (Saleh et al., 2000). Em outro trabalho, a injeção do antagonista de receptor de estrogênio, ICI 182780, aboliu esses efeitos (Saleh et al., 2005). Saleh et al., (2000), verificaram que em ratas *Wistar*, a pressão e a ANSR diminuem significativamente após 30 minutos da injeção de estrogênio nos núcleos do NTS, BVLM, NPB, CNA e espaço intratecal. Essa redução da ANSR é aproximadamente 27% quando comparado ao controle, mostrando que o aumento encontrado na concentração das catecolaminas renais do nosso grupo castrado, é causado pela falta da inibição do estrogênio da ANSR, que ocorre a nível central.

Outro dado que corrobora com nossos resultados é o trabalho de He et al. (1998), que após 20 minutos de uma aplicação aguda de estrogênio intravenosa em fêmeas *Sprague-Dawley*, foi mostrado uma redução na frequência cardíaca, na atividade do nervo renal e a atividade do nervo esplânico, em relação às rata controle. Aos 90 minutos após a infusão estrogênica, a queda da atividade do nervo simpático renal era de 30%. Isso também pode ocorrer durante um tratamento crônico com estrogênio, em que os níveis circulantes de NOR e a frequência cardíaca são menores (Lindheim et al., 1992). Em um outro trabalho, Saleh et al. (2005) observaram um aumento significativo da PAM e a ANSR após 30 minutos da aplicação do estrogênio, no córtex insular de machos. A aplicação do antagonista de estrogênio, IC182.780, aboliu esses aumentos. A aplicação do estrogênio com bicuculina (antagonista de receptor GABA_A), mostrou resultados similares ao aumentou da ANSR, e, isso não ocorreu após a co-aplicação do estrogênio com CPP e/ou DNQX (antagonista de receptor NMDA não-específico e

específico, respectivamente), mostrando que a modulação do estrogênio no tônus simpático pode ser mediada pela via de neurotransmissão GABAérgica.

Ao comparar as fêmeas intactas, com as ovariectomizadas, as segundas mostram um aumento significativo na ativação do sistema nervo simpático, o que foi abolido após um tratamento com estrogênio (Mohamed et al., 1999; Saleh & Connell, 1999). Nossos resultados demonstraram isso através da elevada concentração da catecolaminas nos rins das ratas ovariectomizadas, já que não havia atenuação estrogênica sob SNSC.

O papel do estrogênio na função reprodutiva e na prevenção de suas desordens com a idade é bem estabelecida. Muitos estudos tem sugerido que o estrogênio reduz o risco do desenvolvimento do mal de Alzheimer (Kawas et al., 1997), do câncer de cólon (Nanda et al., 1999), de doenças cardiovasculares (Godestein et al., 2000), catarata (Worzata et al., 2001) e osteoporose (Nelson et al., 2002). Essas ações do estrogênio correspondem a uma vasta distribuição de receptores de estrogênio em vários órgãos (Kuiper et al., 1997), inclusive nos rins (Dubey & Jackson, 2001a). Estudos epidemiológicos indicam que a perda da função ovariana na menopausa é um fator de risco específico para doenças cardiovasculares, e mulheres na menopausa apresenta o dobro da incidência de doenças cardiovasculares quando comparado às mulheres na pré-menopausa (Stevenson, 2000). O rim também é um importante alvo de expressão gênica dependente do estrogênio (Jelinsky et al., 2003), devido a presença de seus subtipos de receptores ER α e ER β (Carley et al., 2003; Sharma & Thakur, 2004), e a incidência de doenças renais aumentam após a menopausa, sugerindo que o estrogênio pode prevenir o desenvolvimento e progressão da doenças renais nas fêmeas (Shim et al., 2004). Mulheres são protegidas contra a progressão da doença renal (Silbilger et al., 1995)

Resultados recentes de uma metaanálise usando 68 estudos indicam que no homem com doença renal crônica de várias etiologias, são afetados por mais tempo e mais rápido que as mulheres (Neugarten et al., 2000). Há uma ampla evidência de estudos epidemiológicos e de modelos experimentais de injúria renal que o estrogênio é responsável pela maior proteção das mulheres à progressão da doença renal (Stewart, 1994; Silbilger et al., 1995). Portanto, há uma proteção renal em fêmeas férteis.

O aumento da geração e da deposição de proteínas na matrix extracelular são um dos passos iniciais para o desenvolvimento da falência glomerular e diminuição da função renal (Diamond & Karnovsky, 1988). O estrogênio suprime síntese de colágeno na células da mácula densa (Kwan et al., 1996; Lei et al., 1998; Silbilger et al., 1998a; Silbilger et al., 1998b), sugerindo que o estrogênio limita a progressão a glomerulosclerose via redução de acúmulo na matrix extracelular, após a injúria glomerular. Além de que o estrogênio é um potente antioxidante de radicais livres, protegendo as células da mácula densa contra os efeitos dos fatores de crescimento induzidos pelos radicais livres (Dubey & Jackson, 2001a).

Portanto, esse nosso achado talvez seja um outro mecanismo cardio e renoprotetor do estrogênio em fêmeas férteis e a sua ausência na menopausa, aumentou a atividade do nervo renal, acarretando uma maior liberação de catecolaminas renais e abolindo a sua proteção renal natural contra possíveis danos causados pelas mesmas e, podendo aumentar a incidência de doenças na pós-menopausa.

Para a proliferação e manutenção fisiológica do útero é descrito a importância da concentração do estrogênio. Já que o útero, maior órgão alvo dos hormônios ovarianos, possui mudanças sincronizadas de proliferação e de diferenciação em resposta a mudanças nos níveis de estrogênio circulante, observados por exemplo,

durante as fases do ciclo estral (Sharma & Thakurt, 2004). Ao compararmos as ratas ovariectomizadas com as controle, notamos uma redução significativa no peso uterino, evidenciando a efetividade da castração e, indiretamente, a ausência dos hormônios femininos neste grupo. Embora, o estrogênio tenha um efeito proliferativo uterino, outros estudos demonstram que ele é antimitogênico, como suas ações em células de músculo liso vascular (Gebara, 1996), em células de artérias coronarianas humanas (Dubey et al., 2004aa) e em células mesangias glomerulares humanas (Dubey et al. 2003), ocasionando um efeito protetor. Provando que essas ações do estrogênio são tecidos-específicas e tempo dependente. Em nosso grupo castrado, não observamos alterações no peso dos rins e das câmaras cardíacas, apesar de estudos mostrarem que a ausência estrogênica poderia ocasionar danos cardíacos (Gebara, 1996; Dubey et al., 2004) e renais (Dubey & Jackson, 2001a; Dubey et al. 2003) nessas fêmeas..

Enfim, diante desses resultados, podemos concluir que:

- O estímulo espontâneo para a sede é parcialmente dependente dos hormônios sexuais femininos, devido suas influencias inibitórias do estrogênio nas ações do HAD, via receptor de NMDA, e nas ações da AII. De modo que os hormônios sexuais femininos contribuem para a regulação hídrica nas fêmeas.

- O nervo simpático renal possui uma contribuição importante no controle da excreção renal de água e sódio. Essa contribuição simpática não é maior que a dos hormônios sexuais femininos no controle da excreção de sódio em ratas fêmeas Wistar férteis, devido as ações desses esteróides na expressão de transportadores, principalmente, de sódio e de cloreto;

- Os hormônios sexuais femininos desempenham um papel modulador importante na liberação das catecolaminas no rim pelo nervo simpático renal, através de suas ações em núcleos centrais que controlam a atividade simpática autonômica, dado pela magnitude do aumento na concentração das catecolaminas renais nas ratas ovariectomizadas.

- Há uma interação fisiológica dos hormônios sexuais femininos e o nervo simpático renal no controle das funções do rins nas ratas em idade reprodutiva, podendo ser importante mecanismo renoprotetor, uma vez que após a ovariectomia foi observado um aumento na atividade do nervo renal com maior liberação de catecolaminas renais e seus possíveis efeitos maléficos no organismo feminino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

Abu-Amarah I, Ajikobi DO, Bachelard H, Cupples WA & Salevsky FC (1998). Responses of mesenteric and renal blood flow dynamics to acutedenervation in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 275: R1543–R1552.

Al-Ghoul WM, Meeker RB & Greenwood RS (1997) Differential expression of fiveN-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in vasopressin and oxytocin neuroendocrine cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 44:262–272.

Alves SE, Lopez V, McEwen BS, Weiland NG (1998) Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemicalstudy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:3281–3286.

Ammons WS, Koyama S & Manning JW (1982). Neural and vascular intraction in renin response to graded renal nerve stimulation. *Am J Physiol*, 242: R552-R562.

Antunes-Rodrigues J, Castro MD, Eliais LLK, Valença MM & McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev*, 84: 169-208.

Aperita A, Larsson L & Zetterstrom (1981). Hormonal induction of Na-K-ATPase in developing proximal tubular cells. *Am J Physiol*, 10: F356-F360.

Arima H et al (1999). Rapid and sensitive vasopressin heteronuclear RNA responses to changes in plasma osmolality. *J Neuroendocrinol*, 11: 337-341.

Aronson PS & Giebisch G (1997). Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol*, 273:F179 –F192.

Axelsson JF, Shannon W & Van Leeuwen FW (1990). Differential localization of estrogen receptors in various vasopressin synthesizing nuclei of rat brain. *J Neuroendocrinol*, 2: 209-216.

Bader M & Ganten D (2000). Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med*, 78(3):130-9.

Barajas L, Liu L & Powers K (1992). Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992 May;70(5):735-49.

Barger AC, Muldowney FP, Liebowitz MR (1959). Role of the kidney in the pathogenesis of congestive heart failure. *Circulation*. 1959;20:273–285. In: DiBona GF (2003b). Neural Control of the Kidney Past, Present, and Future. *Hypertension*, 41(2): 621-624.

Barron WM, Schreiber J & Lindheimer MD (1986). Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol*, 250: E352-61.

Beltowski J & Wojcicka G (2002). Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med Sci Monit*, 8(2):RA39-52

Biner HL et al. (2002). Human cortical distal nephron: Distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol*, 13: 836-847.

Birnbaumer M et al. (1992). Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*, 357: 333-335.

Bisset GW & Chowdrey HS (1988). Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiology*, 73: 811-872.

Blaufox MD, Lewis EJ, Jagger P, Lauler D, Hickler R & Merrill (1969). Physiology responses of the transplanted human kidney. *N. Engl. J. Med*, 280:62-66.

Bourque CW, Oliet SH & Richard D (1994). Osmorreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol*, 15: 231-274.

Bonilla-Felix M (2004). Development of water transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F1093-F1101.

Bourque, C.W. & Olet, S.H.R. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 59: 601–619.

Brooks, VL, Scrogin, KE & McKeogh DF (2001). The interaction of angiotensin II and osmolality in the generation of sympathetic tone during changes in dietary salt intake. An hypothesis. *Ann NY Acad Sci* 940: 380–394.

Brunette MG & Leclerc M (2001). Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *Mol Celr Endocrinol*, 194: 183-190.

Brunette MG & Leclerc M (2002). Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. *Mol Celr Endocrinol*, 194: 183-190.

Calzone WL, Silva C, Keefe DL & Stachenfeld NS (2001). Progesterone does not alter osmotic regulation of AVP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281: R2011-R2020.

Canessa CM et al. (1994). Amiloride-sebsitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367: 463-467.

Carley ME, Rickard DJ, Gebhart JB, Webb MJ, Podratz KC & Spelsberg TC (2003). Distribution of estrogen receptors α and β mRNA in mouse urogenital tissues and their expression after oophorectomy and estrogen replacement. *Jounal Int Urogynecol*, 14: 141-145.

Chang SS et al. (1996). Mutations in subunits of the epithelial sodium channels cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type I. *Nat Genet*, 12:248-253.

Christie, N. P., and J. C. Shaver. Estrogens and the kidney (1974). *Kidney Int.* 6: 366-376.

Chung SK, Pfaff DW & Cohen RS (1988). Estrogen-induced alterations in synaptic morphology in the midbrain central gray. *Exp Brain Res*, 69(3):522-30.

Claybaugh JR, Sato AK, Crosswhite LK & Hassel H (2000). Effects of time of day, gender, and menstrual cycle phase on the human response to a water load. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: R966-R973.

Crofton JT, Ratliff DL, Brooks DP & Share L (1986). The metabolic clearance rate of and pressor responses to vasopressin in male and female rats. *Endocrinology*, 118: 1777-1781.

Crowley RS, O'Donohue TL, George JM & Jacobowitz DM (1978). Changes in pituitary and vasopressin during the estrous cycle and after ovarian hormones: evidence for mediation by norepinephrine. *Life Sci*, 23: 2579-2589. In Stachenfeld NS, Dipietro L, Palter SF & Nadel ER (1998). Estrogen influences osmotic secretion of AVP and body water balance balance in postmenopausal women. *J Appl Physiol*, 43: R187-R195.

Crowley RS & Amico JA (1993). Gonadal steroids modulation of oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamus of the osmotically stimulated rat. *Endocrinology*, 133: 2711-2718;

Curtis KS, Davis LM, Johnson AL, Therrien KL & Contreras (2004). Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav*, 80: 657-664.

Diamond JR & Karnovsky MJ (1988).. Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis. *Kidney Int*, 33:917–924.

Dantas APV, Nigro D, Fortes ZB, Sciovoletto, Carvalho MHC (1999). Homônios sexuais femininos. *Hipertensão*, 2(3): 70-75.

Dart AM, Du XJ & Kingwell BA (2002). Gender, Sex hormones and autonomic nervous of the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 53: 678-687

Davison JM., Gilmore EA, Durr J, Robertson GL & Lindheimer MD (1984). Altered osmotic thresholds for vasopressin secretion and thirst in human pregnancy. *Am. J. Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 15: F105-F109.

Dean AS, Tan J, O'Brien ER & Leenen FH (2005).17 β -Estradiol dowregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R759-R766.

De Feo P (1996). Hormonal regulation of human protein metabolism. *Eur J Endocrinol*, 135: 7-18.

Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk W, Tempel K & Dominiak (2002). Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension*, 40: 348-354.

DiBona GF, Herman PJ & Sawin LL (1988). Neura control of renal function in edema forming states. . *Am J PhysiolRegul Integr Comp Physiol*, 254: R1017-R1024.

DiBona GF (2003a). Central angiotensin modulation of baroreflex control of renal sympathetic nerve yuactivity in the rat: influence of dietary sodium. *Acta Physiol Scand*, 177: 285-289.

DiBona GF (2003b). Neural control of the kidney: past, present, and future. *Hypertension*, 41(2): 621-624.

DiBona GF (2001). Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and renal sympathetic nerves in control of renal function. *Ann N Y Acad of Sci*, 940: 395-406. Abstrat

DiBona GF (1977). Neurogenic regulation of renal tubular sodium reabsorption. *Am J. Physiol*. 233: F73-F81.

DiBona GF (1982). The functions of the renal nerve. *Physiol Biochem. Pharmacol*, 94: 75-181.

DiBona GF (2000a). Neural control of the kidney : functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279: F1517-F1524.

DiBona GF (2000b). Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension*, 36: 1083-1088.

DiBona GF (2000c). Differentiation of vasoactive renal sympathetic nerve fibers. *Acta Physiol Scand*, 168: 195-200.

DiBona GF (2002c). Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11: 197-200.

DiBona GF (2004). The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments. *Hypertension*, 43: 147-150.

DiBona GF & Kopp UC (1997). Neural control of renal function. *Physiol Rev*, 77: 75-197.

DiBona GF & Sawin LL (1985). Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am J Physiol*, 248: F441-F446.

DiBona GF & Sawin LL (2002a). Effect of renal nerve stimulation on responsiveness of the rat renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F1056-F1065.

DiBona GF & Sawin LL (2002b). Effect of arterial baroreceptor denervation on sodium balance. *Hypertension*, 40: 547-551..

DiBona GF & Sawin LL (1983). Renal nerves in renal adaptation to dietary sodium restriction. *Am J Physiol*, 245: F322-F328.

DiBona GF & Sawin LL (2004). Effect of renal denervation on dynamic autoregulation of renal blood flow. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286: H1209-H1218.

DiMarco GS et al (2001). Mesangial cells are able to produce catecholamines in vitro. *J Cell Biochem*, 89: 144-151.

DiBona GF & Sawin LL (2003). Frequency response of the renal vasculature in congestive heart failure. *Circulation*, 107: 2159-2164.

Diz DI, Nasjletti A & Baer PG (1982). Renal denervation at weaning retards development of hypertension in New Zealand genetically hypertensive rats. *Hypertension*, 4: 361-368.

Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC & Imthurn B (2004a). Catecholamines Block the Antimitogenic Effect of Estradiol on Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *J Clin Endocrinol. Metab*, 89(8):3922–3931.

Dubey RK, Tofovic SP & Jackson (2004b). Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *The J Pharmacol Exp Ther*, 308: 403-409.

Dubey RK & Jackson EK (2001a). Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Renal Physiol*, 280: F365-F388.

Dubey RK & Jackson EK (2001b). Genome and Hormones: Gender differences in Physiology invited review: Cardiovascular protective effects of 17 β -estradiol. *Am J Renal Physiol*, 280: F365-F388.

Dubey RK et al (2000). Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of estradiol on vascular smooth muscle cells via estrogen receptor-independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(1):27-33.

Dubey RK, Zacharia LC, Gillespie DG, Imthurn & Jackson EK (2003). Catecholamines block the antimitogenic effect of estradiol on human glomerular mesangial cells. *Hypertension*, 42: 349-355.

Dzau et al.(2001). The relevance of tissue angiotensin- converting enzyme: Manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am Jo Cardiol*, 88: 1L-20L.

Eaton DC, Malik B, Saxena NC, Al-Khalili OK & Yue G (2001). Mechanisms of aldosterone's action on epithelial Na⁺ transport. *J Membr Biol*, 184(3):313-9.

Edwards RM, Stack EJ, Gellai M & Brooks DP (1992). Inhibition of vasopressin-sensitive cAMP accumulation by α_2 -adrenoceptor agonists in collecting tubules is species dependent. *Pharmacol*, 44: 26–32.

Ericksson BM (1993). Determination of catecholamines in rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A*, 612: 1-5.

Erlenbach I & Wess J (1998). Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. *J Biol Chem*, 273: 26549-26558.

Fitzsimons JT (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*, 78: 583-686.

Floysand R & Serck-Hanssen G (1991). Determination of content of catecholamines in atlantic salmon (*Salmo salar*): A comparison of HPLC-EC and the trihydroxyindol fluoremetric method. *Comp. Biochem. Phsiol.*, 99(3): 457-462.

Forsling ML, Stromberg P & Akerlund M (1982). Effect of ovarian steroids on vasopressin secretion. *J Endocrinol*, 95: 147-151. In: Antunes-Rodrigues et al. (2004).

Forsling ML, Akerlund M & Stromberg (1981). Variations in plasma concentrations of vasopressin during the menstrual cycle. *J Endocrinol*, 89: 263-266. In: Antunes-Rodrigues et al. (2004).

Fujisawa S, Tanaka J & Nomura M (2001). Estrogen attenuates the drinking response induced by activation of angiotensinergic pathways from the lateral hypothalamic area to the subfornical organ in female rats. *Behav. Brain Res.* 122, 33–41.

Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC & Brosnihan KB (1999). Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*, 33(II): 323-328.

Gambling L, Dunford S, Wilson CA, McArdle HJ & Baines DL (2004). Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gammaENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney Int*;65(5):1774-81

Garg LC. Actions of adrenergic and cholinergic drugs on renal tubular cells (1992). *Pharmacol Rev* 44: 81–102.

Garty H (2000). Regulation of the epithelial Na^+ channel by aldosterone: Open questions and emerging answers. *Kidney Int*, 57: 1270-1276.

Gebara OCE (1996). Efeitos vasculares e hemostáticos da terapeutica de reposição hormonal. *Revista Brasileira de Cardiologia do Estado de São Paulo*, 6: 724-730.

Gonçalves WLS & Moyses MR (2004). Participação dos hormônios sexuais e da atividade de ECA na manutenção do tônus vascular coronariano de ratos normoensos e hipertensos. Dissertação de mestrado, CBM, Ufes.

Gottschalk CW (1979). Renal nerves and excretion. *Annu Rev. Physiol*, 41: 229-240.

Grindstaff RR, Grindstaff RJ & Cunningham JT (2000). Effects of right atrial distension on the activity of magnocellular neurons in supraoptic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278: H1605-H1615.

Grodestein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE & Stampfer MJ (2000). A prospective observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 133:933 –941

Guthrie D & Yucha C (2004). Urinary concentration and dilution. *Nephrol Nurs Journal*, 31(3): 297-301.

Gu Q & Moss RL (1996) 17-Estradiol potentiates kainate-induced current via activation of the cAMP cascade. *J. Neurosci*, 16: 3620–3629.

Gustafsson JA (2003). What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24:479 –485

Guyton AC et al. (1972). Arterial pressure regulation: overriding dominance of the kidney in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med*, 52: 584-594.

Hall JM, Couse JF & Korach KS (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *JBiol Chem* 276:36869–36872

Handa RK & Johns EJ. Interaction of the renin-angiotensin system and the renal nerves in the regulation of rat kidney function (1985). *J Physiol*, 369:311–321.

Handa RK & Johns EJ (1987). The role of angiotensin II in the renal responses to somatic nerve stimulation in the rat. *J Physiol*, 393:425–436.

Harvey BJ, Doolan CM, Condliffe SB, Renard C, Alzamora R & Urbach V (2002). Non-genomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon. *Steroids*, 67: 483-491.

Haselton JR & Vari RC (1998). Neuronal cell bodies in paraventricular nucleus affect renal hemodynamycs and excretion via renal nerves. *Am J Physiol Renal Physiol*, 275: F1334-F1342.

Hatano T, Ogawa K, Kanda K, Seo H & Matsui N (1988). Effect of ovarian steroids on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate production stimulated by arginine vasopressin in rat monolayer cultured cells. *Endocrinol Jape*, 35: 267-274.

Hatton GI (1997). Oxytocin and vasopressin neurones: vive la difference! *J Physiol*, 500: 284.

Hayashi M et al. (1994). Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V₂ receptor in rat kidney. *J Clin Invest*, 94: 1778-1783.

He XR, Wang W, Crofton JT & Share L (1998). Effects of 17 β -estradiol on sympathetic activity and pressor reponse to phenylephrine in ovariectomized rats. *Am J Physiol*, 44: R1202-R1208.

Herbison AE (1994). Immunocytochemical evidence for estrogen receptors within GABA neurones located in the perinuclear zone of the supraoptic nucleus and GABAA receptor $\beta 2/\beta 3$ subunits on supraoptic oxytocin neurones. *J Neuroendocrinol*, 6: 5-11.

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

Horner SR et al. (1997). Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertension*, 15 (12 Pt): 1471-1479.

Hu B & Bourque CW (1991). Functional N-methyl-D-aspartate and non- N-methyl-D-aspartate receptors are expressed by rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. *J Neuroendocrinol*, 5: 509-514.

Ishunina TA, Kruijver FPM, Balesar R & Swaab DF (2000). Differential expression of estrogen receptor α and β immunoreactivity in the human supraoptic nucleus in relation to sex and aging. *J Clin Endocrinol. Metab*, 85: 3283-3291.

Ishunina TA, Salehi A, Hofman MA, Swaab DF. (1999) Activity of vasopressinergic neurons of the human supraoptic nucleus is age and sex dependent. *J Neuroendocrinol*, 11:251–258.

Ishunina TA & Swaab DF (1999) vasopressin and oxytocin neurons of the human supraoptic and paraventricular nucleus; Size changes in relation to age and Sex. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4637-4644

Itoh S, Carretero AO & Murray RD (1985). Possible role of adenosine in the macula densa mechanisms of renin release in rabbits. *J Clin Invest*, 76(4): 1412-1417.

Jacob F, Ariza P & Osborn JW (2003). Renal denervation chronically lowers arterial pressure independent of dietary sodium intake in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284: H2302-H2310.

Jacobson HR (1981) Functional segmentation of the mammalian nephron. *Am J Physiol*, 241:F203–F218.

Jeffries WB & Pettinger WA(1989). Adrenergic signal transduction in the kidney. *Miner Electrolyte Metab*, 15: 5–15.

Jelinsky SA, et al. (2003). Global transcription profiling of estrogen activity: estrogen receptor α regulates gene expression in the kidney. *Endocrinology* 144:701 –710

Jezierska-Kompanowska E, Walkowska A, Johns EJ, and Sadowski J (2001). Effect of renal denervation in the anaesthetised rat: natriuresis and increased cortical blood flow. *J Physiol* 531:527–534.

Johnson AK & Gross PM (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J*, 7(8):678-86

Johns EJ (2002). The autonomic nervous system and pressure-natriuresis in cardiovascular-renal interactions in pressure to salt. *Clin Auton Research*, 12: 256-263.

Johnson, A.K., Cunningham, J.T. & Thunhorst, R.L. (1996). Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:183–191.

Jones DW (2004). Dietary sodium and blood pressure. *Hipertension*, 43: 932-935.

Johnson JA & Thunhorst RL (1997). The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinology*, 18: 292-353.

Just A, Wittmann U, Ehmke H & Kirchheim HR (1998). Autoregulation of renal blood flow in the conscious dog and the contribution of the tubuloglomerular feedback. *J Physiol*, 506 : 275–290.

Kang AK et al. (2001). Effect of oral contraceptives on the renin angiotensin system and renal function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280: R807-R8013.

Katholi RE (1985). Renal nerve and hypertension: an update. *FASEB*, 44: 2846-2850.

Kawas C, et al (1997) Aprospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore longitudinal study of aging. *Neurology*, 48: 1517–1521.

Katzenellenbogen BS et al. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74: 279-285.

Ke FC & Ramirez VD (1990). Binding of progesterone to nerve cell membranes of rat brain using progesterone conjugated to 125I-bovine serum albumin as a ligand. *J Neurochem*, 54(2):467-72.

Keeler R, Sato AK, Claubagh JR & Wilson N (1991). Effect of V2 antagonist on clearance of arginine vasopressin by isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol*.261:R665-9

Kelly MJ, Qiu J, Wagner EJ & Ronnekleiv (2003). Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). *J Steroid Biochem & Mol Biol*, 83: 187-193

Kim JK, Linas SL & Schrier RW (1979). Catecholamines and sodium transport in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 31:169-178.

Knepper MA & Inoue T (1997). Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 560-564.

Kline RL & Mercer PF (1980). Functional reinnervation and development of supersensitivity to NE after renal denervation. *Am J Physiol*, 238:R353-R358.

Kimura T et al. (1976). Effect of various states of hydration on plasma ADH and renin in man. *J Endocrinol Metab*, 42: 79-87. In: Antunes-Rodrigues et al., 2004.

Kisley LR, Sakai RR, Ma LY & Fluharty SJ (1999). Ovarian steroid regulation of angiotensin II-induced water intake in the rat. *Am J Physiol Regul Int Comp Physiol*, 45: R90-R96

Kuiper GG, Carlson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863–870

Klussmann E, Maric K & Rosenthal W (2000). The mechanism of aquaporin control in the renal collecting duct. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 141: 33-95.

Kopp UC, Cicha MZ & Smith LA (2003). Dietary sodium loading increases arterial pressure in afferent renal-denervated rats. *Hypertension*, 42: 968-973.

Kopp UC, Smith LA & DiBona GF (1987). Impaired renorenal reflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 9: 69-75.

Krause EG, Curtis KS, Davis LM, Stowe JR & Contreras RJ (2003). Estrogen influences stimulates water intake by ovariectomized female rats. *Physiol Behav*, 79: 267-274.

Kwan G, Neugarten J, Sherman M, Ding Q, Fotadar U, Lei J, and Silbiger S(1996).. Effects of sex hormones on mesangial cell proliferation and collagen synthesis. *Kidney Int* 50: 1173–1179.

Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1995). Estradiol 17- β and μ -opioid negative feed-back? *Endocrinology*, 136: 2341-2344.

Lee HJ, Sagawa K, Shi W, Murer H & Morris ME (2000). Hormonal regulation of sodium/sulfate co-transport in renal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 225:49–57

Le Fevre ME, Guild SJ, Ramchandra R, Barret CJ & Malpas SC (2003). Role of angiotensin II the neural control of renal function. *Hypertension*, 41: 583-591.

Lei J, Silbiger S, Ziyadeh FN, and Neugarten J (1998).. Serumstimulated $\alpha 1$ type IV collagen gene transcription is mediated by TGF- β and inhibited by estradiol. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F252–F258.

Leng G, Brown CH & Russel JA (1999). Physiology pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol*, 57: 625-655.

Li X, Schwartz P, Rissman E. (1997). Distribution of estrogen receptor- β -like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology*, 66:63– 67.

Lifschitz MD & Harrington WW (1978). Lack of role for the renal nerves in renal sodium reabsorption in chronic dogs. *Clin Sci*, 54: 567-572.

Lindheim SR, Legro RS & Berstein L (1992). Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 1831–1836.

Liu FY & Cogan MG (1988). Atrial natriuretic factor does not inhibit basal or angiotensin II-stimulated proximal transport. *Am J Physiol*, 255: 434-437.

Loffing J et al. (2001). Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol*, 280: F675-F682.

Lorenz JN, Weihprecht H, Schenermann J, Skott O & Briggs JP (1991). Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol*, 260: F486-F493.

Malpas SC and Evans RG (1998). Do different levels and patterns of sympathetic activation all provoke renal vasoconstriction? *J Auton Nerv Syst*, 69:72-82..

Malpas SC, Evans RG, Head GA, and Lukoshkova EV (1998). Contribution of renal nerves to renal blood flow variability during hemorrhage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 274: R1283-R1294.

Malpas SC & Leonard BL(2000). Neural regulation of renal blood flow: a re-examination. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27: 956-964.

Masilamani S et al. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β and γ subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*, 104: R19-R23.

Masuo K, Ogihara T, Kumahara Y, Yamatodani & Wada (1984). Increased plasma norepinephrine in young patients with essential hypertension under three sodium intakes. *Hypertension*, 6: 315-321.

Matsumura Y, Uchida S, Sasaki S & Marumo F (1997). Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol*, 8: 861-867.

McKinley MJ et al. (1992a). Efferent neural pathways of the lamina terminalis subserving osmoregulation. *Prog Brain Res* 91: 395–402.

McKinley MJ & Johnson (2004). The physiology regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci*, 19: 1-6. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F1056-F1065.

McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ & Schmid H (1999). The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci*, 6: 289-301.

McKinley MJ, Denton DA & Weisinger R (1978). Sensors for antidiuresis and thirst-osmoreceptors or CSF sodium detectors? *Brain Research*, 141: 89-103. In Antunes-Rodrigues J, Castro MD, Elias LLK, Valença MM & McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev*, 84: 169-208.

McKinley et al. (2004). Vasopressin secretion : Osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J Neuroendocrinol*, 16: 340-347.

Mermelstein PG, Beck JB & Surmeier DJ (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.* 16: 595–604.

Miki K, Hayashida Y, Sagawa S & Shiraki K (1989a). Renal sympathetic nerve activity and natriuresis during water immersion in conscious dogs. *Am J Physiol*, 256:R299–R305.

Miki K, Hayashida Y, Tajima F, Iwamoto J & Shiraki K (1989b). Renal sympathetic nerve activity and renal responses during head-up tilt in conscious dog. *Am J Physiol*, 257:R337–R343.

Miyakubo H, Yamamoto K, Hatakenaka S, Hayashi Y & Tanaka J (2003). Drinking decreases the noradrenaline release in the median preoptic area caused by hypovolemia in the rat. *Behav Brain Res*, 145: 1-5.

Mohamed M, El-Mas MM & Abdel-Rahman AA (1999). Estrogen enhancement of baroreflex sensitivity is centrally mediated, *Am. J. Physiol*, 45:R1030– R1037.

Morales MM et al (1996). Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol*, 270:F1038 –F1048

Moss NG & Harrington WW (1981). Reinnervation of the kidney following nerve crush. *Federation Proc*, 40:553.

Mosselman S, Polman J & Dijkema R (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392:49–53

Myles K & Funder JW (1996). Progesterone binding to mineralocorticoid receptors: in vitro and in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 270: E601-E607

Nanda K, Bastian LA, Hasselblad V and Simel DL (1999). Hormone replacement therapy and risk of colorectal cancer: a meta analysis. *Obstet Gynecol* 93:880 –888

Nadal A, Diaz M & Valverde (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News in Physiological Sciences*, 16: 251-255.

Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S & Kato R (1990). α 1- Adrenergic stimulation and β 2-sdrenergic inhibition of DNA synthetic in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacology*, 37: 30-36.

Nascimento DS et al. (2003). Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch*, 446(5):593-9.

Neugarten J, Acharya A & Silbiger SR (2000). Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 11: 319–329.

Nelson HD et al. (2002) Osteoporosis and fractures in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 162:2278 –2284

Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK & Knepper MA (1995). Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1013-1017.

Norman AW, Mizwichi, MT & Norman PG (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Rev*, 3: 27-40.

Numan M et al. (1999). Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Res*, 830(2):358-71.

O'Keefe JA, li Y, BurgessLH & Handa RJ (1995). Estrogen receptor mRNA alterations in the developing rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 30(1):115-24.

Olkers WKH (1996). Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids*, 61: 166-171.

O'Malley & Means AR (1974). Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*, 183:610-619. In Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS & Moyses MR (2004). Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res*, 37(4):569-75.

Orshal JM & Khalil RA (2003) Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol*, 286:R233–R249

Osborn JL, Francisco LL & DiBona GF (1981). Effect of renal nerve stimulation on renal blood flow autoregulation and antinatriuresis during reductions in renal perfusion pressure. *Proc Soc Exp Biol Med* 168: 77–81.

Paech K et al. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*. 277:1508 –1510.

Pan L & Gross KW (2005). Transcriptional regulation of renin an uptade. *Hypertension*, 45: 3-8.

Pechere-Bertschi A, Maillard M, Stalder H, Brunner HR & Brunier M (2002). Renal segmental tubular response to salt during the normal menstrual cycle. *Kidney Int*, 61: 425-431.

PelletierG, Liao N, Follea N, & Govindan MV (1988). Mapping of estrogen receptor-producing cells in the rat brain by in situ hybridization. *Neurosci. Lett*. 94: 23–28.

Persson PB, Ehmke H, Nafz B & Kirchheim HR (1990). Sympathetic modulation of renal autoregulation by carotid occlusion in conscious dogs. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 258: F364–F370.

Petty KJ, Kokko JP & Marver D (1981). Secondary effect of aldosterone on Na-KATPase activity in the rabbit cortical collecting tubule. *J Clin Invest*, 68(6):1514-21

Price DA, De'Oliveira JM, Fisher ND & Hollenberg NK (1997). Renal hemodynamic response to na angiotensin II antagonist, eprosartan, in healthy men. *Hypertenson*, 30 (2 Pt 1): 240-6.

Qiu J et al. (2003). Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci*, 23(29): 9529-9540.

Register TC, Shively CA & Lewis CE (1998). Expression of estrogen receptor α and β transcripts in female monkey hippocampus and hypothalamus. *Brain Res*, 788:320–322.

Renaud LP & Bourque CW (1991). Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol*, 36(2):131-69

Resende MM & Mill JG (2002). Alternative angiotensin II-forming pathways and their importance in physiological or physiopathological conditions. *Arq Bras Cardiol*, 78(4): 425-438.

Robertson GL & Berl T (1986). Water Metabolism. In: The Kidney. 3a Ed, Vol. 3. 1986.p385.

Rogenes PR & Gottschalk CW (1982). Renal function in conscious rats with chronic unilateral renal denervation. *Am J Physiol*, 242:F140-F148.

Roca CA et al. (2003). Differential menstrual cycle regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in women with premenstrual syndrome and controls. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(7): 3067-3063.

Rosas-Arellano MP., Solano-Flores LP & Ciriello J (1999). Co-localization of estrogen and angiotensin receptors within subfornical organ neurons. *Brain Res*, 837:254–262.

Roselli CE, Adelgadir SE, Ronnekleiv OK & Klosternam (1998). Anatomic distribution and regulation of aromatase gene expression in the rat brain. *Biol. Reprod.*, 58: 79-87.

Rouch AJ & Kudo LH (1996). 2-Adrenergic-mediated inhibition of water and urea permeability in the rat IMCD. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271: F150–F157.

Rumanir et al (2000). Phenotypic evidence of faulty neuronal norepinephrine reuptake in essential hypertension. *Hypertension*, 36:824:829.

Sadowski J, Kurkus J & Gellert R (1980). Have renal nerves a major role in control of sodium excretion? In DiBona GF & Sawin LL (1983). Renal nerves in renal adaptation to dietary sodium restriction. *Am J Physiol*, 245: F322-F328.

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS & Moyses MR (2004). Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res*, 37(4):569-75.

Safe S (2001) Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 62:231–252.

Saito T et al. (1997). Alteration in water channel AQP-2 by removal of AVP stimulation in collecting duct cells of dehydrated rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 272: F183-F191.

Saleh TM & Connell BJ (1999). Centrally mediated effect of 17 β -estradiol on parasympathetic tone in male rats. *Am J Physiol*, 276: R474-R481.

Saleh MC, Connell BJ & Saleh TM (2000). Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Res*, 879: 105-114.

Saleh MC, Connell BJ & Cribb AE (2005). Sympathoexcitatory effects of estrogen in the insular cortex are mediated by GABA. *Brain Res*, 1037: 114-122.

Sasaki S, Ishibashi K & Maruno F (1998). Aquaporin-2 and -3 representatives of two subgroups of the aquaporin family colocalized in the kidney collecting duct. *Annu Rev Physiol*, 60: 199-220.

Sar M & Stumpf WE (1981). Central noradrenergic neurones concentrate 3H-oestradiol. *Nature*, 289(5797):500-2

Sar M, Welsch F. (1999). Differential expression of estrogen receptor- β and estrogen receptor- α in the rat ovary. *Endocrinology*, 140:963–971.

Schmitt R et al. (1999). Developmental expression of sodium entry pathways in rat distal nephron. *Am J Physiol*, 276: F367-F381..

Sealy JE et al. (1994). Estradiol- and progesterone-related increases in the renin-aldosterone system: studies during ovarian stimulation and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:258–264

Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, Reuveny E (2000). Regulation of *sgk* by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺ channel. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278: F613-F619.

Shild L (2004). The epithelial sodium channel : from molecule to disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 151: 93-107.

Shim GJ, Kis LL, Warner M & Gustafsson JA (2004) Autoimmune glomerulonephritis with spontaneous formation of splenic germinal centers in mice lacking the estrogen receptor alpha gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1720 –1724

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M & Swason LW (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 294(1):76-95.

Simonian SX. & Herbison AE (1997). Differential expression of estrogen receptor and neuropeptide Y by brainstem A1 and A2 noradrenaline neurons. *Neuroscience* 76: 517–529.

Schnermann J (2003). The expanding role of aldosterone in the regulation of body Na content. *Eur J Physiol*, 446: 410-411.

Sharma PK & Thakur MK (2004). Estrogen receptor α expression in mice kidney shows Sex differences during aging. *Biogerontology*, 5: 375-381.

Shughrue PJ, Lane LV & Merchenthaler I (1997). Comparative distribution of estrogen receptor α and β mRNA in the rat central nervous system. *Journal Comp. Neurol*, 388: 507-525.

Silberger SD & Magleby KL (1999). Betting the odds with big K. *Science*, 285:1859-1860.

Silbiger S, Lei J & Neugarten J (1998a). Estradiol suppresses type I collagen synthesis by mesangial cells via activation of AP-1. *Kidney Int* 55: 1268–1276.

Silbiger S, Lei J, Ziyadeh FN & Neugarten J (1998b). Estradiol reverses TGF- β 1 stimulated type IV collagen gene transcription in murine mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F1113–F1118, 1998.

Silbiger S, Lei J, Ziyadeh FN, & Neugarten J (1995). Estradiol reverses TGF- β 1 stimulated type IV collagen gene transcription in murine mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 274:F1113–F1118.

Skott O & Briggs JP (1987). Direct demonstration of macula densa Ca^{2+} -mediated renin secretion. *Science*, 237(4822): 1618-1620.

Skott O, Salomonsson M, Persson AE & Jensen BL (1991). Mechanisms of renin release from juxtaglomerular cells. *Kidney Int Suppl*, 32: S16-S19.

Sladeck CD, Fisher KY, Sidorowicz HE & Mathiasen JR (1995). Osmotic stimulation of vasopressin mRNA content in the supraoptic nucleus requires synaptic activation. *Am J Physiol*, 268: R1034-R1039.

Somponpun S & Sladek (2002). Role of estrogen receptor- β in regulation of vasopressin and oxytocin release *in vitro*. *Endocrinology*, 143(8): 2899-2904.

Somponpun S & Sladek (2004). Depletion of oestrogen receptor- β expression in magnocellular arginine vasopressin neurones by hypovolaemia and dehydration. *J Neuroendocrinol*, 16: 544-549.

Somponpun S & Sladek (2003). Osmotic regulation of estrogen receptor- β in rat vasopressin and oxytocin neurons. *J Neurosci*, 23(10): 4261-4269.

Souza DRB, Mill JG & Cabral AM (2004). Chronic experimental myocardial infarction produces antinatriuresis by a renal nerve-dependent mechanism. *Braz J Med Biol Res*, 37: 285-293.

Stewart JH (1994). End-stage renal failure appears earlier in men than in women with polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*, 24: 181-183.

Stachenfeld NS, Keefe DL & Taylor HS (2005). Responses to a saline load in gonadotropin-releasing hormone antagonist-pretreated premenopausal women receiving progesterone or estradiol-progesterone therapy. *J Clin Endocrinol. Metab*, 90(1): 386-394.

Stachenfeld NS, Taylor HS, Leone CA & Keefe, DL (2003). O estrogen effects on urine concentrating response in young women. *J Physiol*, 552: 869-880.

Stachenfeld NS, Silva C, Keefe, DL, Kokoszka CA & Nadel ER (1999). Effects of oral contraceptives on body fluid regulation. *J Appl Physiol*, 87(3): 1016-1025.

Stachenfeld NS, Dipietro L, Palter SF & Nadel ER (1998). Estrogen influences osmotic secretion of AVP and body water balance in postmenopausal women. *J Appl Physiol*, 43: R187-R195.

Stachenfeld NS & Keefe DL (2002). Estrogen effects on osmotic regulation of AVP and fluid balance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E711-E721.

Strokes JB & Sigmund RD (1998). Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and Steroids: Organ tissue and steroid heterogeneity. *Am J Physiol*, 274: C1699-C1707.

Staub O et al. (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ (ENaC) by ubiquitination. *EMBO* 16: 6325-6336

Stevenson JC (2000). Cardiovascular effects of oestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74: 387-393.

Stumpf, W. E., M. Sar, R. Narbaitz, F. A. Reid, H. F. DeLuca, and Y. Tanaka (1980). Cellular and subcellular localization of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in rat kidney: comparison with localization of parathyroid hormone and estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1149-1153.

Swenson KL, Badre SE, Morsette DJ & Sladek (1998). N-methyl-D-aspartic acid stimulation of vasopressin release: Role in osmotic regulation and modulation by gonadal steroids. *J Neuroendocrinol*, 10: 679-685.

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

Suzuki Y, Matsumura Y, Egi Y & Morimoto S. Effects of Losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on norepinephrine overflow and antidiuresis induced by stimulation of renal nerves in anesthetized dogs. *J Pharm Exp Ther*. 1992;263:956-963.

Tanaka J, Kariya K, Miyakubo H, Sakamari K & Nomura M (2002). Attenuated drinking response induced by angiotensinergic activation of subfornical organ projections to the paraventricular nucleus in estrogen-treated rats. *Neurosci Lett*, 324: 242-246.

Tanaka J, Kariya K, Miyakubo H, Fujisawa S & Nomura M (2003). Reduced dipsogenic response induced by angiotensin II activation of subfornical organ projections to the median preoptic nucleus in estrogen-treated rats. *Exp Neurol*, 179: 83-89.

Tanaka J, Kariya K, Miyakubo H, Fujisawa S & Nomura M (2001). Estrogen decreases the responsiveness of subfornical organ neurons to neural inputs from the lateral hypothalamic area in the female rat. *Exp Neurol*, 171: 301-307.

Tanaka J, Kaba H, Saito H & Seto K (1986). Angiotensin II-sensitive neurons in the rat lateral hypothalamic area with efferent projections to the subfornical organ. *Exp Neurol*, 94(3):791-5.

Takata K, Tajika Y, Matsuzaki T, Aoki T, Suzuki T, Abduxukur A & Hagiwara H (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: water channel aquaporin-2 of kidney collecting duct cells. *J Pharmacol Sci*, 96: 255-259.

Takishita S et al. (1994). Short-term effects of angiotensin II blockade on renal blood flow and sympathetic activity in awake rats. *Hypertension*, 24:445– 450.

Tartelin MF & Gorski RA (1971). Variations in food and water intake in the normal and acyclic female rat. *Physiology & Behavior*, 7(6): 847-852. In Krause EG, Curtis KS, Davis LM, Stowe JR & Contreras RJ (2003). Estrogen influences stimulates water intake by ovariectomized female rats. *Physiol Behav*, 79: 267-274.

Thiemann A, Gr_nder S, Pusch M, Jentsch TJ (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and nonepithelial cells. *Nature*, 356:57–60.

Thomas RC (1972). Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol Rev*, 52: 563. In: The Kidney. 3^a Ed. Vol. 3.1986.p385.

Toney GM, Chen QH, Cato MJ & Stocker SD (2003). Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand*, 177: 43-55.

Tran TM, Zhang L & Verlander JW (1998). 17 β -Estradiol *in vitro* enhances expression of sodium transport protein in cultured mouse distal convoluted tubule (DCT) cells. *Am Soc Nephrol Annual meeting, Philadelphia (Abstract A0245)*. In: Brunette MG & Leclerc M (2001). Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *Journal of Endocrinology*, 170: 441-450.

Trigoso WF, Wesley JM, Meranda DL & Shenker Y (1996). Vasopressin an atrial natriuretic peptide hormone responds to hypertonic infusion during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 11: 2392:2395.

Tsai M-J & O'Malley BW (1994). Molecular mechanisms of actions of steroid/thyroid receptors superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63: 451-486. In Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS & Moyses MR (2004). Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res*, 37(4):569-75.

Turgeon JL, McDonnell DP, Martin KA and Wise PM (2004) Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science* 304:1269 –1273

Uchida S (2000) In vivo role of ClC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol*, 279:F802 –F808

Veille, J. C., M. J. Morton, K. Burry, M. Nemeth, and L. Speroff (1986). Estradiol and hemodynamics during ovulation induction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 721-724, 1986.

Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR & Hebert SC (1998). Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J Am Soc Nephrol*, 5: 1112-1119.

Vokes, T. J., N. M. Weiss, J. Schreiber, M. B. Gaskill, and G. L. Robertson (1988). Osmoregulation of thirst and vasopressin during normal menstrual cycle. *Am J Physiol. Regul Int Comp. Physiol.* 23): R641-R647.

Wagner C, Hinder M, Kramer BK, Kurtz A (1999). Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension*, 34:1101–1105.

Wallace DP, Reif G, Hedge AM, Thrasher JB & Pietrow (2004). Adrenergic regulation of salt and fluid secretion in human medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F639-F648.

Wang T & Giebiseh G (1996). Effects of angiotensin II on electrolyte transport in early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol*, 271: F143-F149.

Wang YX, Crofton JT, Liu H, Sato K, Brooks DP & Share L (1995). Estradiol attenuates the antidiuretic action of vasopressin in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 268: R951-R957.

Wang YX et al (1993). Sex differences in the antidiuretic of vasopressin in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integr Comp Physiol*, 265: R1284-R1290.

Williams JS & Williams (2003). 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6): 2364-2372.

Wong M & Moss RL (1992). Modulation of single-unit activity in the rat medial amygdala by neurotransmitters, estrogen priming and synaptic inputs from the hypothalamus and midbrain. *Synapse* 10: 94–102.

Worzala K, et al. (2001) Postmenopausal estrogen use, type of menopause, and lens opacities: the Farmingham studies. *Arch Intern Med*, 161: 1448–1454

Wu Z, Maric C, Roesch DM, Zheng W, Verbalis JG & Sanderberg K (2003). Estrogen regulates adrenal angiotensin AT₁ receptors by modulating AT₁ receptor translation. *Endocrinology*, 144: 3251-3261.

Yamaguchi N, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Hayashi Y, Yoshida M & Satoh S (2000). Interaction between norepinephrine release and intrarenal angiotensin II formation during renal nerve stimulation in dogs. *Cardiovasc Pharmacol*, 35: 831-837.

Yanagiha N, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Utsunomiya K, Liu M & Tanaka K (2005). Stimulation of catecholamine synthesis by environmental estrogenic pollutants. *Endocrinology*, 146: 256-272.

Yasin S, Costa A, Trainer P, Windle R Forsling ML & Grossman (1993). Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology*, 133: 1466-1469.

Yasuda G & Jeffries WB (1998). Regulation of cAMP production in initial and terminal inner medullary collecting ducts. *Kidney Int*, 54: 80–86,

Yasuda G, Sun L, Lee HC, Umemura S & Jeffries WB (1996). The α_1 - and α_2 -adrenoceptor subtypes in cultured rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 271: F762–F769,

Yasuda G, Sun L, Umemura S, Pettinger WA & Jeffries WB (1991). Characterization of prazosin-sensitive α_2 B-adrenoceptors expressed by cultured rat IMCD cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 261: F760–F766.

Yasuda G, Umemura S & Jeffries WB (1997). Effect of epinephrine on cAMP accumulation in cultured rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 272: F192–F197.

Yucha C & Keen M (1996) Renal regulation of extracellular fluid volume and osmolality. *ANNA J* 23:487–497.

Zacharia LC, Jackson EK, Gillespie DG & Dubey RK (2001). Increased 2-methoxyestradiol production in human coronary versus aortic vascular cells. *Hypertension*, 37: 658-662.

Zerbe RL, Miller JZ & Robertson GL (1991). The reproducibility and heritability of individual differences in osmoregulatory function in normal human subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 117: 51-59.