

**Papel da Angiotensina II no Controle da Excitabilidade  
dos Neurônios do Gânglio Nodoso**

**Thaís Helena Veiga Moreira**

**Belo Horizonte**

**2005**

**Thaís Helena Veiga Moreira**

**Papel da Angiotensina II no Controle da Excitabilidade  
dos Neurônios do Gânglio Nodoso**

Tese submetida ao Departamento de  
Bioquímica e Imunologia da Universidade  
Federal de Minas Gerais para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

**Orientador : Dr. Jader dos Santos Cruz**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão**

**Belo Horizonte**

**2005**

## Resumo

Angiotensina II (100 nM) levou a um aumento da frequência de disparo dos potenciais de ação dos neurônios do gânglio nodoso de ratos adultos. Esse efeito foi mediado pelo receptor do tipo AT1 uma vez que o mesmo foi bloqueado usando-se um antagonista específico dos receptores do tipo AT1. Estudou-se a ação desse peptídeo nas correntes de potássio e de cálcio. A angiotensina II inibiu somente a corrente de potássio do tipo IA (~50 %). Também observamos uma inibição de cerca de 50 % da corrente total de cálcio ativada por alta voltagem. Essa inibição, aparentemente, não envolve a ativação dos receptores AT1. A angiotensina II altera a dependência de voltagem para a ativação das correntes de cálcio ativadas por alta voltagem (~6 mV no sentido hiperpolarizante). A angiotensina II provavelmente não inibiu um único tipo de canal para cálcio, observamos uma inibição de 30% das correntes do tipo L e de 20% das correntes do tipo N e/ou do tipo P/Q.

A angiotensina II foi capaz de gerar aumentos transientes na concentração de cálcio no citoplasma desses neurônios. Esse aumento de cálcio foi uma consequência da ativação dos receptores do tipo AT1. O transiente de cálcio gerado pela angiotensina II depende da presença do cálcio no meio externo. Não observamos os mesmos efeitos da angiotensina II em neurônios do gânglio nodoso provenientes de animais hipertensos (SHR). Nesses animais, angiotensina II não foi capaz de alterar a excitabilidade e não produziu variações na concentração de cálcio.

## Abstract

Angiotensin II at 100 nM increased the spike frequency generation in the adult rat nodose neurons. Since AT1 receptor antagonist prevented this effect we could suggest that the AT1 receptor is responsible for the increase in excitability. We investigated if this peptide was able to modulate isolated potassium and calcium currents. Angiotensin II inhibited only the IA type potassium current (~50 %). The peptide also inhibited the high-voltage activated calcium current by 50%. This inhibition was not mediated by AT1 receptor activation. Angiotensin II was able to change the high-voltage calcium current voltage dependence for activation. It caused a shift towards the hyperpolarized membrane potentials by about 6 mV. Angiotensin II probably did not inhibit one specific type of voltage-dependent calcium channel. The L-type calcium current was inhibited by 30% and the N and/or P/Q type had an inhibition of 20%. Angiotensin II generated calcium transients in these neurons. The activation of AT1 receptor was responsible for the observed changes in the intracellular calcium levels. Surprisingly, the calcium transient evoked by the application of angiotensin II depends on the presence of calcium in the extracellular *milieu*. None of these described effects caused by angiotensin II were reproduced in spontaneously hypertensive rats (SHR).

## Lista de Figuras

<b>Figura 1- Sistema Renina-Angiotensina com as suas etapas principais.....</b>	03
<b>Figura 2- Controle da liberação de renina nas células juxtaglomerulares.....</b>	08
<b>Figura 3- Ações da angiotensina II que levam ao aumento da pressão arterial.....</b>	14
<b>Figura 4- Organização geral dos neurônios do gânglio nodoso.....</b>	22
<b>Figura 5- Set-Up usado nas medições de microfluorimetria.....</b>	52
<b>Figura 6- Parâmetros do potencial de ação dos neurônios do gânglio nodoso.....</b>	55
<b>Figura 7- Potenciais de ação em um neurônio do gânglio nodoso do tipo fásico...</b>	58
<b>Figura 8- Potenciais de ação em neurônios do tipo tônico.....</b>	59
<b>Figura 9- Bloqueio dos receptores AT1 pelo CV-113344 previne o efeito da ANG II sobre a excitabilidade.....</b>	60
<b>Figura 10- Relações densidade de corrente vs potencial de membrana.....</b>	62
<b>Figura 11- Registros da corrente de potássio do tipo IA em neurônios do gânglio nodoso.....</b>	63
<b>Figura 12- Efeito da angiotensina II (100 nM) na frequência de disparos dos neurônios nodosos na presença de 4-AP (3 mM).....</b>	65
<b>Figura 13- Angiotensina II inibe as correntes de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso.....</b>	67
<b>Figura 14- Caracterização do efeito da ANG II sobre as correntes de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso.....</b>	69
<b>Figura 15- Efeito da saralasin sobre a inibição das correntes de cálcio induzida por ANG II.....</b>	71
<b>Figura 16- Losartan não abole o efeito da ANG II.....</b>	72
<b>Figura 17- Efeito da Nifedipina (10 µM) na Inibição da Corrente de Cálcio via ANG II.....</b>	74
<b>Figura 18- Presença de ARM mensageiro de AT1 e AT2 no gânglio nodoso.....</b>	75
<b>Figura 19- ANG II aumenta a concentração de cálcio intracelular.....</b>	77
<b>Figura 20- ANG II evoca transientes de cálcio.....</b>	78
<b>Figura 21. O transiente de cálcio evocado pela ANG II dependente da presença de cálcio no meio extracelular.....</b>	79
<b>Figura 22- Efeito da ANG II nos neurônios do gânglio nodoso de animais WKY.</b>	81
<b>Figura 23- Efeito da ANG II nos neurônios do gânglio nodoso de animais SHR..</b>	82
<b>Figura 24- Medidas dos transientes de cálcio evocado pela ANG II em neurônios de animais WKY e SHR.....</b>	83
<b>Figura 25- Sumário das ações da ANG II nos neurônios do gânglio nodoso.....</b>	93

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1- Estrutura primária dos polipeptídeos angiotensinérgicos.....</b>	<b>04</b>
<b>Tabela 2- Efeitos da remoção dos genes para ECA-1; ECA-2; e ECA-1 e ECA-2 simultaneamente em camundongos.....</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 3- Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 4- Propriedades passivas dos neurônio do gânglio nodoso.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 5- Propriedades ativas dos neurônios do gânglio nodoso.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 6- Número de disparos de potenciais de ação em neurônios tônicos e fásicos do gânglio nodoso.....</b>	<b>57</b>

### Lista de Abreviações

<b>ANG II.....</b>	<b>Angiotensina II</b>
<b>4 AP.....</b>	<b>4-amino piridina</b>
<b>ARN.....</b>	<b>Ácido Ribonucleico</b>
<b>AT1.....</b>	<b>Receptor de angiotensina II do tipo AT1</b>
<b>AT2.....</b>	<b>Receptor de angiotensina II do tipo AT2</b>
<b>cDNA.....</b>	<b>DNA complementar</b>
<b>DMEM.....</b>	<b>Dulbecco's modified Eagle medium</b>
<b>dNTP.....</b>	<b>Desoxinucleotídeo trifosfato</b>
<b>DTX.....</b>	<b>Dendrotoxina</b>
<b>EGTA.....</b>	<b>Ácido etilenobis(oxietilenonitrilo) tetraacético</b>
<b>L15.....</b>	<b>Meio Leibovitz</b>
<b>MuLV.....</b>	<b>Murine Leukemia Virus Transcriptase</b>
<b>NTS.....</b>	<b>Núcleo do trato solitário</b>
<b>OD.....</b>	<b>densidade óptica</b>
<b>PCR.....</b>	<b>“Polimerase Chain Reaction”</b>
<b>RTPCR.....</b>	<b>PCR com reação de transcriptase reversa</b>
<b>SHR.....</b>	<b>“Spontaneously Hypertensive Rat”</b>
<b>SSBH.....</b>	<b>Solução Salina Balanceada de “Hanks”</b>
<b>TEA.....</b>	<b>Tetraetilamônio</b>
<b>TH.....</b>	<b>“threshold”</b>
<b>TTX.....</b>	<b>tetrodotoxina</b>
<b>WKY.....</b>	<b>Wistar Kyoto Rats</b>

## Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Abreviações.....</b>	<b>vii</b>
<b>Sumário.....</b>	<b>viii</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1-ANGIOTENSINAS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1- Sistema Renina-Angiotensina.....</b>	<b>6</b>
<b>Renina.....</b>	<b>6</b>
<b>Via da Mácula Densa.....</b>	<b>7</b>
<b>Via do Baroreceptor.....</b>	<b>9</b>
<b>Via do Receptor <math>\beta</math>-Adrenérgico.....</b>	<b>9</b>
<b>Angiotensinogênio.....</b>	<b>10</b>
<b>Enzimas Conversoras de Angiotensina (ECA-1 e ECA-2).....</b>	<b>11</b>
<b>Ações Fisiológicas da Angiotensina II.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2- Os Receptores de Angiotensina II.....</b>	<b>15</b>
<b>Receptor do Subtipo AT1.....</b>	<b>17</b>
<b>Receptor do Subtipo AT2.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2- NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1- Características Gerais dos Neurônios Sensoriais.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2- Excitabilidade dos Neurônios do Gânglio Nodoso.....</b>	<b>25</b>
<b>Características Estruturais dos Neurônios do Gânglio Nodoso.....</b>	<b>28</b>
<b>Propriedades Elétricas dos Neurônios do Gânglio Nodoso.....</b>	<b>31</b>
<b>Correntes de Sódio Operadas por Voltagem.....</b>	<b>32</b>
<b>Correntes de Cálcio Operadas por Voltagem.....</b>	<b>34</b>
<b>Correntes de Potássio Operadas por Voltagem.....</b>	<b>35</b>
<b>1.3- Angiotensinas e o Sistema Nervoso.....</b>	<b>36</b>
<b>2- OBJETIVO.....</b>	<b>40</b>
<b>2.1- OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3- MÉTODO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1- DISSECÇÃO DO GÂNGLIO NODOSO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2- CULTURA DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3- RT-PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>Isolamento do ARN.....</b>	<b>42</b>
<b>Medida de Concentração do ARN.....</b>	<b>43</b>
<b>Reação de Transcriptase Reversa.....</b>	<b>43</b>
<b>Elaboração dos Iniciadores.....</b>	<b>43</b>

<b>Reação de PCR.....</b>	<b>44</b>
<b>Separação e Visualização das Bandas.....</b>	<b>45</b>
<b>3.4- ELETROFISIOLOGIA.....</b>	<b>45</b>
<b>3.4.1- “Current Clamp”.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2- “Voltage Clamp”.....</b>	<b>47</b>
<b>Corrente de Cálcio.....</b>	<b>48</b>
<b>Corrente de Potássio.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5- IMAGEM DE CÁLCIO.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>52</b>
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1-EFEITO DA ANGIOTENSINA II NAS PROPRIEDADES PASSIVAS E ATIVAS NOS NEURÔNIOS DO GLÂNGLIO NODOSO.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2- AÇÃO DA ANGIOTENSINA II NA FREQUÊNCIA DE DISPARO DE POTENCIAIS DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3- EFEITO DA ANGIOTENSINA II SOBRE A CORRENTE DE POTÁSSIO</b>	<b>61</b>
<b>4.4- ANGIOTENSINA II INIBI AS CORRENTES DE CALCIO ATIVADAS POR ALTA VOLTAGEM.....</b>	<b>65</b>
<b>4.5- PRESENÇA DE ARN MENSAGEIRO PARA OS RECEPTORES DE DE ANGIOTENSINA II DO GÂNGLIO NODOSO.....</b>	<b>75</b>
<b>4.6- ANGIOTENSINA II CAUSA UM AUMENTO TRANSIENTE DE CÁLCIO NO CITOPLASMA DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO....</b>	<b>76</b>
<b>4.7- EFEITO DA ANGIOTENSINA II EM MODÊLOS ANIMAIS QUE DESENVOLVEM HIPERTENSAO DE MANEIRA ESPONTÂNEA.....</b>	<b>80</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>6- PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>95</b>
<b>7- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>

## 1-INTRODUÇÃO

Os neurônios do gânglio nodoso exercem a importante função de transmitir ao sistema nervoso central (SNC) informações sensoriais provenientes do sistema respiratório, digestório e cardiovascular. A terminação nervosa sensorial se localiza embutada nos órgãos desses sistemas e quando mudanças nesse ambiente ocorrem, tais como: aumento na temperatura corpórea, estímulos mecânicos, liberação de substâncias inflamatórias e/ou algésicas, como consequência, há uma mudança na excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso. A mudança na excitabilidade é decodificada nos terminais centrais como uma modificação na liberação de neurotransmissores no trato do núcleo solitário, região onde acontece a primeira sinapse proveniente dos neurônios do gânglio nodoso.

O presente trabalho teve como principal objetivo investigar a modulação da excitabilidade dos neurônios nodosos pela angiotensina II. A angiotensina II é um peptídeo sintetizado pelo sistema renina-angiotensina e apresenta uma potente ação vasoconstritora, bem como, aumento na reabsorção de sódio, o que leva a um incremento da pressão arterial. Nós verificamos que a angiotensina II é capaz de aumentar a excitabilidade dos neurônios nodosos através de uma mudança no acomodamento dos potenciais de ação. Sendo assim, nós investigamos o efeito da angiotensina II sobre as correntes iônicas dependentes de voltagem. Verificou-se então que a angiotensina II reduz a corrente total de cálcio ativada por alta voltagem, diminui de maneira seletiva uma corrente de potássio dependente de voltagem (provavelmente do tipo IA) e altera os níveis de cálcio intracelulares. Verificamos também a presença de ARN mensageiro,

tanto para receptores de angiotensina do tipo AT1 quanto do tipo AT2 no gânglio nodoso de ratos adultos.

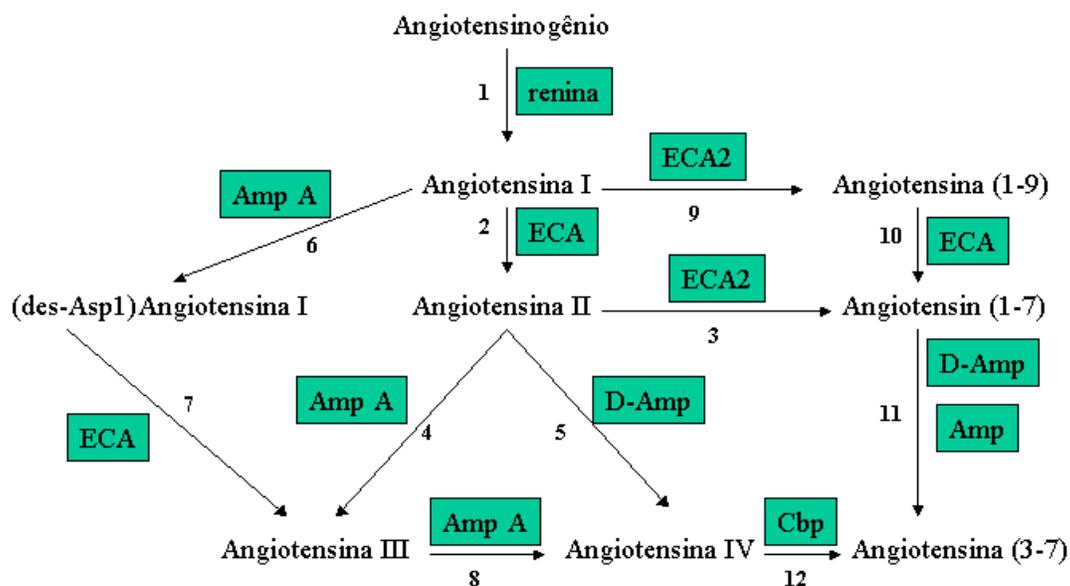
Na introdução desse trabalho foi feita uma revisão abrangente do sistema renina-angiotensina acompanhada de uma revisão mais específica sobre a fisiologia dos neurônios do gânglio nodoso. Discutiremos também as possíveis funções da angiotensina II tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. Nosso intuito foi, portanto, de primeiro revisitar alguns conceitos básicos a respeito do sistema renina-angiotensina e solidificar o que se sabe da fisiologia dos neurônios nodosos para portanto estabelecer uma justificativa para o estudo da interação entre angiotensina II e os neurônios do gânglio nodoso.

## 1.1- ANGIOTENSINAS

A angiotensina II foi isolada e estudada separadamente por um grupo norte americano e um grupo argentino no período entre 1940 e 1957 (de Gasparo *et al.*, 2000). O grupo dos EUA chamou o octapeptídeo de “Angiotonina” e o grupo argentino de “Hipertensina”. Para unificar a nomenclatura, os pesquisadores Braun-Menezes (Argentina) e Page (EUA) concordaram em adotar um nome híbrido para designar o peptídeo. Assim surgiu o nome *angiotensina*.

Subsequentemente, os componentes da cascata metabólica responsáveis pela síntese e degradação das angiotensinas foram descobertos. Resumidamente, a cascata é constituída por uma proteína precursora, o angiotensinogênio, que é clivada pela enzima renina, formando Angiotensina I. A angiotensina I é clivada pela Enzima Conversora de

Angiotensina do tipo I (ECA-1) para a formação de angiotensina II. Angiotensina II por sua vez pode sofrer a ação da enzima ECA-2 para a formação de angiotensina-(1-7), que apresenta ações fisiológicas, na maioria das vezes, antagônicas às ações da angiotensina II. Outros peptídeos podem ser formados pela ação de enzimas não específicas. Essas enzimas também têm importante função na degradação dos peptídeos ativos (Figura 1).



**Figura 1- Sistema Renina-Angiotensina com as suas etapas principais.**

- 1: Angiotensinogênio é clivado pela renina gerando o decapeptídeo angiotensina I. Este é o passo limitante na formação da angiotensina II.
- 2: Angiotensina I é clivada pela enzima Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 1 (ECA-1) para a formação de angiotensina II.
- 3: Angiotensina II é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 2 (ECA-2) para a formação de angiotensina-(1-7).
- 4: Angiotensina II é clivada pela aminopeptidase A formando angiotensina III.
- 5: Angiotensina II é convertida em angiotensina IV através da ação da enzima aminopeptidase D.

- 6: Angiotensina I é convertida em (des-Asp<sup>1</sup>)-angiotensina I pela enzima aminopeptidase A.
- 7: (des-Asp<sup>1</sup>) Angiotensina I é metabolizada pela ECA-1 em angiotensina III.
- 8: Angiotensina III é convertida em angiotensina IV através da ação da aminopeptidase A
- 9: Angiotensina I é convertida em angiotensina (1-9) pela enzima ECA-2
- 10: Angiotensina (1-9) é convertida em angiotensina-(1-7) através da enzima ECA-1
- 11: Angiotensina-(1-7) é convertida em angiotensina (3-7) pela enzima aminopeptidase ou aminopeptidase D
- 12: Angiotensina IV é convertida em angiotensina (3-7) pela enzima carboxipeptidase

Polipeptídeo	Sequência de amino-ácidos
Angiotensinogênio	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser-R
ANG I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu
ANG II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
ANG III	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
ANG IV	Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
ANG-(1-7)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro

**Tabela 1- Estrutura primária dos polipeptídeos angiotensinérgicos.**

Classicamente, entende-se o sistema renina-angiotensina como sendo um sistema endócrino convencional onde o fígado produz o angiotensinogênio, que é liberado na circulação onde será hidrolisado pela enzima renina que foi produzida nos rins e que também é liberada na circulação sanguínea, formando-se angiotensina I. Quando angiotensina I encontra ECA nos epitélios ou ECA circulante esse peptídeo é clivado e angiotensina II é produzida. Contudo essa visão é uma simplificação do que realmente ocorre. Além desse sistema geral de produção de angiotensina II, certos órgãos possuem várias partes da maquinaria necessária para produção local de angiotensina II.

É importante diferenciar um sistema extrínscico para a produção local de angiotensina II de um sistema intrínscico para a produção de angiotensina II. No primeiro, o extrínscico, foi proposto que a renina de origem renal e circulante é captada pelas células

da parede arterial e, pelas células do miocárdio, bem como por outros tecidos, e a conversão do angiotensinogênio hepático em angiotensina I seguida da conversão de angiotensina I em angiotensina II ocorre primariamente na superfície da parede vascular e não na circulação propriamente dita (Danser, 2003; Danser *et al.*, 1994). Dentro dessa visão, a captação local de renina, tanto no tecido vascular quanto no miocárdio, é um passo importante na produção local de angiotensina II. Porém outros pesquisadores não encontraram evidências para a ligação local de renina nos tecidos (Hu 1993). É importante enfatizar, no entanto, que a maior parte da angiotensina II presente no miocárdio é sintetizada localmente (van Kats *et al.*, 2000) porém, os níveis de ARN mensageiro para a renina são praticamente indetectáveis. Em preparações de coração isolado só há produção de angiotensina II se esse órgão for perfundido com uma solução que contenha renina (de Lannoy *et al.*, 1997) .

No sistema intrínscio para a produção de angiotensina II foi proposto que angiotensina II pode ser totalmente produzida localmente nos tecidos independente da via hepato-renal. As possibilidades dessa via ter uma importância grande no miocárdio e nos vasos é pequena visto que a produção de renina nesses locais é indetectável, apesar de em várias culturas celulares provenientes desses tecidos as células serem capazes de produzir renina, angiotensinogênio, ECA-1 e/ou angiotensina I, II e III (Phillips *et al.*, 1993; Saavedra, 1992b; Dzau, 1993b; Baker *et al.*, 1992). Porém em outros órgãos, principalmente no cérebro, essa é uma possibilidade real já que a renina pode ser detectada em neurônios quando técnicas mais sensíveis são usadas. Recentemente, usando-se um modelo animal onde a região promotora do gene para renina estava associada a “green fluorescent protein” (eGFP), o sinal de fluorescência foi detectado em

neurônios nas regiões do cérebro importantes para o controle das funções cardiovasculares (Lavoie *et al.*, 2004). Essa produção não contribui significativamente para os níveis séricos das angiotensinas mas alguns estudos mostram que é de extrema importância para a fisiologia de alguns órgãos (Saavedra, 1999a). Essa hipótese de produção local de angiotensinas, embora ainda controversa, tem gerado um grande interesse por parte dos pesquisadores.

### **1.1.1- Sistema Renina-Angiotensina.**

O sistema renina angiotensina é de extrema importância na regulação da pressão arterial tanto a curto quanto a longo prazo. Fatores que levam à diminuição da pressão arterial estimulam a liberação de renina, levando à produção de angiotensina II. A angiotensina II age através de diversos mecanismos, porém de maneira coordenada, para controlar a pressão arterial. A curto prazo o aumento da resistência vascular é a resposta fisiológica responsável pelo aumento da pressão arterial. A longo prazo as ações da angiotensina II, principalmente no sistema renal, são de importância vital para a manutenção da pressão arterial.

#### **Renina**

O passo determinante na formação de angiotensina II é a clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I. A enzima responsável por essa clivagem, como já foi dito anteriormente, é a renina. A renina é uma protease aspártica que ataca um número restrito de substratos, tendo como principal alvo o angiotensinogênio. Nessa proteína, a renina hidrolisa a ligação peptídica entre os amino ácidos 10 e 11 (leucina e valina) na porção N-terminal, gerando assim angiotensina I (Tabela 1).

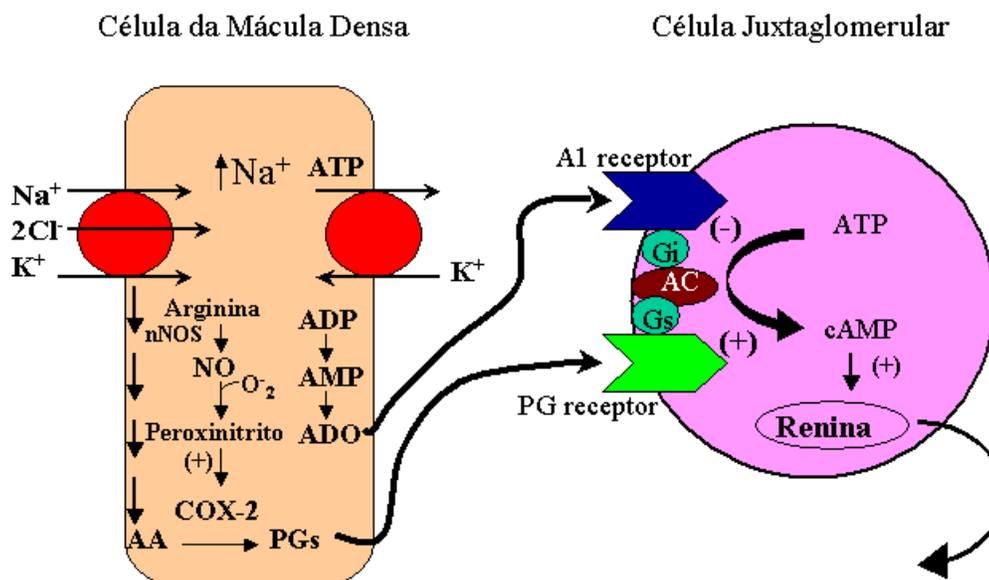
A renina é sintetizada como uma pró-enzima inativa composta de 406 resíduos de amino ácidos. Ela sofre processamento pós-traducional onde 43 resíduos de amino ácidos são retirados da extremidade amino/carboxi terminal formando assim a enzima ativa. Renina e pró-renina são sintetizadas e armazenadas nas células do complexo juxtaglomerular. A meia vida da renina circulante é de cerca de 15 minutos.

Como a quantidade de renina circulante influencia de forma decisiva na taxa de produção de angiotensina II, a liberação de renina precisa ser bem controlada. Três vias controlam diretamente essa liberação, sendo que duas delas agem diretamente sobre os rins; a via da mácula densa e a via do baroreceptor renal. A terceira via de controle localiza-se no sistema nervoso central e é dependente da ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

### **Via da Mácula Densa**

A mácula densa é uma coluna epitelial que está localizada adjacente às células do complexo juxtaglomerular, entre as arteríolas aferentes e eferentes do glomérulo. Quando ocorrem mudanças na reabsorção de  $\text{Na}^+$ , há liberação de moléculas sinalizadoras, o que por sua vez leva à modulação da secreção de renina (ver Figura 2). O aumento na reabsorção de sódio pelas células da mácula densa leva a liberação de adenosina que ativa os receptores do tipo A1 presentes nas células juxtaglomerulares. A ativação desses receptores leva a inibição da secreção de renina (Itoh & Carretero, 1985; Weihprecht *et al.*, 1994). Quando a absorção de sódio está diminuída há ativação da via de síntese de prostaglandinas o que por sua vez se ligam aos seus receptores presentes nas células juxtaglomerulares levando ao aumento na liberação de renina (Gerber *et al.*, 1982; Greenberg *et al.*, 1993). Um conjunto de evidências apontam para uma participação

importante da cicloxigenase induzida (COX-2) e da óxido nítrico sintase neuronal (ONSn) na formação das prostaglandinas. Em primeiro lugar, a COX-2 está presente somente nas células da mácula densa e sua síntese é aumentada durante uma dieta restrita de sódio (Harris *et al.*, 1994). Os inibidores seletivos da COX-2 bloqueiam o aumento da liberação de renina causado pelas células da mácula densa (Traynor *et al.*, 1999). A ONSn se comporta como a COX-2, é expressa nas células da mácula densa e sua síntese é aumentada com uma dieta pobre em sódio (Beierwaltes, 1997). O mecanismo provável pelo qual o aumento de sódio leva ao aumento da biossíntese de prostaglandinas é: aumento da ONSn o que leva à síntese de peroxinitrito que por sua vez ativa a COX-2 que aumenta a produção de prostaglandinas. As prostaglandinas se ligam aos seus receptores nas células juxtaglomerulares e, em resposta, há um aumento da liberação de renina .



**Figura 2- Controle da liberação de renina nas células juxtaglomerulares.** Ácido Araquidônico (AA), Prostaglandinas (PGs), Adenosina (ADO), Adenilil-Ciclase (AC).

### Via do Baroreceptor Renal

Aumento ou diminuição da pressão sanguínea nas veias pré-glomerulares inibem ou estimulam, respectivamente, a liberação de renina. A diminuição na tensão nas paredes das arteríolas é o sinal preponderante para o aumento na liberação de renina. Há algumas evidências na literatura de que o aumento da pressão nessas arteríolas leva a diminuição da síntese de prostaglandinas pelas células da mácula densa (Data *et al.*, 1978; Linas, 1984). Porém uma ativação direta de canais iônicos ativados por estiramento pode ter uma participação importante na via do baroreceptor renal (Carey *et al.*, 1997).

### **Via do Receptor $\beta$ -Adrenérgico**

Essa via é mediada pela liberação de norepinefrina pelos nervos simpáticos pós-ganglionares, que por sua vez ativa receptores  $\beta_1$  nas células juxtaglomerulares liberando assim renina.

A modulação da liberação de renina sofre uma regulação através de “feed-back” causado pela própria síntese de angiotensina II. As células juxtaglomerulares apresentam receptores para angiotensina II (tipo AT1) que, quando ativados, inibem a liberação de renina. Esse “feedback” negativo é chamado de “short loop negative feedback”. Outra forma de modulação da liberação de renina é o “long loop negative feedback”, onde se observa que angiotensina II causa aumento da pressão arterial, esse aumento leva a inibição da liberação de renina através de: (1) ativação dos baroreceptores renais reduzindo o tônus simpático, (2) aumento da tensão nas arteríolas pré-ganglionares e, (3) redução da reabsorção de  $\text{Na}^+$  o que aumenta a concentração de  $\text{Na}^+$  na mácula densa e portanto, ativa a liberação de prostaglandinas que inibem a liberação de renina.

Além dessas vias clássicas de liberação da renina, um grande número de evidências experimentais tem reforçado a hipótese de produção extra-renal da renina, principalmente no sistema nervoso central, como já foi discutido anteriormente.

### **Angiotensinogênio**

O angiotensinogênio, substrato principal da renina, é uma glicoproteína de estrutura globular contendo cerca de 13 a 14 % de carboidratos em sua constituição química. Sua massa molecular varia entre 55 e 60 kDa. Também é encontrado na circulação o angiotensinogênio de alta massa molecular (350 a 500 kDa) na forma de complexos com outras proteínas plasmáticas. Em humanos, o angiotensinogênio é

sintetizado como uma pré-proteína com um peptídeo sinal de 24 ou 33 amino ácidos (Kageyama *et al.*, 1984). A sua síntese ocorre primariamente no fígado e sua liberação se dá de forma constitutiva. ARN mensageiro para o angiotensinogênio foi também encontrado no tecido adiposo, no cérebro e nos rins (Navar & Nishiyama, 2004;Fruhbeck, 2004;Baltatu *et al.*, 2004). A sua síntese pode ser estimulada por inflamação, insulina, estrógeno, glucocorticóides, hormônios da tireóide e angiotensina II (Ben Ari & Garrison, 1988).

O nível circulante de angiotensinogênio fica próximo aos valores de  $K_m$  da renina portanto pequenas alterações nos níveis circulantes de angiotensinogênio podem levar a mudanças drásticas na concentração de angiotensina II e, conseqüentemente, na pressão arterial. Estudos com animais modificados geneticamente onde o gene que codifica para o angiotensinogênio foi removido ou o número de cópias é menor, notou-se que há uma correlação direta entre a pressão arterial e a quantidade de angiotensinogênio (Kim *et al.*, 1995). A presença de mutações no gene que codifica para o angiotensinogênio está associada com o aumento plasmático dessa proteína, bem como o aparecimento de hipertensão essencial (Jeunemaitre *et al.*, 1992;Kunz *et al.*, 1997;Staessen *et al.*, 1999).

### **Enzimas Conversoras de Angiotensina (ECA-1 e ECA-2)**

A ECA-1, é uma glicoproteína transmembrana, com a extremidade  $NH_2$ -terminal voltada para fora da célula e a  $COOH$ -terminal na região intracelular. A porção extracelular apresenta dois domínios catalíticos com uma região para ligação de  $Zn^{2+}$  (Soubrier *et al.*, 1988). A ECA-1 circulante representa uma fração da ECA-1 que foi clivada por secretases na região próxima a região transmembrana (Beldent *et al.*, 1995). A ECA-1 é uma enzima com baixa especificidade que quebra dipeptídeos apresentando

sequências diversas. Os substratos preferidos pela enzima tem um grupo carboxílico livre na região carboxi-terminal e o resíduo de prolina não pode ser o penúltimo amino ácido. Angiotensina II não se enquadra nesse perfil e portanto a ECA é incapaz de degradar angiotensina II. Contudo a ECA degrada bradicinina e kalidina, peptídeos com ação vasodilatadora. Inibidores da ECA estão sendo usados vastamente no tratamento da hipertensão e recentemente essas drogas foram introduzidas também no tratamento de patologias cardíacas (Boehm & Nabel, 2002).

Em 2000 dois trabalhos, Donoghue e col. (Donoghue *et al.*, 2000) e Tipnis e col. (Tipnis *et al.*, 2000), introduziram um novo nível de complexidade ao SRA com a descrição da primeira enzima homóloga a ECA. O primeiro grupo a chamou de ECA-2 e o segundo de ECA-h. Embora a sequência de amino-ácidos no domínio catalítico tenha 42% de homologia, ECA-1 e ECA-2 apresentam especificidade para substratos diferentes. Enquanto ECA-1 leva à produção do peptídeo vasoconstritor angiotensina II, a ECA-2 está envolvida na produção de um peptídeo vasodilatador, angiotensina-(1-7) (Figura 1) , portanto apesar da similaridade molecular dessas enzimas o resultado fisiológico de suas ações é oposto.

Em um conjunto de experimentos elegantes, Crackower e colaboradores (Crackower *et al.*, 2002), estudaram a função fisiológica da ECA-2 usando dois modelos animais, um onde o gene responsável pela ECA-2 foi removido e outro onde, tanto o gene da ECA-1 quanto da ECA-2 foram removidos. Em primeiro lugar eles mostraram que o gene da ECA-2 localiza-se no cromossoma X tanto em humanos quanto em ratos. Nos animais que não expressavam a ECA-2 foi observado que o controle da pressão arterial não era influenciado, porém as demais funções cardíacas estavam modificadas e

os genes induzidos por hipóxia estavam com a sua expressão aumentada de forma significativa. A concentração de angiotensina II estava aumentada nesses animais apontando para um contrabalanço da ECA-1 pela ECA-2 como pode ser visto no diagrama da Figura 1. Como ambas enzimas agem no mesmo substrato primário, pode haver uma competição nesse passo, além disso a ECA-2 também degrada angiotensina II formada pela ECA-1. Para determinar se o fenótipo cardíaco observado era consequência direta do aumento de angiotensina II foi usado então um modelo animal onde ambas enzimas, ECA-1 e ECA2, seriam removidas e conseqüentemente não haveria angiotensina II circulante. Nesses animais o fenótipo cardíaco foi abolido e não foi observada alteração significativa na pressão arterial (Tabela 2). Essas evidências não só apontam para uma função direta da angiotensina II na fisiologia cardiovascular como também reforçam a importância de um balanço entre as atividades das enzimas ECA-1 e ECA-2.

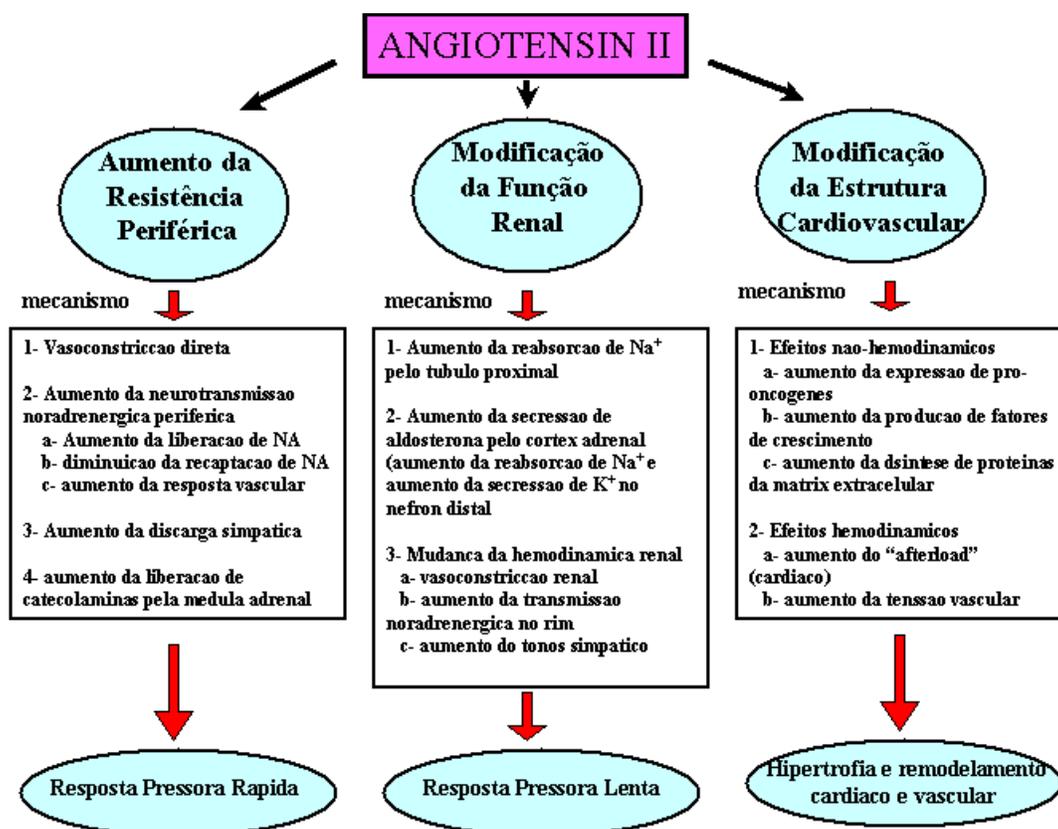
ECA-1 <sup>-/-</sup>	ECA-2 <sup>-/-</sup>	ECA-1/ECA-2 <sup>-/-</sup>
Redução na pressão arterial	Pressão arterial normal	Redução na pressão arterial
Fisiologia cardíaca normal	Fisiologia cardíaca modificada	Fisiologia cardíaca normal
Alteração na morfologia renal	Desenvolvimento e arquitetura normal	Não testado
Concentração da urina modificada	Não testada	Não testada
Redução na fertilidade masculina	Fertilidade masculina normal	Não testado

**Tabela 2- Efeitos da remoção dos genes para ECA-1; ECA-2; e ECA-1 e ECA-2 simultaneamente em camundongos. (Danilczyk *et al.*, 2003)**

### **Ações Fisiológicas da Angiotensina II**

Além das ações periféricas da angiotensina II que estão de certa maneira muito bem estudadas existe também um corpo de efeitos importantes no sistema nervoso

central. Os estudos dos efeitos da angiotensina II no cérebro têm sido concentrados principalmente nos centros (núcleos) importantes para o controle da pressão arterial.



**Figura 3- Ações da angiotensina II que levam ao aumento da pressão arterial.**

Variações pequenas na concentração circulante de angiotensina II causam um aumento abrupto da pressão arterial. Quando uma dose única de angiotensina II é administrada intravenosamente a pressão arterial aumenta numa questão de segundos, chegando ao platô máximo e retorna aos níveis normais em minutos. Esse aumento rápido da pressão arterial é dado basicamente devido ao aumento da resistência vascular

periférica e esse efeito é de extrema importância em eventos de queda da pressão aguda, como por exemplo numa hemorragia. Embora angiotensina II cause um aumento da força de contração cardíaca diretamente através da *facilitação* da abertura de canais para cálcio operados por voltagem e, indiretamente, através do aumento da frequência cardíaca (via aumento do tônus simpático). Em resposta ao aumento rápido da pressão arterial ocorre uma ativação dos baroreceptores o que, por sua vez, diminui o tônus simpático e isso leva ao aumento do tônus vagal. Portanto angiotensina II pode causar aumento, diminuição ou não causar mudanças na contração cardíaca, frequência cardíaca, e no débito cardíaco. Este modo de ação complexo parece depender do estado fisiológico.

A angiotensina II também causa uma resposta pressora lenta o que ajuda a estabilizar a pressão arterial a longo prazo. A perfusão contínua de doses supra-pressoras de angiotensina II gradualmente aumenta a pressão arterial. No entanto, esse efeito requer dias para ser observado (Brown *et al.*, 1981). Provavelmente esse efeito é devido a uma diminuição da função da excreção renal o que leva a um deslocamento da curva da pressão natriurética renal para a direita.

A angiotensina II também causa estimulação da liberação de endotelina I e da produção de ânions superóxidos (Rajagopalan *et al.*, 1997; Laursen *et al.*, 1997) o que pode contribuir para o efeito pressor lento. Além da modulação da pressão arterial, angiotensina II participa das várias etapas do remodelamento do sistema cardiovascular. É importante notar que há uma hipertrofia vascular e cardíaca em resposta a angiotensina II e essa ação tem sido vastamente estudada (Zhu *et al.*, 2003; Wagenaar *et al.*, 2002). A Figura 3 mostra as três principais vias pelas quais angiotensina II causa mudanças na pressão arterial.

### 1.1.2- Os Receptores de Angiotensina II

Três grupos trabalhando de forma independente comprovaram farmacologicamente a existência de dois subtipos de receptores para angiotensina II, AT1 e AT2 (Whitebread *et al.*, 1989;Chiu *et al.*, 1989;Speth & Kim, 1990). Subsequentemente esses receptores foram nomeados pela “High Blood Pressure Research Council” e “International Union on Pharmacology Commmittee on Receptor Nomenclature and Drug Classification” e passaram a se chamar AT1 e AT2. Ambos fazem parte da família de receptores de sete regiões transmembrana acoplados à proteínas G. Algumas evidências apontam para um terceiro receptor de angiotensina II. Estudos em uma linhagem celular de neuroblastoma mostraram que a ligação de angiotensina II não era inibida nem por antagonistas de AT1, nem por antogonistas de AT2 (Chaki & Inagami, 1992). Esse receptor vem sendo chamado de sítio não-AT1/não-AT2.

Foi evidenciado que os receptores AT1 eram responsáveis por mediar basicamente todos os efeitos estimulatórios conhecidos da angiotensina II como: 1) aumento da pressão arterial, 2) retenção de sódio, 3) aumento da secreção de vasopressina e aldosterona e 4) estimulação do crescimento e proliferação celular (Gallinat *et al.*, 2000a). Já os receptores AT2 tiveram uma história diferente, a princípio os pesquisadores não conseguiam atribuir funções fisiológicas para esse receptor portanto surgiu a teoria que os receptores AT2 tinham uma função de “clearance” (Dudley *et al.*, 1991). Contudo, recentemente esse subtipo de receptor tem sido o alvo de diversos estudos com o intuito de desvendar a sua real função fisiológica. Para tal a sua via de transdução de sinal foi identificada bem como a sua estrutura molecular. Os receptores AT2 mediam uma ação anti-proliferativa e apoptótica da angiotensina II. Uma hipótese

que vem ganhando adeptos é a de que os receptores AT2, quando ativados, gerariam uma ação oposta àquela dos receptores AT1 principalmente ao que diz respeito ao crescimento celular, aumento da pressão arterial e injeção de líquidos, portanto os receptores AT2 podem ter uma importância fundamental em contrabalançar as ações da angiotensina II dependentes da ativação dos receptores AT1 (Gallinat *et al.*, 2000b).

### **Receptores do Subtipo AT1**

Os receptores AT1 contém cerca de 359 resíduos de amino-ácidos tanto a forma que é expressa em humanos quanto em roedores. Em humanos ele está localizado no cromossoma 3. Existem descritas duas isoformas para os receptores AT1 em roedores, AT1-A e AT1-B, que estão localizados respectivamente nos cromossomas 17 e 2 em ratos e nos cromossomas 13 e 2 em camundongos. As isoformas A e B apresentam 95% de identidade (De Gasparo *et al.*, 2000).

O receptor AT1-A é codificado por um gene de aproximadamente 84 kb apresentando em sua estrutura 3 introns e 4 exons, o terceiro exon (2 kb) contém os 1077 pares de bases responsáveis pela codificação da cadeia polipeptídica que forma o receptor maduro (Langford *et al.*, 1992; Murasawa *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 1993). O gene para o receptor AT1-B apresenta um tamanho de aproximadamente 15 kb, e contém 2 introns e 3 exons (Burson *et al.*, 1994). Os receptores AT1-A são expressos no coração, aorta, pulmão, fígado, testículo, cérebro, pituitária, rim e adrenal, enquanto que os receptores AT1-B têm a sua expressão limitada à pituitária e adrenal (De Gasparo *et al.*, 2000).

Outra característica importante é a capacidade de hormônios modularem a expressão desses receptores, tais como glucocorticóides, mineralocorticóides, estrógenos e insulina (De Gasparo *et al.*, 2000).

De um modo geral os receptores AT1 estão primariamente, mas não exclusivamente, acoplados à proteína G insensível à toxina pertussis ativando a via de sinalização da fosfolipase C levando ao aumento de cálcio intracelular. Outros efetores podem ser ativados tais como fosfolipase D, fosfolipase A2, adenilil-ciclase e canais iônicos, tais como canais para cálcio ativados por voltagem dos tipos L e T (Macrez *et al.*, 1997b). Além de ativar uma grande variedade de vias de sinalização a ligação de angiotensina II ao receptor AT1 induz uma desensibilização e internalização do receptor, como acontece com vários outros receptores que estão acoplados à proteínas G.

A interação do resíduo de tirosina na posição 4 da angiotensina II com o resíduo de asparagina 111 do receptor AT1, e da interação da fenilalanina 8 da angiotensina II com a histidina 256 do receptor AT1 permite a mudança de conformação do AT1 da forma inativa para uma forma ativa (Noda *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1995).

Os receptores AT1, como muitos RAPG que mobilizam cálcio, sinalizam através do acoplamento com a proteína  $G_{q/11}$  que ativa a fosfolipase C- $\beta$  (FLP C- $\beta$ ) levando a hidrólise de fosfoinosítídeos que produzem o inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3 se difunde rapidamente pelo citosol e ativa os canais para cálcio presentes na membrana do retículo endoplasmático. O DAG por sua vez age ativando a proteína kinase C.

Em cultura de células de músculo liso provenientes de ratos há ativação predominante da FLP C- $\gamma$  ao invés da FLP C- $\beta$  quando angiotensina II é usada para estimular os receptores AT1. Essa resposta é dependente da fosforilação do resíduo de tirosina da FLP C- $\gamma$  que é distinto do processo usual de ativação da FLP C- $\beta$  por RAPG.

Em miócitos da veia porta de ratos a presença de angiotensina II leva a ativação de canais para cálcio ativados por voltagem do tipo L via o acoplamento dos receptores AT1 com um tipo de proteína G denominado de  $G_{12/13}$  insensível à pertussis toxina (Macrez *et al.*, 1997a). Porém na glândula pituitária, rins, fígado, e na zona glomerulosa da adrenal os receptores AT1 estão acoplados à proteína  $G_{i/o}$  que é sensível à pertussis toxina (De Gasparo *et al.*, 2000).

Além das ações rápidas da angiotensina II induzidas através da ativação da fosfolipase C levando a um aumento de cálcio intracelular; angiotensina II também pode levar a ativação da cascata de sinalização comumente associada aos receptores para fatores de crescimento. Essas ações incluem a ativação da fosfolipase C- $\gamma$  e subsequentemente a mobilização de outras proteínas e enzimas efetoras tais como: pp<sup>60c-src</sup>, pp<sup>120</sup>, pp<sup>125FAK</sup>, JAK2, STAT, paxilin, TYK2 e MAPK (Marrero *et al.*, 1996).

### **Receptores do Subtipo AT2**

Os receptores AT2 apresentam cerca de 34% de similaridade em relação aos receptores AT1. O receptor AT2 possui aproximadamente 363 resíduos de amino-ácidos e seu gene está localizado no cromossoma X tanto em humanos quanto em roedores (De Gasparo *et al.*, 2000). Como já foi mencionado a clonagem do receptor AT2 foi uma tarefa árdua, já que a estratégia usada a princípio foi o “screening” de bibliotecas de ADNc usando-se sondas baseadas no receptor AT1. Como a homologia entre os dois receptores é pequena não foi possível identificar de forma clara os receptores AT2 com esse método. Usando bibliotecas de expressão, Kambayashi e Nakajima em 1993 clonaram, independentemente, o ADNc que codificava para o receptor AT2. Logo depois

o gene para este receptor foi identificado (Ichiki *et al.*, 1994a; Koike *et al.*, 1994a) e verificou-se que ele é constituído de três exons. Toda a região codificadora está contida no terceiro exon. A expressão do receptor AT2 encontra-se em altos níveis na fase embrionária, declinando abruptamente depois do nascimento na maioria dos tecidos com exceção: do útero, da adrenal, do coração e de algumas áreas do cérebro, principalmente na amígdala e *locus coeruleus*. A expressão dos receptores AT2 pode ser modulada por diferentes fatores de crescimento e insulina.

As funções fisiológicas do AT2 ainda não são bem entendidas portanto essa é uma área de intensa investigação. Em estudos onde animais geneticamente modificados que expressam pouco, ou que não expressam ou que ainda “super”-expressam os receptores do tipo AT2 foram de grande importância para se tentar entender o papel dos AT2. Quando os receptores AT2 tinham uma expressão muito acima do considerado normal, não foi observado mudanças morfológicas ou funcionais no miocárdio, porém quando angiotensina II era infundida a pressão arterial caía, exercendo paradoxalmente um efeito cronotrópico (Masaki *et al.*, 1998). Em animais onde a expressão dos receptores AT2 era completamente inibida, observou-se que a pressão arterial estava elevada e houve um aumento da sensibilidade vascular à angiotensina II (Ichiki *et al.*, 1994b; Koike *et al.*, 1994b; Hein *et al.*, 1995b). Esse fenótipo sugere uma função protetora do receptor AT2 e/ou um contrabalanço para as ações da angiotensina II no receptor AT1. Um fato interessante observado nesses animais foi a “super”-expressão considerada de natureza compensatória dos receptores AT1 que em parte poderia explicar os efeitos observados. Outra característica que chamou a atenção dos pesquisadores foi a

diminuição no comportamento exploratório quando esses animais eram introduzidos em um novo ambiente.

As células que expressão exclusivamente os receptores AT2 para angiotensina II não têm a capacidade de mobilizar cálcio dos estoques intracelulares e nem de aumentar AMPc, portanto é improvável que esses receptores estejam acoplados à proteína  $G_q$  acoplada a FLP C- $\beta$  ou à  $G_i$  levando a ativação ou a inibição da adenilil-ciclase (De Gasparo *et al.*, 2000). A literatura sugere que os receptores AT2 estão acoplados à proteína  $G_i$  sensível à toxina pertussis, porém alguns estudos mostram que o receptor AT2 pode ativar vias de transdução de sinal independente de proteína G, como é o caso da estimulação de fosfatases (Gallinat *et al.*, 2000b). Em cardiomiócitos de ratos neonatos, em epitélio do túbulo proximal de coelho, e em cultura primária de neurônios a ação da angiotensina II via receptor AT2 leva a um aumento da atividade da fosfolipase A2 (FLP-A2) o que leva a um aumento na produção do ácido araquidônico. Tal efeito foi abolido pela toxina pertussis. A ativação dos receptores do tipo AT2 causam estimulação das fosfatases o que em alguns tipos celulares é dependente de proteínas G (De Gasparo *et al.*, 2000).

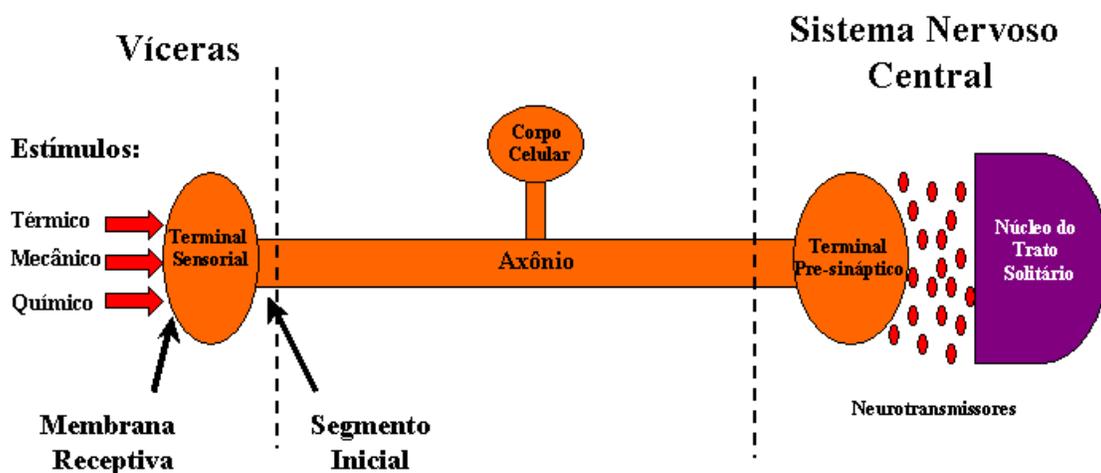
## **1.2- NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO**

### **1.2.1- Características Gerais dos Neurônios Sensoriais**

Os neurônios aferentes primários transferem informações dos receptores sensoriais periféricos para o sistema nervoso central (SNC). Essa comunicação depende de três processos fisiológicos: i) a transdução de estímulos físico-químicos, percebidos

pelos receptores especializados localizados nos terminais sensoriais, ii) a condução do potencial de ação pelos axônios; iii) uma segunda transdução do processo no terminal sináptico no SNC, onde a invasão dos potenciais de ação nas células pré-sinápticas são convertidos em quantidades diferenciadas de neurotransmissores liberados na fenda sináptica (Figura 4 mostra a organização geral dos neurônios do gânglio nodoso)

### Organização Geral dos Neurônios do Gânglio Nodoso



**Figura 4- Organização geral dos neurônios do gânglio nodoso**

A função sensorial depende do controle da excitabilidade nos receptores do terminal sensorial e na região pré-sináptica onde o “ganho” do processo de transdução vai ser determinado através das propriedades elétricas dos neurônios.

Em vertebrados o SNC reside em um compartimento isolado onde o ambiente é altamente regulado. Para obter informações a respeito das condições fisiológicas do corpo

fora desse compartimento (SNC) ou ainda do ambiente externo, o SNC depende dos neurônios sensoriais para comunicar as informações providas da periferia. Apesar dos neurônios sensoriais apresentarem uma grande variedade no que diz respeito às suas especializações eles compartilham a propriedade de codificar um estímulo sensorial apropriado numa mensagem neural que pode ser comunicada ao SNC. A transformação de um estímulo sensorial em um sinal elétrico é um processo conhecido como transdução sensorial. Nos neurônios do gânglio nodoso a transdução ocorre em um sítio altamente especializado dentro do terminal periférico e distante do SNC. O axônio que conecta o terminal sensorial ao SNC não é um bom condutor elétrico, portanto o neurônio sensorial não pode utilizar as propriedades de condução passivas ou sinais elétricos análogos como base de sua mensagem neuronal. Porém o sistema nervoso desenvolveu um aparato funcional onde um sinal elétrico de natureza graduada pode ser transformado em um impulso elétrico do tipo tudo-ou-nada, o potencial de ação, onde a frequência de geração é uma função da força da resposta sináptica. Esses impulsos são propagados ativamente pelo axônio até o SNC onde o terminal pré-sináptico pode processar o impulso aferente num segundo sinal que também pode ser graduado. Esse sinal graduado é comunicado a neurônios secundários através da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

A transdução sensorial é dependente das propriedades que governam os processos que conectam o estímulo a excitabilidade dos neurônios sensoriais. Essa conexão pode servir como base para uma classificação dos neurônios sensoriais em: primários, secundários e terciários. Os neurônios que são excitados diretamente por um estímulo específico são considerados primários, como exemplo temos os neurônios

mecanoceptivos, termocceptivos e quimioceptivos do gânglio nodoso (também classificados como viscerosensoriais) e neurônios da raiz dorsal (os somatosensoriais). Os neurônios secundários são ativados indiretamente por células que contêm os receptores primários, os quais respondem ao estímulo. A estimulação dos neurônios da via auditiva pelas células especializadas da cóclea constitui-se em um bom exemplo. Essa conexão pode envolver uma célula receptora intermediária, como é o caso da retina de vertebrados, onde a célula receptora primária (bastonetes e cones) estimulam células intermediárias (células amácrinas e horizontais) que por sua vez estimulam os neurônios sensoriais relacionados à visão. Estes neurônios, podem ser classificados como neurônios sensoriais terciários. Como já mencionado, os neurônios do gânglio nodoso comportam-se tipicamente como neurônios sensoriais primários, contudo os neurônios nodosos também podem ser estimulados pela liberação de substâncias por outras células, tais como células do sistema imune que quando ativadas (moore ) liberam substâncias químicas que podem estimular os neurônios do gânglio nodoso. Portanto, dependendo do estímulo, os neurônios nodosos podem se comportar como um neurônio sensorial primário ou secundário.

O modo de transdução de um sinal em um neurônio sensorial primário dá-se tipicamente quando o estímulo age diretamente na membrana da célula receptiva, que possui um aparato adequado para responder de maneira específica ao estímulo, como resultado há uma mudança no potencial da membrana. Essa mudança é chamada de potencial gerador e é o resultado de uma corrente iônica transmembrana (chamada de corrente geradora) produzida pelo estímulo que induziu a ativação da condutância iônica na membrana receptiva. O potencial gerador é de natureza graduada, a resposta é não

propagável e cuja magnitude é uma função simples da intensidade do estímulo. A membrana receptiva é eletricamente não excitável portanto incapaz de gerar um potencial de ação. Dessa maneira o potencial gerador tem que ser conduzido passivamente para o segmento inicial, a região de transição entre o corpo celular e o axônio. Esta região quando despolarizada o suficiente pode gerar um potencial de ação.

O segundo passo na transdução é codificar o potencial gerador numa mensagem neural. A função da membrana receptiva é identificar o estímulo sensorial primário, como a função da codificação é transformar esse estímulo numa “linguagem” que o SNC reconheça. Após o estímulo alguns neurônios sensoriais simplesmente aumentam a frequência da atividade elétrica espontânea, enquanto outros disparam um único potencial de ação (neurônios fásicos) ou uma sequência de potenciais de ação (neurônios tônicos). O que determina as características dessa linguagem, em grande parte, é o estado de excitabilidade do segmento iniciador, a região que conecta o axônio e a membrana receptiva. A chance de um estímulo gerar um ou vários potenciais de ação pode ser influenciada por diversos fatores.

### **1.2.2- Excitabilidade dos Neurônios do Gânglio Nodoso**

Os sinais elétricos do sistema nervoso resultam da abertura de diversos canais iônicos. O fluxo iônico constitui a corrente elétrica que produz uma mudança na diferença de potencial da membrana. As propriedades passivas dessa atividade elétrica podem ser caracterizadas completamente em termos da 1ª lei de Ohm, que estabelece uma relação simples entre corrente (I), voltagem (V) e resistência (R).

Já as propriedades elétricas ativas estão relacionadas com os mesmos termos mas com um adicional de complexibilidade que envolve a dependência de voltagem e de tempo para as mudanças na condutância da membrana. Essa dependência de tempo e de voltagem é criada pelas características das propriedades estruturais dos canais iônicos, que são os principais contribuidores para a grande variedade na atividade fisiológica observada em neurônios.

O estado de excitabilidade é indicado pela habilidade de uma corrente de natureza despolarizante em deflagrar um potencial de ação, através de uma despolarização acima do limiar de excitabilidade (“threshold”), onde a permeabilidade da membrana passa a ser dominada por uma condutância regenerativa ao sódio. O **limiar de excitabilidade** é o valor do potencial de membrana no qual a corrente de entrada de sódio se iguala a corrente de saída de potássio, e assim qualquer despolarização acima desse nível levará a uma mudança não linear na condutância ao sódio que resulta numa rápida despolarização da membrana. A quantidade de corrente necessária para se chegar ao limiar de excitabilidade é designada como **reobase** (Lancaster *et al.*, 2001b).

O aumento na condutância ao sódio produzido pela despolarização da membrana resulta do aumento da probabilidade de abertura dos canais para sódio. Este parâmetro apresenta dependência tanto de voltagem quanto de tempo. A probabilidade de abertura pode ser influenciada por pelo menos dois mecanismos. O primeiro deles, é a dependência de voltagem para abertura dos canais para sódio, que é uma propriedade não linear no que diz respeito à despolarização da membrana. Essa dependência de voltagem para a ativação dos canais para sódio é contrabalançada pelo segundo mecanismo que é a inativação dos canais para sódio que também é dependente de voltagem e tempo. A

inativação mantém os canais abertos porém em um estado não condutor. Se a despolarização é rápida o suficiente, a velocidade do processo de ativação ultrapassa facilmente a do processo de inativação, resultando assim numa abertura rápida de vários canais para sódio. Porém, se a velocidade de despolarização for relativamente lenta a inativação pode superar a ativação e a possibilidade de uma condutância ao sódio alta e regenerativa encontra-se reduzida. Portanto, o limiar de excitabilidade é determinado pelo balanço entre a corrente de entrada de sódio e da corrente de saída de potássio. Podemos concluir que o limiar de excitabilidade não é um potencial fixo mas sim modulado por diversos fatores tais como a velocidade de despolarização da membrana.

O principal critério para a geração de um potencial de ação é que a corrente geradora tem que produzir um potencial gerador que seja maior que a diferença entre o potencial de repouso e o limiar de excitabilidade. Baseado nesse critério vários fatores que controlam o limiar de excitabilidade podem ser preditos. Em primeiro lugar, já que a magnitude da despolarização suficiente para gerar um potencial de ação é dependente da diferença entre o limiar de excitabilidade e o potencial de repouso, a excitabilidade é dependente do potencial de repouso da membrana antes da chegada do potencial gerador. De uma outra maneira a ativação de condutâncias que produzam uma hiperpolarização do potencial de membrana, também podem exercer um papel controlador eficiente do limiar de excitabilidade. Em segundo lugar, a magnitude da despolarização produzida pela corrente geradora é uma função linear da resistência da membrana. Quanto menor a resistência da membrana (ou seja, uma alta condutância da membrana) maior é a corrente requerida para despolarizar a membrana até o limiar de excitabilidade. Embora o segundo

fator possa alterar a excitabilidade, a condutância da membrana é controlada pela abertura e fechamento dos diversos canais iônicos.

A abertura e o fechamento dos canais para potássio são especialmente importantes porque quando abertos eles hiperpolarizam o potencial de membrana o que em associação com o aumento na condutância da membrana, diminui a excitabilidade. Se os canais para potássio estão abertos de maneira tônica, o seu fechamento pode aumentar a excitabilidade por produzir uma despolarização da membrana associada com uma diminuição na condutância. Os neurônios têm uma grande diversidade de canais para potássio operados por voltagem e por ligantes envolvidos com a modulação da excitabilidade. Esses canais são alvos frequentes de substâncias que modificam o seu comportamento cinético levando como consequência a variações na excitabilidade neuronal. Alguns canais para potássio podem permanecer abertos independente do potencial de membrana. Estes canais são chamados de “canais de vazamento” e participam do controle do potencial de repouso e da condutância da membrana, além de contribuírem para a excitabilidade já que eles influenciam a geração dos potenciais de ação. Outros canais para potássio são ativados pelos potenciais de ação e contribuem para o controle da excitabilidade pós-potencial. A ativação desses canais para potássio produz uma diminuição na excitabilidade da membrana dependente de tempo. Esse período de diminuição da excitabilidade é denominado de período refratário. Esse período limita a frequência com que os potenciais de ação serão gerados. Como a codificação das informações sensoriais depende da transdução em frequência de potenciais de ação, esse controle da condutância ao potássio é de vital importância para as funções sensoriais (Schild *et al.*, 1994b).

### **Características Estruturais dos Neurônios do Gânglio Nodoso**

O gânglio nodoso contém, exclusivamente, o corpo celular das fibras aferentes que contribuem para a inervação vagal das vísceras. Os registros eletrofisiológicos mostraram que cerca de 90% desses neurônios são responsáveis pelas fibras do tipo C, e o restante 10% originam as fibras do tipo A (Stansfeld & Wallis, 1985b). Essas diferenças serão discutidas posteriormente.

O gânglio nodoso, o gânglio petrosal e o gânglio geniculado, todos contendo o corpo celular dos neurônios viscerais aferentes, são derivados do ectoderma. Essa origem embrionária contrasta com os neurônios do gânglio jungular, e do gânglio glossofaríngeal que tem a sua origem na crista neural e que contêm fibras aferentes somáticas (Weston, 1970).

O corpo celular dos neurônios nodosos medem entre 30-60  $\mu\text{m}$  em diâmetro e têm uma forma esferóide. A superfície dessas células é irregular contendo invaginações o que aumenta a área de superfície. O corpo celular é coberto por células satélites achatadas cuja função inclui prover fatores tróficos e metabólitos, regulação da diferenciação e regulação da difusão. O corpo celular é unipolar, contendo um único processo, também chamado de processo tronco, proveniente do soma. O processo tronco pode ter tamanhos variados, de 50 a 200  $\mu\text{m}$ , até chegar a um ponto onde ele é dividido em um ramo periférico e um ramo central. O tronco pode ser bastante convoluto, nesses casos podem ser chamados de glomérulos. O significado fisiológico dos glomérulos ainda não é conhecido. O soma e o tronco não recebem “input” sinápticos mas sua excitabilidade é regulada. Os neurônios cujo axônio é provenientes de um determinado órgão, quando excitado, fazem com que o corpo celular libere um mediador, cuja natureza ainda não é

conhecida, que causa despolarização nos corpos neuronais vizinhos, mesmo os que não são relacionados com o órgão onde o potencial de ação foi gerado. Esse fenômeno é conhecido como *despolarização cruzada* (Oh & Weinreich, 2002).

O ramo central projeta para o núcleo do trato solitário (NTS), que se localiza no tronco cerebral. A marcação unilateral dos neurônios do gânglio nodoso leva à marcação da comissura do trato do núcleo solitário, algumas marcações na divisão lateral e a marcação da área postrema. As terminações centrais dos neurônios aferentes que contêm os baroreceptores aórticos estão localizados principalmente na parte lateral do núcleo do trato solitário (Donoghue *et al.*, 1982a) e as terminações centrais dos neurônios nodosos que inervam o pulmão estão localizados na divisão medial do núcleo do trato solitário (Donoghue *et al.*, 1982b). Os neurônios do NTS integram esse sinal periférico e então projetam ou localmente para os núcleos dentro da medula ( como o núcleo dorsal motor do vago, DMV, núcleo ambiguo ou formação reticular) ou manda processos ascendentes para o hipotálamo, amígdala, terminal estriado, e córtex insular (Ter Horst *et al.*, 1989).

O neurotransmissor predominantemente usado na terminação central é o glutamato, porém alguns neurônios são peptidérgicos usando a substância P como neurotransmissor.

Os terminais pré-sinápticos no núcleo do trato solitário proveniente dos neurônios do gânglio nodoso são ricos em receptores para angiotensina II e quando uma secção é efetuada no vago o sinal observado, usando-se imunohistoquímica, desaparece (Donoghue *et al.*, 1982a), reforçando a idéia de que esses receptores são sintetizados no corpo celular e transportados para o terminal central.

Os processos periféricos são distribuídos entre as regiões cardiovasculares, pulmonares, aórtica e gastrointestinal e os terminais sensoriais são classificados de acordo com o estímulo ao qual responde, incluindo mecanorreceptores, quimiorreceptores e termorreceptores. Os receptores também podem ser multimodais, como no caso dos nociceptores. Parece haver uma organização visceral no gânglio nodoso. Usando-se técnicas histológicas e eletrofisiológicas concluiu-se que os neurônios que inervam a laringe e o coração estão localizados perto do polo superior, os neurônios que inervam o pulmão estão localizados no meio e na parte inferior da borda inferior, os neurônios que inervam o estômago estão localizados no centro do gânglio e os neurônios que inervam a traquéia e o esôfago estão localizados em uma zona difusa que se estende de perto do polo superior até o centro do gânglio (Mei, 1970c; Mei, 1970b; Mei, 1970a).

### **Propriedades Elétricas dos Neurônios do Gânglio Nodoso**

Estudos eletrofisiológicos, tanto em gânglio nodoso intacto quanto em neurônios nodosos dissociados mostraram que as propriedades ativas e passivas desses neurônios não são uniforme (Leal-Cardoso *et al.*, 1993; Undem & Weinreich, 1993). Uma das propriedades que tem uma distribuição diferencial é a velocidade de condução no axônio. Essa velocidade depende primeiramente da mielinização do axônio, já que essa cobertura serve como um excelente isolante elétrico, o potencial de ação salta de um nó de Ranvier para o outro, fazendo com que esse potencial percorra o axônio de uma maneira bem mais rápida. Com base nesse parâmetro, dois grupos de neurônios nodosos podem ser distinguidos. A maioria dos neurônios, cerca de 90%, tem uma velocidade de condução entre 0,8 a 1,2 m/s por serem desprovidos de mielina e são as chamadas fibras C. O restante dos neurônios tem uma velocidade de condução entre 3 e 30 m/s e são

mielinizados e constituem a população de fibras A (Stansfeld & Wallis, 1985a). As células que geram fibras do tipo A e C podem ser identificados por apresentarem diferentes potenciais de ação e propriedades de disparos. Os neurônios do tipo A apresentam potenciais de ação curtos. Em 0 mV a duração do potencial de ação é menos que 1 ms, e tendem a ser do tipo tônico, ou seja, disparam mais do que um potencial de ação em resposta a uma despolarização. Já os neurônios do tipo C apresentam um platô na fase de repolarização dos potenciais de ação dos neurônios, o que leva a um potencial com uma duração maior, cerca 2 ms em 0 mV. Esses neurônios têm uma tendência a disparar um ou dois potenciais de ação em resposta a um longo pulso de despolarização. Essas características distintas é devido principalmente ao nível de expressão diferenciada de canais iônicos nesses dois tipos de neurônios, principalmente as forças relativas das correntes responsáveis pela repolarização ( $I_A$ ,  $I_D$ ,  $I_K$ ,  $I_{Kca}$ ) e da ativação das correntes de sódio (Schild *et al.*, 1994a).

Um potencial de ação, como já mencionado antes, é gerado pelo aumento da condutância ao sódio. Posteriormente há um aumento da condutância ao potássio o que leva, juntamente com a inativação dos canais para sódio, à repolarização dos neurônios. Em alguns neurônios do tipo C, além dos canais para sódio e potássio, há participação de correntes de cálcio no potencial de ação, o que contribui para a formação do platô observado na fase de repolarização (Schild *et al.*, 1994c). A seguir iremos discutir alguns aspectos importantes das correntes de sódio, potássio e cálcio dos neurônios nodosos.

### **Correntes de Sódio Operadas por Voltagem**

Essas correntes são de extrema importância para a geração dos potenciais de ação e também na determinação do estado de excitabilidade celular, já que uma célula que

apresenta uma alta densidade de canais para sódio responde a um pulso despolarizante longo (~300-500 ms) com múltiplos potenciais de ação (Bielefeldt, 2000).

A corrente de sódio em neurônios nodosos pode ser modulada tanto por neurotransmissores, como é o caso do óxido nítrico (Bielefeldt *et al.*, 1999), quanto por substâncias exógenas como é o caso de antidepressivos tricíclicos (Bielefeldt *et al.*, 2002b) e toxinas (Campos *et al.*, 2004).

Quatro isoformas da família de canais para sódio operados por voltagem já foram encontradas no sistema nervoso periférico (Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9). Os neurônios nodosos apresentam dois tipos de corrente de sódio, que podem ser distinguidas com base na sua sensibilidade à tetrodotoxina, uma corrente sensível a tetrodotoxina (s-TTX), que corresponde ao Nav1.7 e uma corrente resistente a tetrodotoxina (r-TTX), que corresponde ao Nav1.8 (Ikeda & Schofield, 1987b; Campos *et al.*, 2004; Kerr *et al.*, 2004). Embora a maioria dos neurônios nodosos apresentem correntes de sódio do tipo s-TTX e r-TTX, em subpopulações de neurônios há predominância de um dos tipos de corrente.

Essas duas correntes diferem não apenas na sensibilidade à TTX, mas também no que diz respeito ao potencial em que a corrente é ativada, a velocidade da recuperação da inativação, a cinética de inativação e a seletividade a outros íons (Ikeda & Schofield, 1987a; Campos *et al.*, 2004; Kerr *et al.*, 2004). A corrente do tipo r-TTX quando comparada com a do tipo s-TTX, apresenta um recuperação da inativação mais rápida, uma ativação em potenciais mais positivos, uma cinética de inativação mais lenta, essas características contribuem para uma diversidade nos parâmetros elétricos principalmente os que contribuem de forma direta para frequência de disparos dos potenciais de ação.

A expressão dos canais para sódio é modificada durante um processo de injúria. Durante uma úlcera gástrica induzida experimentalmente, os neurônios nodosos responsáveis pela inervação da parede gástrica (identificados através de marcação com corante fluorescente) apresentam um aumento da corrente total de sódio, e um aumento da contribuição da corrente r-TTX (Bielefeldt *et al.*, 2002a). Uma vagotomia bilateral leva a uma diminuição acentuada da excitabilidade dos neurônios nodosos, essa resposta é bastante diferente da resposta dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, que apresentam um aumento da sua excitabilidade em resposta a injúria. Após a vagotomia não se observa mudança na corrente total de sódio nos neurônios nodosos, porém há uma mudança na contribuição relativa de r-TTX e s-TTX, onde a percentagem da r-TTX aumenta e a corrente s-TTX é quase abolida (Lancaster & Weinreich, 2001). Com base nesses resultados pode se pensar na corrente s-TTX como uma grande responsável para a excitabilidade dos neurônios nodosos, já que na sua ausência, p.ex. depois de uma vagotomia, o limiar de excitabilidade está bastante aumentado, havendo a necessidade de usar-se três vezes o valor do limiar de excitabilidade para se disparar os potenciais de ação (Lancaster *et al.*, 2001c).

### **Corrente de Cálcio Operadas por Voltagem**

Os canais iônicos operados por voltagem que são permeáveis ao cálcio ( $Ca_v$ ) são multi-complexos de natureza proteica formados normalmente por 5 subunidades distintas. Há evidências para a presença de todas as isoformas dessa família no sistema nervoso periférico, onde diferentes membros funcionam no mesmo tipo celular. Antagonistas seletivos desses canais permitiram a sua classificação em cinco tipos funcionais distintos

que primeiramente podem ser agrupados como: ativados por alta voltagem (HVA,  $>-40$  mV) e ativados por baixa voltagem (LVA,  $>-70$  mV) (Catterall *et al.*, 2003).

A importância das correntes de cálcio para a fisiologia dos neurônios nodosos é indiscutível. Indiretamente o cálcio afeta a excitabilidade principalmente dos neurônios do tipo C, já que nessa população o cálcio ativa uma corrente de potássio que leva a hiperpolarização dos neurônios, o afastando do seu limiar de excitabilidade e dificultando os disparos de potenciais de ação. Esse fenômeno é relacionado com a entrada de cálcio na célula via canais para cálcio do tipo N, levando a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (“CICR”) e ativando lentamente uma condutância para potássio, que produz uma hiperpolarização que se desenvolve de maneira lenta (chamada de “slow after potential”) (Cordoba-Rodriguez *et al.*, 1999; Lancaster *et al.*, 2001a).

### **Correntes de Potássio Operadas por Voltagem**

A superfamília dos  $K_V$  é responsável pelo mais diverso e também a mais estudada classe de canais iônicos. Há evidências de muitas isoformas no SNC mas as isoformas presentes no sistema nervoso periférico são mais restritas.

A caracterização farmacológica da corrente total em subtipos específicos é limitada pela baixa seletividade dos antagonistas disponíveis que, em geral, bloqueiam mais de um tipo de canal para potássio. Os antagonistas com maior especificidade são aqueles derivados ou purificados de toxinas como as da família das dendrotoxinas com alta seletividade para  $K_V1.1$ ,  $K_V1.2$  e  $K_V1.6$  com  $CI_{50}$  entre 1 e 10 nM. Nos neurônios nodosos a dendrotoxina inibe cerca de 20 % da corrente total de potássio, essa corrente sensível à dendrotoxina ( $I_{DTX}$ ), se comporta como um retificador retardado, ou seja não apresenta inativação e a sua ativação se dá aproximadamente a  $-40$  mV. A corrente

restante apresenta um componente sensível à 4-aminopiridina (4-AP), um antagonista que bloqueia uma corrente presumidamente composta por diversos membros da família dos  $K_V$ , incluindo  $K_{V1}$ ,  $K_{V2}$ ,  $K_{V3}$  e/ou  $K_{V4}$ . A corrente sensível à 4-AP apresenta rápida ativação em potenciais mais negativos ( $< -50$  mV) e uma inativação que segue um decaimento multiexponencial. Esse decaimento multiexponencial nos permite dividir a corrente sensível à 4-AP em dois componentes: uma corrente transiente ( $I_A$ ) e uma corrente retardada ( $I_D$ ) (McFarlane & Cooper, 1991).

Na presença de 4-AP e de dendrotoxina ainda se observa uma corrente de potássio que é bloqueada pelo antagonista não seletivo de correntes de potássio, o tetraetilamônio (TEA). Essa corrente apresenta características típicas dos retificadores retardados, ativa em potenciais mais positivos que  $-30$  mV e praticamente não apresenta inativação. Mesmo na presença desses antagonistas (4-AP, dendrotoxina e TEA) os neurônios do gânglio nodoso ainda têm uma corrente restante. Essa corrente é a corrente de potássio ativada por cálcio. Essas correntes são moduladas tanto pelo cálcio quanto pela voltagem. Elas incluem um canal com alta condutância ( $> 200$  pS) presumidamente o  $K_{Vca1}$ ; um intermediário (entre 10 e 60 pS) o  $K_{Vca3}$ , ambos são bloqueados por concentrações na faixa de nanomolar de caribdotoxina; e um de pequena condutância,  $K_{Vca2}$ , que é bloqueado por concentrações da ordem de nanomolar de apamina (Faber & Sah, 2003; Cordoba-Rodriguez *et al.*, 1999; Hay, 1998; Lancaster *et al.*, 2001a).

### 1.3- ANGIOTENSINAS E O SISTEMA NERVOSO

Os receptores de angiotensina II foram localizados no sistema nervoso usando-se tanto técnicas de hibridização *in-situ*, que localiza um ARN mensageiro específico, quanto técnicas de autoradiografia, que utiliza o ligante radioativo e identifica o local onde os receptores estão presentes (Mendelsohn *et al.*, 1984). As áreas onde foram detectadas a presença de receptores para a angiotensina II coincidem com as áreas onde se detecta imunoreatividade para angiotensina II.

No cérebro a identificação dos receptores para angiotensina II se deu a princípio injetando-se angiotensina II marcada tanto com radioatividade quanto com fluorescência na periferia. Foram localizados sítios de ligação nos órgãos circunventriculares onde a barreira hemato-encefálica é deficiente. Posteriormente foi descoberto que a ligação de angiotensina II no sistema nervoso central não se restringe apenas à região dos órgãos circunventriculares (Saavedra, 1999b). Esses estudos neuroanatômicos mostraram que a angiotensina II parece funcionar tanto como um hormônio circulante, que se beneficia de uma “janela” na barreira hemato-encefálica no cérebro para ter acesso a certos locais, quanto um peptídeo produzido localmente com ações centrais em áreas inacessíveis aos peptídeos circulantes, sendo necessário, portanto, uma produção local de angiotensina II. O ARN mensageiro para renina, angiotensinogênio, e ECA-1 são encontrados no cérebro (Dzau, 1993a; Saavedra, 1992a). Um fato interessante acontece no sistema nervoso central, a imunoreatividade para a angiotensina II parece ser restrita aos neurônios (Lind *et al.*, 1985) e ARN mensageiro para o angiotensinogênio é encontrado exclusivamente em astrócitos (Stornetta *et al.*, 1988), isso sugere que o angiotensinogênio precisa ser secretado no espaço extracelular e posteriormente captado pelos neurônios. O baixo nível de renina no cérebro fez com que a identificação da sua localização fosse bastante difícil

e, ainda não é claro se o angiotensinogênio é captado intacto ou se metabolizado. Esses achados, no entanto, não invalidam a possibilidade de outras enzimas estarem envolvidas na geração da angiotensina II no cérebro. Outras enzimas são capazes de produzir angiotensina II com a formação de outros intermediários. A distribuição de estruturas no cérebro que possuem receptores para angiotensina II é razoavelmente conservada entre as espécies de mamíferos que foram examinadas usando-se autoradiografia e homogenato das regiões do cérebro, entres as espécies examinadas se encontram camundongo, rato, cobaia, cão, humano e macaco (Wright *et al.*, 2002). O receptor do subtipo AT1 tem sido localizado com alta densidade na pituitária anterior, área postrema, genículo lateral, região do terceiro ventrículo ventral anterior, órgão subfornical, os núcleos paraventriculares, supraóptico, e ventral medial hipotalâmico, especialmente a região medial e pré-óptica, núcleo do trato solitário, núcleo dorsal motor do vago e o núcleo olivar inferior da medula. Alta densidade para os AT2 é encontrada na amígdala, genículo medial, núcleo hipoglossal, núcleo inferior da oliva, habénula lateral, putamén caudal, globo pálido, locus coeruleus, tálamo, colículo inferior, área tegmental ventral. Muitos dos núcleos que expressam AT2 têm função sensorial como o núcleo talâmico, o núcleo médio geniculado e o colículo superior. Pouco se sabe a respeito da função fisiológica da ativação do receptor AT2 no cérebro. Os camundongos geneticamente modificados que não apresentam esse receptor têm um comportamento exploratório e movimentos atenuados além de ter uma resposta presora aumentada para angiotensina II (Hein *et al.*, 1995a).

A função clássica da ativação dos receptores AT1 inclui a modulação da ingestão de água e sal, modulação da pressão arterial, modulação das funções autômicas, controle

central de hormônios, incluindo a resposta ao estresse. O estudo do mecanismo pelo qual a angiotensina II via ativação dos receptores do tipo AT1 produz os efeitos fisiológicos citados acima ainda não estão de todo compreendidos, porém algumas indicações de possíveis mecanismos têm sido descritos.

O estudo dos efeitos da ativação dos receptores AT1 sobre canais iônicos tem sido o motivo de estudos em várias células. Em culturas primárias de neurônios dissociados provenientes de diversas regiões, como gânglio cervical superior, gânglio nodoso, órgão subfornical, núcleo paraventricular, área postrema, e co-cultura de hipotálamo e medula, a ativação do AT1 leva a inibição de canais para potássio ativados por voltagem (Ferguson & Li, 1996; Hay & Lindsley, 1995; Li & Ferguson, 1996; Li & Guyenet, 1996; Shapiro *et al.*, 1994; Sumners *et al.*, 1996) o que leva a um aumento na excitabilidade desses neurônios. A inibição de canais para potássio leva ao aumento da excitabilidade o que corrobora a ação excitatória ou facilitatória da neurotransmissão angiotensinérgica no sistema nervoso central. A angiotensina II também pode modular os canais para cálcio operados por voltagem em neurônios do gânglio nodoso de animais neonatos e do gânglio cervical superior (Shapiro *et al.*, 1994; Bacal & Kunze, 1994).

O que o nosso trabalho procurou explorar foi a participação da angiotensina II na transdução e/ou na modulação dos estímulos viscerais, não somente dos estímulos provenientes do sistema cardiovascular mas de uma maneira geral das vísceras inervadas pelos neurônios nodosos. Com base no fato de os receptores para angiotensina II estarem presentes nesses neurônios é de se esperar que esse peptídeo pudesse apresentar algum efeito na fisiologia do neurônio nodoso.

Uma mudança na excitabilidade dos neurônios nodosos pela angiotensina II seria a forma mais óbvia de comunicar ao sistema nervoso central, e mais precisamente ao NTS, de que o ambiente na periferia encontra-se modificado, o que de fato acontece. A tarefa mais árdua é saber, precisamente, como esse aumento na frequência de disparos acontece, mais especificamente quais os canais iônicos estão envolvidos nesse fenômeno.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- OBJETIVO GERAL**

Estudar a modulação da excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso pela angiotensina II.

### **2.2-OBJETIVOS EXPECÍFICOS**

- Avaliar a ação da angiotensina II sobre a excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso, enfatizando parâmetros que influenciam diretamente os potenciais de ação.
- Verificar quais os tipos de receptores para angiotensina II estão envolvidos na mudança da excitabilidade.
- Identificar a presença de ARN mensageiro para os receptores de angiotensina II.
- Estudar o efeito da angiotensina II sobre as correntes de cálcio.
- Estudar o efeito da angiotensina II sobre as variações da concentração de cálcio intracelular.
- Estudar o efeito da angiotensina II sobre as correntes de potássio.
- Verificar se no modelo de hipertensão onde os ratos são espontaneamente hipertensos (SHR), a resposta a angiotensina II no que diz respeito a excitabilidade é similar aos animais normotensos (WKY).
- Verificar no modelo de hipertensão onde os ratos são espontaneamente hipertensos (SHR) a resposta a angiotensina II sobre as variações de cálcio intracelular.

### **3- MÉTODOS**

#### **3.1- DISSECÇÃO DO GÂNGLIO NODOSO**

O animal a ser usado era sacrificado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA) e era submetido a dissecção. A região do pescoço era cortada. Com a ajuda de um separador a traquéia era rebatida para que o nervo vago fosse melhor visualizado. Usando-se uma tesoura de dissecção o tecido conjuntivo era rebatido e se seguia o vago até se chegar ao gânglio nodoso. Quando o gânglio nodoso era visualizado, um corte na porção distal do gânglio era feito, seguido de outro corte na porção proximal, para que o gânglio, juntamente com um pedaço do nervo vago fosse retirado. Durante esse procedimento a região inteira era banhada com uma solução gelada de Locke contendo em mM: NaCl 136, KCl 5,6, MgCl<sub>2</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,2, NaHCO<sub>3</sub> 14,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, e glicose 10. O pH desta solução era ajustado para 7,4. Em seguida o tecido retirado era transferido para uma placa de Petri coberta com Sylgard® para que todo o conjuntivo fosse retirado. Esta etapa era realizada com o uso de um estereoscópio o que possibilitava a distinção entre conjuntivo e gânglio.

#### **3.2- CULTURA DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO**

Quando o gânglio é totalmente destituído do tecido conjuntivo ele é transferido para uma solução que não contém cálcio nem magnésio, a solução salina balanceada de Hanks (SSBH) que continha em mM: NaCl 137,93, KCl 5,3, NaHCO<sub>3</sub> 4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 e glicose 10. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH (1M). SSBH contendo 0,002g/ml de dispase (Sigma, St Louis, MO, EUA) e 0,002g/ml de colagenase IA

(Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha ou Sigma Co., St. Louis, MO, EUA). O gânglio era incubado a uma temperatura de 37°C por 15 minutos. A seguir uma dissociação mecânica era feita com o uso de três pipetas Pasteur com orifícios decrescentes em diâmetro. A solução enzimática era trocada pelo meio de cultura contendo DMEM (Sigma Co., St. Louis, MO, EUA ou Cultilab, Campinas, Brasil) e 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL ou Cultilab, Campinas, Brasil) ou pelo meio L15 (Gibco BRL) contendo 10% de soro fetal bovino (JRH Biosciences), através de centrifugação (3 vezes usando-se 700g por 45 segundos). A seguir os neurônios eram plaqueados (150µl por placa) em uma lamínula coberta por poli-L-lisina (Sigma Co., St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,1 mg/ml e incubados a 37°C. Quando usamos o meio DMEM os neurônios eram incubados numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub> e quando o meio L15 era usado isso não era necessário (Jafri *et al.*, 1997).

Os neurônios eram usados para os experimentos de eletrofisiologia ou para medidas de fluorescência a partir de 2 horas em cultura até um máximo de 56 horas.

### **3.3- RT-PCR**

#### **Isolamento do ARN**

Utilizou-se material autoclavado e novo nos procedimentos empregados para extração e purificação de ARN. Todo o material utilizado no manuseio com ARN foi estocado em local próprio e separado do restante. Luvas foram utilizadas durante todo o processo de manipulação do ARN.

Depois de dissecar o gânglio nodoso de pelo menos dois animais, o ARN era isolado usando-se o reagente RNazol (Gibco-life Technologies) e seguindo-se o protocolo indicado pela companhia.

### **Medida da Concentração do ARN**

A quantificação do ARN purificado foi realizada através da leitura no espectrofotômetro a 260nm. O fator de conversão utilizado para leitura nesse comprimento de onda foi 1OD corresponde a 40µg/ml. A razão entre a leitura  $A_{260}/A_{280}$  foi estimada para verificar a pureza da preparação de ARN e a amostra foi considerada enriquecida de ARN quando o valor era próximo de 1,8.

### **Reação de Transcrição Reversa**

A síntese da primeira fita de cDNA a partir do ARN total proveniente do gânglio nodoso foi feita utilizando-se iniciadores randômicos que continham nove bases. A reação consistia em: 1µg de ARN total, 250 µM de dNTP, 50 mM de tris-HCl (pH=8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, 10 U de ARNsin (Gibco Life-technologies) e 50 pM de iniciadores randômicos contendo 9 bases (Gibco Life-technologies). A reação foi incubada a 95°C por 5 min e a 4°C por 5 min. Em seguida 200U de MuLV, a enzima transcriptase reversa de “monolely murine leukemia virus” (Gibco Life-technologies) e incubada a 37°C por 1 h seguida de inativação da enzima pelo calor.

### **Elaboração dos Iniciadores**

A partir das sequências completas de cDNA dos receptores de angiotensina II de rato depositadas no banco de dados do “National Institute of Health” (NIH), com os seguintes números de identificação: AT2 UO1908 (Mukoyama *et al.*, 1993) e AT1

M87003 (Kakar *et al.*, 1992) usou-se um programa disponível no próprio sítio do NIH para obtermos os melhores pares de iniciadores. Para confirmarmos se realmente os iniciadores indicados eram os melhores nos utilizamos um segundo programa, OLIGO 6.0, onde monitoramos: possíveis formações de estrutura secundária no próprio iniciador (“hairpins”, “loops”), complementariedade errada com cDNA alvo, a temperatura de alinhamento dos dois iniciadores com o cDNA alvo e a complementariedade entre os dois iniciadores.

Como controle usamos um par de iniciadores que amplifica o cDNA da  $\beta$ -actina, já que essa proteína tem uma expressão estável e abundante nos neurônios do gânglio nodoso.

	Iniciadores 5'	Iniciadores 3'
AT1	5'CCCTGGCAAGCATCTTATGTA 3'	5' TCTAAACACACTACGGAGCT 3'
AT2	5' TGTTTTATGGCTTTCTGGGG 3'	5' TGACCTCCCATCTCCTTTTG 3'
$\beta$ -actina	5' GTTCCGATGCCCCGAGGCT 3'	5' GCATTTGCGGTGCACGATGGA 3'

**Tabela 3- Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR**

### **Reação de PCR**

A reação de foi feita usando-se: 10 pM de cDNA, 250 mM de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 10 mM de Tris-HCl (pH=8,3) 50 mM de KCl<sub>2</sub>, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de cada iniciador e 200 U de *Taq*polimerase, a enzima responsável em amplificar o DNA (Gibco Life-Technologies), em um volume final de 50  $\mu$ l. Depois de incubar a reação a 95°C por 5 min, os ciclos foram submetidas a 30 ciclos de amplificação que consistia em:

- 1) 94°C por 30 segundos (etapa de desnaturação)
- 2) 56°C por 1min (etapa de anelamento dos iniciadores)
- 3) 72°C por 1 min (etapa de extensão dos iniciadores)

Repetir o ciclo 30 vezes.

- 4) 72°C por 7 min (etpa que garante a extensão final de todas as moléculas amplificadas)

Usamos 56°C para os iniciadores de AT1 e  $\beta$ -actina e 54°C para o iniciador de AT2.

### **Separação e Visualização das Bandas**

Os produtos da reação de PCR foram separados e visualizados usando-se um gel de agarose submetido a uma corrida eletroforética. Utilizamos agarose diluída a 1% em TAE. As amostras foram aplicadas no gel junto com o tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% de ficoll) e submetido a 6 V/cm de gel por aproximadamente 1 hora. Após esse tempo o gel era corado em solução de brometo de etídio 0,5  $\mu$ g/ml por 15 a 30 min e posteriormente visualizado em luz ultravioleta. O produto de PCR do AT1 deve ter 599 pares de bases e o produto do AT2 deve ter 519 pares de bases.

### **3.4- ELETROFISIOLOGIA**

Os experimentos foram realizados no modo de “whole-cell voltage-clamp” ou de “whole-cell current-clamp” utilizando a técnica de patch-clamp (Hamill *et al.*, 1981)(Hamill et al, 1981). As células foram transferidas para a platina de um microscópio invertido modelo Nikon TM2 (Japão). O conjunto experimental está assentado sobre uma mesa anti-vibratória e contém um micromanipulador mecânico (Narishige, Japão) para a movimentação do eletrodo usado para o registro experimental e um outro micromanipulador mecânico para a movimentação da pipeta usada para a perfusão das

soluções usadas. As micropipetas utilizadas são confeccionadas a partir de vidro neutro, usando-se um estirador vertical de dois estágios (Narishige, PP 83, Japão) ou um estirador horizontal modelo P97 (Sutter Instruments, EUA). As micropipetas apresentavam uma resistência não compensada entre 1 e 4 M $\Omega$  e as células tiveram uma capacitância de  $53,7 \pm 2,7$  pF e resistência em série de  $5,1 \pm 0,3$  M $\Omega$  (n=82), a resistência em série foi compensada de 60%, a frequência de amostragem foi de 10 KHz, usou-se um filtro passa baixa de 5 KHz, o intervalo de aquisição foi de 0,1 Hz e usou-se um protocolo P/4 para subtração do “leakage” quando necessário.

### **3.4.1- “Current Clamp”**

Nos experimentos de “current clamp” a corrente que passa pela célula é controlada e as diferenças de potencial são observadas, portanto nesses experimentos estudamos os potenciais de ação e também as modificações nesses potenciais, que refletem mudanças na excitabilidade das células. A solução externa era composta de (em mM): NaCl 136, KCl 5,6, MgCl<sub>2</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,2, NaHCO<sub>3</sub> 14,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, e glicose 10, pH=7,4) e a solução interna era composta de (em mM): KCl 135, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, EGTA 11, ATP-Mg 2, GTP-Li 0,1. O pH foi ajustado para 7,3 com KOH (1 M). Utilizando o programa de aquisição de dados, o Axoclamp 9, nós calculamos o potencial de junção para as soluções usados e o valor foi igual a 8 mV.

Nesses experimentos um selo da ordem de gigaohms é formado e em seguida a membrana é rompida. Imediatamente mede-se o potencial de repouso das células. O primeiro protocolo usado consiste em pulsos de corrente despolarizante com aumentos de 50 ou 100 pA por 20 ms para que se calcule o limiar de excitabilidade, ou seja, a que

potencial a célula começa a disparar potenciais de ação (também chamado de “threshold”) e para determinar a quantidade de corrente necessária para despolarizar a célula o suficiente para disparar potenciais de ação (essa medida será utilizada para se calcular a reobase, que será igual a esse valor de corrente dividido pela capacitância da célula).

Depois de determinar o limiar de excitabilidade das células um outro protocolo de estimulação foi usado, onde a quantidade de corrente suficiente para se chegar ao limiar de excitabilidade (1X o “Threshold”) é injetada na célula por 500 ms. Em seguida, repete-se esse protocolo só que com duas vezes a quantidade corrente usada anteriormente, e subsequentemente três vezes.

Usa-se agora um protocolo que consiste em simplesmente monitorar o potencial de repouso da célula por um período de 2 minutos. Cerca de 15 segundos depois de começarmos a gravar, angiotensina II (100 nM) é aplicada. Em seguida se repete todos os protocolos usados anteriormente: determinar o limiar de excitabilidade, 1X o “threshold”, 2X “threshold”, 3X “threshold” para verificarmos o efeito da angiotensina II.

### **3.4.2- “Voltage Clamp”**

Nos experimentos de voltage clamp a diferença de potencial era mantida e as correntes iônicas que passam pela célula eram estudadas. Esse modo do patch-clamp foi usado para se estudar as diferentes correntes iônicas de uma forma individualizada, para tal usou-se uma solução que pudesse isolar a corrente iônica a ser estudada. Teve-se o cuidado de traçar-se protocolos de voltagem que fossem adequados para cada corrente estudada.

### **Corrente Total de Cálcio**

A solução externa é composta de (em mM): TEA-Cl 35, cloreto de colina 100, CsCl 10, MgCl<sub>2</sub> 0,8, HEPES 10, CaCl<sub>2</sub> 2 e glicose 10, pH=7,4 ajustado com HCl. A solução interna é composta de (em mM): TEA-Cl 20, CsCl 100, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, EGTA 11, CaCl<sub>2</sub> 1, ATP-Mg 4 e GTP-Li<sub>4</sub> 0,1, pH= 7,2 ajustado com CsOH.

O protocolo de voltagem para visualizar as correntes de cálcio foi o seguinte: a partir do potencial de repouso de -80mV aplicava-se um pré-pulso para -40 mV por 100 ms e em seguida um pulso teste para 0 mV também por 100ms. Para se estudar a dependência de voltagem da corrente total de cálcio usou-se o seguinte protocolo: a partir de -80 mV um pré-pulso de -40 mV por 100 ms foi aplicado e pulsos subsequentes de voltagem variando de -60 a +60 mV foram aplicados, variando de 10 em 10 mV (Mudado, 2004). O pico da corrente ( $I_{Ca}$ ) era medido durante a aplicação de cada potencial (V) a partir de -40 mV. Os valores obtidos foram então divididos pela capacitância de cada neurônio e foi usada para determinar a relação da densidade de corrente (A/F) versus voltagem (mV). A equação 1 foi usada para se fazer o ajuste dos pontos experimentais:

$$(1) I_{(V)} = G_{max} * (V_m - V_{rev}) / \{1 + \exp[(V_{1/2} - V_m)/k]\}$$

Onde I é a amplitude da corrente,  $G_{max}$  é a condutância máxima ao cálcio,  $V_m$  é o potencial de membrana,  $V_{rev}$  é o potencial aparente de reversão da corrente e  $V_{1/2}$  é o potencial em que se obtém 50% da condutância máxima e k é a inclinação. Todos os parâmetros, à exceção do  $V_m$  que corresponde ao potencial aplicado, são obtidos através

da regressão não-linear (equação 1) usada para ajustar os dados experimentais, esse ajuste foi feito individualmente para cada célula.

Para estudarmos a dependência de voltagem para a ativação da corrente nós transformamos os valores de corrente, obtidos experimentalmente, em valores de condutância. A condutância em um determinado potencial é igual a corrente obtida dividida pela diferença entre o potencial aplicado e o potencial de reversão (obtido da equação 1). O valor obtido era então dividido pela condutância máxima obtida através do ajuste da relação corrente-voltagem. O gráfico da condutância era normalizado em função da voltagem e foi ajustado com a seguinte equação:

$$(2) \quad g/g_{\max} = 1 / \{ 1 + \exp[(V_{1/2} - V_m) / k_g] \}$$

Onde  $V_m$  é o potencial aplicado,  $V_{1/2}$  é o potencial no qual 50% dos canais estão ativados  $K_g$  é a constante de Boltzmann que reflete a dependência de voltagem para a ativação da corrente.

Usou-se também um protocolo de voltagem onde o próprio potencial de ação do neurônio nodoso, gravado anteriormente durante um experimento de “current clamp” usando-se um protocolo que continha a quantidade de corrente correspondente a 1X “threshold” por 500 ms, era usado como o comando de voltagem. A grande vantagem de se utilizar o próprio potencial de ação como comando de voltagem é que nessa situação a corrente obtida corresponde literalmente a corrente de cálcio acionada durante um potencial de ação típico, refletindo o que acontece fisiologicamente.

### **Corrente de Potássio**

Para medir-se as correntes de potássio a solução externa era composta de (em mM): cloreto de colina 150,  $\text{CoCl}_2$  1,  $\text{MgCl}_2$  3,4, HEPES 10, e dextrose 10, pH=7,4 ajustado com HCl. A solução interna é composta de (em mM): KCl 140,  $\text{CaCl}_2$  1, HEPES 10, EGTA 11, ATP-Mg 2 e GTP-Li 2, pH= 7,2 ajustado com KOH.

O protocolo de voltagem para visualizar a corrente total de potássio foi o seguinte: a partir do potencial de repouso de  $-80$  mV aplicava-se um pré-pulso para  $-110$  mV por 1s e em seguida um pulso teste para 0 mV por 500 ms. Para se estudar a dependência de voltagem da corrente de potássio usou-se o seguinte protocolo: a partir de  $-80$  mV um pré-pulso para  $-110$  mV por 500 ms foi aplicado e pulsos subsequentes de voltagem de  $-80$  a  $+30$  mV foram aplicados, variando-se de 10 em 10 mV (Gold, 1997).

Para se bloquear a corrente de potássio do tipo retificadora retardada usou-se um bloqueador específico para essa corrente, TEA, na seguinte solução externa: cloreto de colina 60, TEA 90,  $\text{CoCl}_2$  1,  $\text{MgCl}_2$  3,4, HEPES 10, e dextrose 10, pH=7,4 ajustado com HCl e solução interna (em mM): KCl 140,  $\text{CaCl}_2$  1, HEPES 10, EGTA 11, ATP-Mg 2 e GTP-Li 2, pH= 7,2 ajustado com KOH.

### **3.5- IMAGEM DE CÁLCIO**

Para se estudar o aumento intracelular de cálcio usou-se indicadores fluorescente de cálcio do tipo ratiométrico, FURA 2. As células eram incubadas com  $1 \mu\text{M}$  do indicador FURA-2-AM, um éster, por 40 a 60 min à temperatura ambiente. O indicador tem a capacidade de permear a membrana plasmática e quando dentro da célula o grupamento éster é clivado, o que permite a retenção intracelular. Depois da incubação a

lamínula era colocada na câmara de registro e superfundida continuamente com Locke ou com Locke contendo angiotensina II ou angiotensina II e antagonistas de AT1 e de AT2. A medida da fluorescência de FURA-2 era feita com um espectrofotômetro de excitação dual (340/380) acoplado ao microscópio através de um cabo de fibra óptica operando em modo microfluorimétrico. Cada célula em estudo era excitada alternadamente por uma luz de 340 nm e 380 nm e a fluorescência emitida era, depois de passar por um dicromo, adquirida por um tubo fotomultiplicador que tinha o seu sinal digitalizado. A aquisição e análise eram feitas usando-se o software Felix (Photon Technology Incorporation, USA) e a razão entre os valores obtidos pelas duas excitações corresponderá a variação de cálcio livre no citoplasma celular (Figura 5). Todos os componentes do set-up para medição de cálcio foram fabricados pela Photon Technology Incorporation, que inclui a fonte de luz, o cortador óptico, o monocromo, o cabo óptico, o dicromo e o fotomultiplicador.

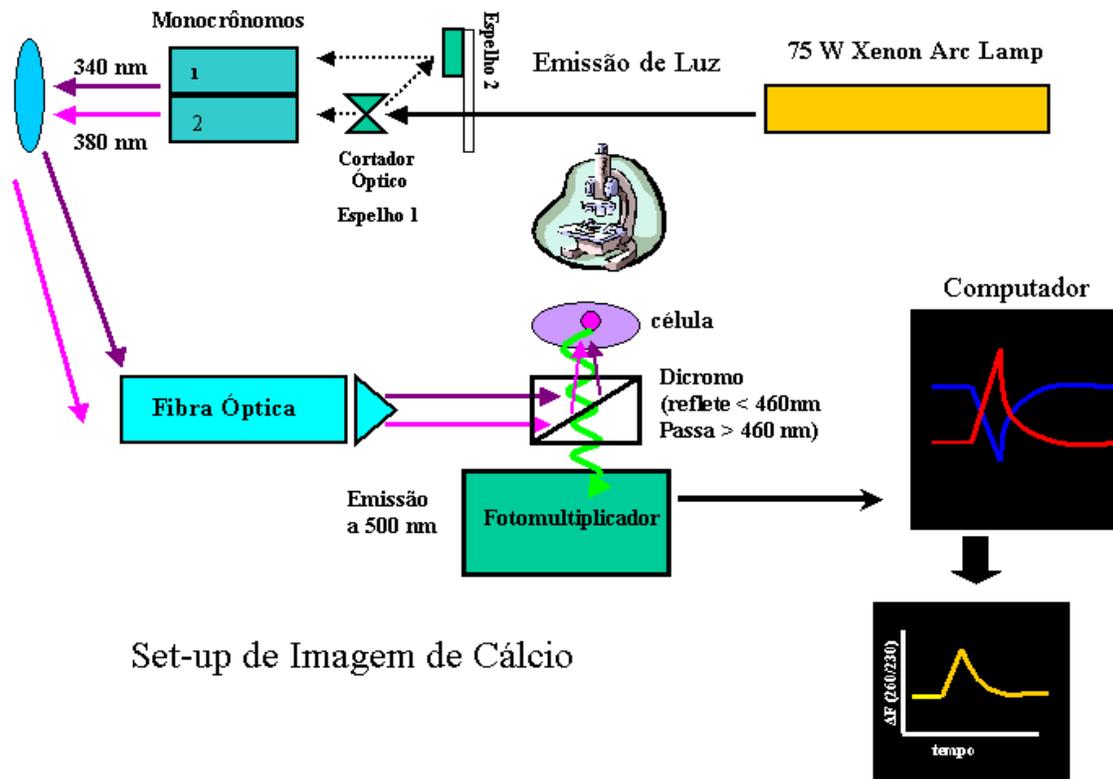


Figura 5- Set-Up usado nas medições de microfluorimetria.

### 3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os nossos resultados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. A significância estatística foi acessada usando-se test T pariado no nível de  $P < 0.05$  de significância. A construção das figuras, o ajuste matemático e as análises estatísticas foram feitos usando-se o programs SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

## 4-RESULTADOS

### 4.1- EFEITO DA ANGIOTENSINA II NAS PROPRIEDADES ATIVAS E PASSIVAS DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO.

Estudamos o efeito da angiotensina II nos parâmetros passivos e ativos dos potenciais de ação dos neurônios do gânglio nodoso usado-se a técnica de “patch clamp” no modo de “current clamp”.

A Tabela 4 mostra que angiotensina II não tem efeito sobre os parâmetros passivos dos neurônios do gânglio nodoso.

	Potencial de Repouso (mV)	Resistência de “Input” ( $\Omega$ M)
<b>Controle (n=65)</b>	-51 $\pm$ 0,8	320 $\pm$ 21
<b>ANG II (100 nM) (n=65)</b>	-50 $\pm$ 2	320 $\pm$ 21

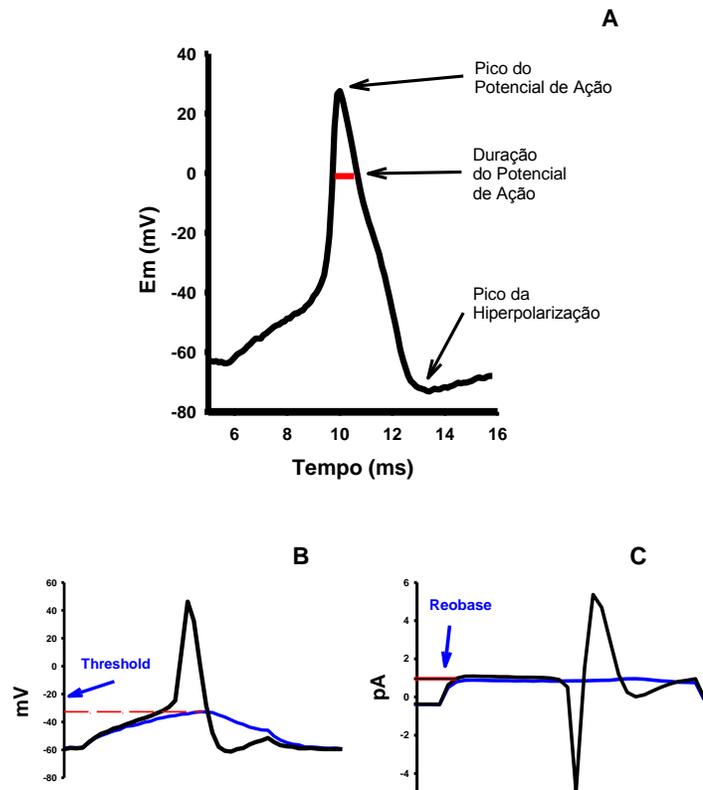
**Tabela 4- Propriedades passivas dos neurônio do gânglio nodoso.**

Investigamos o efeito da angiotensina II nas propriedades ativas dos neurônios do gânglio nodoso. A figura 6 mostra um potencial típico de um neurônio do gânglio nodoso e mostra os parâmetros estudados. O painel A mostra o pico do potencial de ação, a duração do potencial de ação em 0 mV e o pico da hiperpolarização pós potencial. O

painel B mostra o “threshold”, que é o limiar de excitabilidade do neurônio, em qual potencial o neurônio é capaz de disparar um potencial de ação. O painel C mostra a “rheobase” que indica quanto de corrente é necessário para que o potencial de ação seja disparado.

A tabela 5 mostra o efeito da angiotensina II (100 nM) nas propriedades ativas dos neurônios do gânglio nodoso. O único parâmetro que apresentou mudança com a aplicação da angiotensina II foi a “rheobase”, que passou de  $219 \pm 40$  para  $147 \pm 31$  (N=19) na presença de angiotensina II. Esse resultado mostra que os neurônios necessitam de menos corrente para que os potenciais de ação sejam gerados na presença de angiotensina II.

## Propriedades Ativas dos Neurônios do Gânglio Nodoso



**Figura 6- Parâmetros do potencial de ação dos neurônios do gânglio nodoso.** O painel A mostra a hiperpolarização pós potencial de ação, duração do potencial de ação em 0 mV e pico do potencial de ação são mostrados em potencial de ação dos neurônios nodosos. O Painel B mostra o Threshold, o potencial no qual o neurônio é capaz de disparar potenciais de ação. O painel C mostra a “rheobase” que indica a quantidade de corrente capaz de despolarizar o neurônio para que o potencial de ação seja gerado.

	“Overshoot”	Hiperpolarização Pós Potencial de Ação	Duração do Potencial de Ação	Limiar de Excitabilidade (Threshold)	“Rheobase”
<b>Controle</b>	46,8 ± 2,4 mV (N=25)	-65,5 ± 2,3 mV (N=25)	1 ± 0,1 ms (N=25)	-40 ± 1,6 mV (N=19)	219 ± 40 pA* (N=19)
<b>ANG II (100 nM)</b>	41 ± 2 mV (N=25)	-61 ± 2,3 mV (N=25)	1,2 ± 0,2 ms (N=25)	-43 ± 1,8 mV (N=19)	147 ± 31 pA* (N=19)

\* p<0,05

**Tabela 5- Propriedades ativas dos neurônios do gânglio nodoso.**

#### **4.2- AÇÃO DA ANGIOTENSINA II (100nM) NA FREQUÊNCIA DE DISPAROS DE POTENCIAIS DE AÇÃO DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO**

Para estudarmos a ação da angiotensina II na frequência de disparo de potenciais de ação dos neurônios do gânglio nodoso foi usada a técnica de “patch clamp” no modo de “current clamp”, onde uma quantidade de corrente suficiente para atingir o limiar de excitabilidade (1X “threshold”) ou duas vezes este valor (2X “threshold”) foi injetada na célula por 500 ms. A angiotensina II (100 nM) é perfundida por 2 min e em seguida procede-se com a sequência de estimulação descrita.

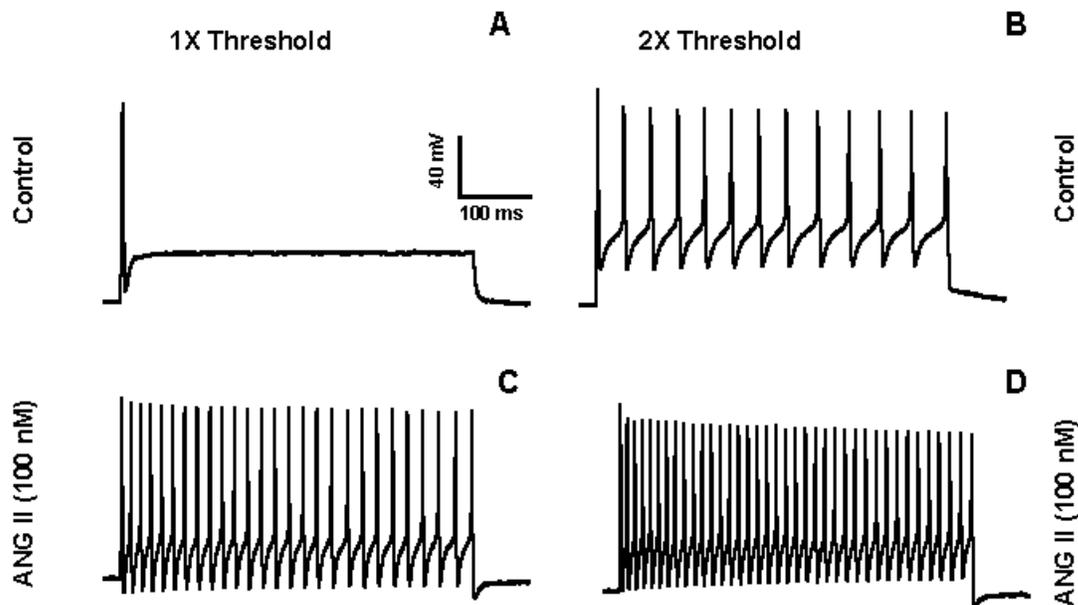
Angiotensina II tem a capacidade de aumentar a frequência de disparos de potenciais de ação em neurônios tônicos e fásicos do gânglio nodoso. Esse fenômeno só foi observado quando se usou uma temperatura de  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ . O número de potenciais de ação dos neurônios tônicos sofreu um aumento de  $711,0 \pm 262,8 \%$  (N=9) e, em neurônios do tipo fásico o aumento foi de  $1885 \pm 586,1 \%$  (N=13) quando se usou uma vez o “threshold”. Quando se usou duas vezes o “threshold” o aumento foi de  $204 \pm 57,6 \%$  (N=7) em neurônios do tipo tônico e de  $397 \pm 144 \%$  (N=5) em neurônios do tipo fásico (ver Tabela 4).

		<b>Número de Potenciais de Ação em 0,5 s</b>	<b>Número de Potenciais de Ação em 0,5 s na presença de ANG II (100 nM)</b>
<b>1X Threshold</b>	<b>Tônico (N=9)</b>	<b>8,0 ± 2,2 (f=16 Hz)</b>	<b>29,0 ± 5,3 (f=58 Hz)</b>
	<b>Fásico (N=13)</b>	<b>1 ± 0 (f=2 Hz)</b>	<b>19,0 ± 5,9 (f=38 Hz)</b>
<b>2X Threshold</b>	<b>Tônico (N=7)</b>	<b>28,0 ± 10,3 (f=56 Hz)</b>	<b>43,0 ± 8,6 (f=86 Hz)</b>
	<b>Fásico (N=5)</b>	<b>9,0 ± 3,0 (f=18 Hz)</b>	<b>21,0 ± 5,5 (f=42 Hz)</b>

**Tabela 6- Número de disparos de potenciais de ação em neurônios tônicos e fásicos do gânglio nodoso.**

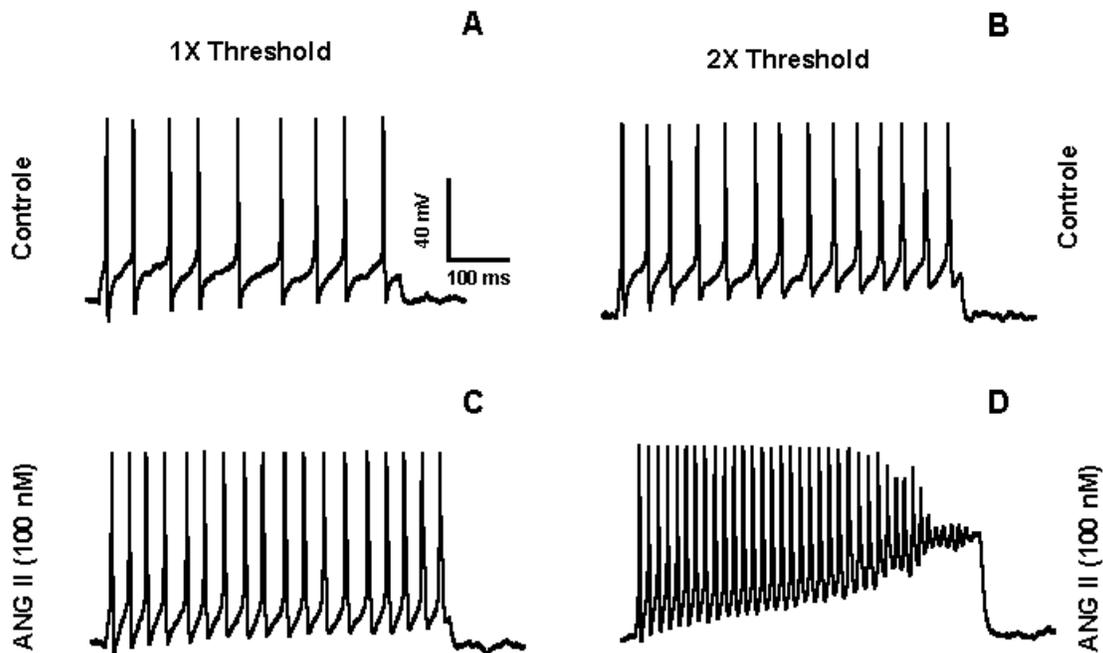
A figura 7 mostra registros de potenciais de ação obtidos em resposta a uma despolarização correspondendo a uma vez a intensidade limiar e a duas vezes este valor. Quando perfundi-se ANG II (~2 min) os neurônios fásicos tendem a assumir um comportamento tônico. A figura 8 mostra o mesmo tipo de experimento mas com uma diferença importante, os neurônios são do tipo tônico. Observe que a resposta à estimulação produz uma série de potenciais de ação durante o pulso de corrente aplicado. A perfusão de ANG II por ~2 min na concentração de 100 nM induziu a um aumento significativo na frequência de disparos (vide Tabela 5). O potencial de repouso foi monitorado durante todo o experimento e não houve uma despolarização significativa do potencial de repouso em consequência da presença do peptídeo ANG II.

### Efeito da Angiotensina II (100 nM) na Frequência de Disparos de Potenciais de Ação dos Neurônios Fásicos



**Figura 7- Potenciais de ação em um neurônio do gânglio nodoso do tipo fásico.** A técnica de “patch-clamp” foi usada na sua configuração de “whole-cell current-clamp” onde os potenciais de ação foram evocados com uma injeção de corrente despolarizante de 300 pA (1X threshold) por 500 ms e de 600 pA (2X threshold) também por 500 ms. O painel A representa a condição controle usando-se 1X o threshold. O painel B mostra o controle quando 2X o threshold é usado. O painel C representa a condição experimental onde a angiotensina II (ANG II) na concentração de 100 nM está presente em 1X threshold. O painel D mostra angiotensina II quando 2X threshold é usado. Estes experimentos foram realizados a uma temperatura de  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ .

### Efeito da Angiotensina II (100 nM) Sobre a Frequência de Disparos de Potenciais de Ação em Neurônios Tônicos



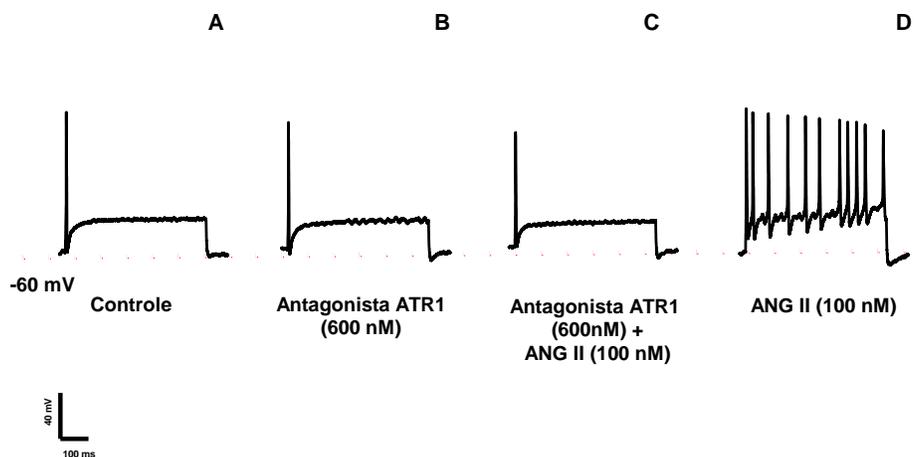
**Figura 8- Potenciais de ação em neurônios do tipo tônico.** A técnica de “patch-clamp” foi usada na sua configuração de “whole-cell current-clamp” onde os potenciais de ação foram evocados com uma injeção de corrente despolarizante de 300 pA (1X threshold) por 500 ms e de 600 pA (2X threshold) também por 500 ms. O painel A representa a condição controle usando-se 1X o threshold. O painel B mostra o controle quando 2X o threshold é usado. O painel C representa a condição experimental onde a angiotensina II (ANG II) na concentração de 100 nM está presente em 1X threshold. O painel D mostra angiotensina II quando 2X threshold é usado. Estes experimentos foram realizados a uma temperatura de  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ .

Para determinarmos qual o receptor de angiotensina II estaria envolvido no aumento da excitabilidade usamos antagonistas específicos para cada receptor. É importante ressaltar que o antagonista do receptor AT2 (PD123,319) teve uma ação agonista o que dificultou a interpretação dos nossos resultados e portanto não incluímos os dados referentes ao bloqueio do receptor AT2. O antagonista do receptor AT1 (600 nM) bloqueou o aumento da excitabilidade causado pela angiotensina II nos neurônios

nodosos como mostra a figura 9. Quando o antagonista era retirado e apenas angiotensina II era usada, a célula passa a responder ao peptídeo com aumento na frequência de disparos de potenciais de ação (Figura 3, painel D). Em 10 células testadas observamos a inibição do efeito da angiotensina II em 8 células sendo que em 1 célula a angiotensina II não foi capaz de aumentar a excitabilidade mesmo na ausência do antagonista.

### Aumento de Disparos de Potenciais de Ação pela Angiotensina II

#### Depende dos Receptores ATR1



**Figura 9- Bloqueio dos receptores AT1 pelo CV-113344 previne o efeito da ANG II sobre a excitabilidade.** O potencial de ação no neurônio do gânglio nodoso do tipo fásico foi evocado com uma injeção de corrente despolarizante de 300 pA por 500 ms. O antagonista CV-113344 (600 nM) impediu o efeito da angiotensina II (100 nM).

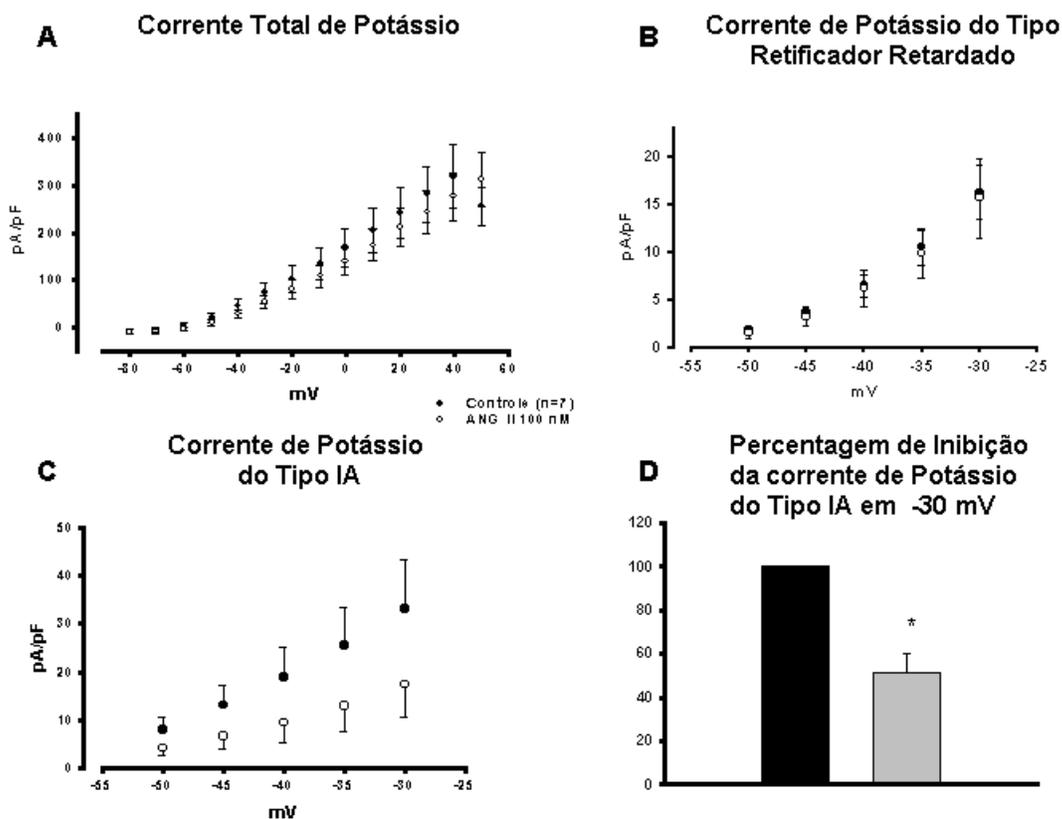
### 4.3- EFEITO DA ANGIOTENSINA II SOBRE AS CORRENTES DE POTÁSSIO

Para tentarmos explicar o efeito da angiotensina II sobre a frequência de disparos dos potenciais de ação dos neurônios do gânglio nodoso, estudamos o efeito da angiotensina II sobre as correntes de potássio dos neurônios nodosos. Para tal, usamos a técnica de “patch-clamp” no modo de “voltage-clamp” na configuração de “whole-cell”. Para isolarmos as correntes de potássio substituímos o sódio do meio extracelular pelo íon colina e usamos cobalto (1 mM), um antagonista não específico de canais para cálcio, para bloquear as correntes de cálcio.

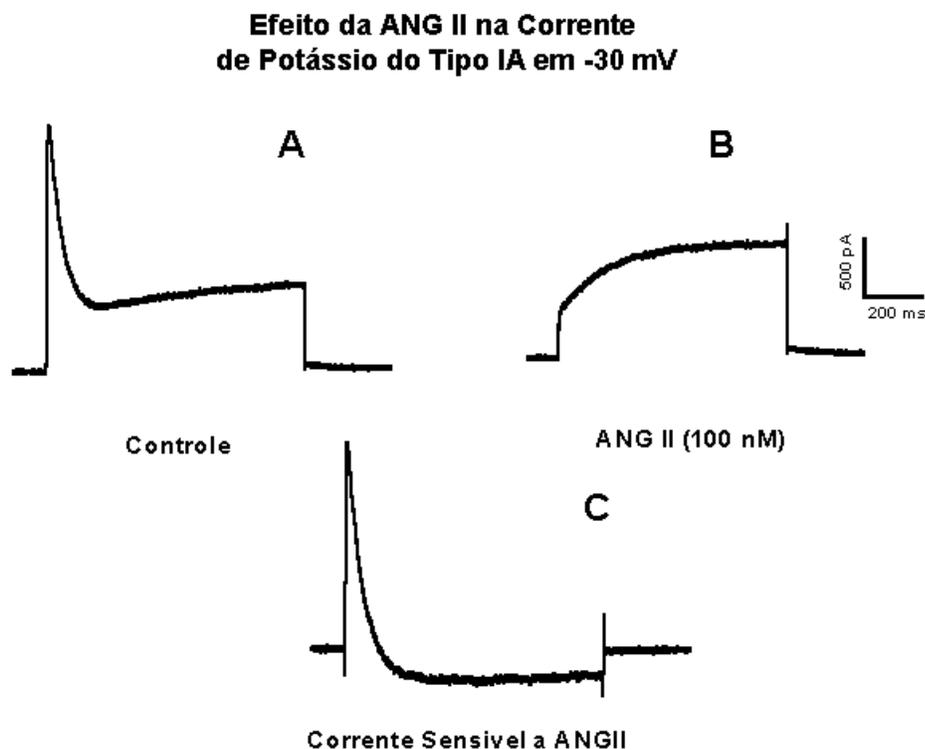
Os neurônios do gânglio nodoso eram despolarizados a uma frequência de 0,066 Hz, a partir de um potencial de repouso de  $-110$  mV (500 ms), com o objetivo de disponibilizar a maioria dos canais para potássio. Os pulsos variavam de  $-80$  até  $60$  mV com uma duração de 500 ms e intervalos de 5 mV. O painel A da figura 11 mostra a densidade de corrente total de potássio em função do potencial de membrana na presença e na ausência de angiotensina II (100 nM). Angiotensina II não modificou a corrente total de potássio (N= 7,  $p>0,05$ ). Para isolarmos a corrente de potássio do tipo retificadora retardada analisamos os valores de corrente no final do pulso despolarizante (450 ms depois de iniciarmos a despolarização para que as correntes  $I_A$  e  $I_D$  já estivessem entrado no estado inativado e, assim, não contribuíssem para essa série de medidas). A angiotensina II não modificou a corrente do tipo retificadora retardada como é mostrado na figura 10 no painel B (N=7,  $p>0,05$ ). A corrente do tipo IA foi estudada usando-se uma alta concentração de TEA (100 mM) para inibir a corrente do tipo retificadora retardada. O painel C da figura 11 mostra que a angiotensina II inibe a corrente do tipo

IA em neurônios do gânglio nodoso ( $N=6$ ,  $p<0,05$ ). Essa inibição foi de  $51 \pm 8,2\%$  no potencial de  $-30$  mV como mostra o gráfico de barras no painel D da figura 11. A figura 12 está mostrando os registros de corrente de potássio do tipo IA junto com a retificadora retardada (painel A) e após a perfusão com ANG II (100 nM, painel B). No painel C da figura 11 está o registro obtido pela subtração digital dos traçados mostrados anteriormente caracterizando a corrente sensível a angiotensina II.

### Efeito da Angiotensina II nas Correntes de Potássio dos Neurônios do Gânglio Nodoso



**Figura 10- Relações densidade de corrente vs potencial de membrana.** O painel A mostra a relação entre densidade da corrente total de potássio e voltagem na presença (círculos abertos) e na ausência de angiotensina II (círculos preenchidos) (N=7). O potencial de holding foi de  $-80$  mV. Um pré-pulso para  $-110$  mV foi aplicado por 500 ms para remover a inativação da corrente IA. Os pulsos aplicados variaram de  $-80$  a  $60$  mV em intervalos de 5 mV. O painel B mostra os valores da densidade de corrente para a corrente retificadora retardada medida depois de 450 ms do pulso despolarizante em função da voltagem (N=7). O significado dos símbolos é mesmo que o do painel A. O painel C mostra a relação entre a densidade de corrente de potássio do tipo IA e voltagem, na ausência (círculos fechados) e na presença (círculos abertos) de angiotensina II (100 nM). Essa corrente era medida logo após os primeiros 10 ms do pulso despolarizante (N=7). O painel D mostra a inibição induzida pela ANG II sobre a corrente de potássio do tipo IA que foi de  $51 \pm 8,2$  % (N=6,  $p < 0,05$ ) no potencial de membrana de  $-30$  mV.

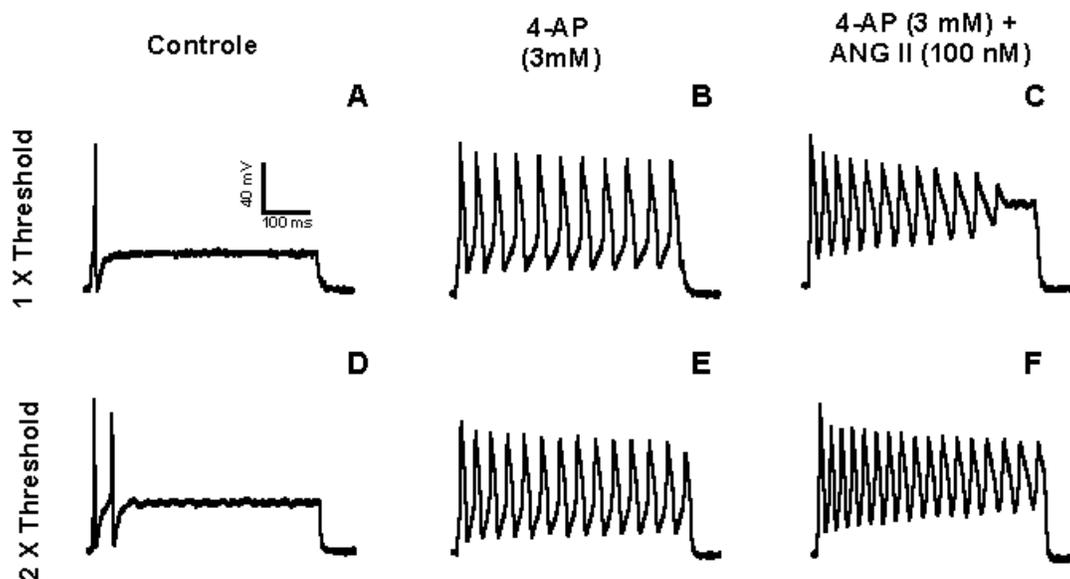


**Figura 11- Registros da corrente de potássio do tipo IA em neurônios do gânglio nodoso.** O painel A mostra um traçado de corrente típico evocado por um pulso de voltagem a partir de um potencial de  $-80$  mV para  $-30$  mV na presença de TEA (100

mM) na solução extracelular. Aplicou-se um pré-pulso para  $-110$  mV com uma duração de 500 ms. O painel B mostra um registro após a aplicação de angiotensina II (100 nM). O painel C mostra um registro resultante da subtração digital entre os registros controle e na presença de ANG II.

Para sabermos se a inibição da corrente de potássio do tipo IA, em neurônios do gânglio nodoso, é o único fator responsável pelo aumento do número de disparos de potenciais de ação, usamos a 4-aminopiridina (4AP, 3 mM) um bloqueador específico para essa corrente. Nos experimentos de “current-clamp” injetamos corrente despolarizante de intensidade suficiente para atingirmos uma ou duas vezes o limiar de excitabilidade. Subseqüentemente, a angiotensina II foi aplicada na presença da 4-AP para testarmos se mesmo na ausência da contribuição da corrente de potássio do tipo IA a angiotensina II causaria um aumento na excitabilidade neuronal. A figura 12 mostra um exemplo típico onde a presença de 4-AP não foi suficiente para impedir o efeito da angiotensina II, apesar de se observar uma diminuição na porcentagem do aumento da frequência de potenciais de ação, a perfusão de angiotensina II na presença de 4-AP é capaz de aumentar a frequência de disparos de potenciais de ação em relação à situação na presença de 4-AP. Esse comportamento foi observado tanto em neurônios fásicos quanto em neurônios tônicos. Em 9 células testadas 7 tiveram um aumento de frequência de disparos quando angiotensina II foi aplicada na presença de 4-AP e duas não. Portanto a inibição da corrente de potássio do tipo IA pela angiotensina II contribui para o aumento da excitabilidade desses neurônios porém não é suficiente visto que na presença de 4-AP, a angiotensina II aumentou o número de disparos de potenciais de ação.

**Efeito da ANG II (100 nM) na Frequência de Disparos de Potenciais de Ação na Presença de 4 AP (3 mM)**

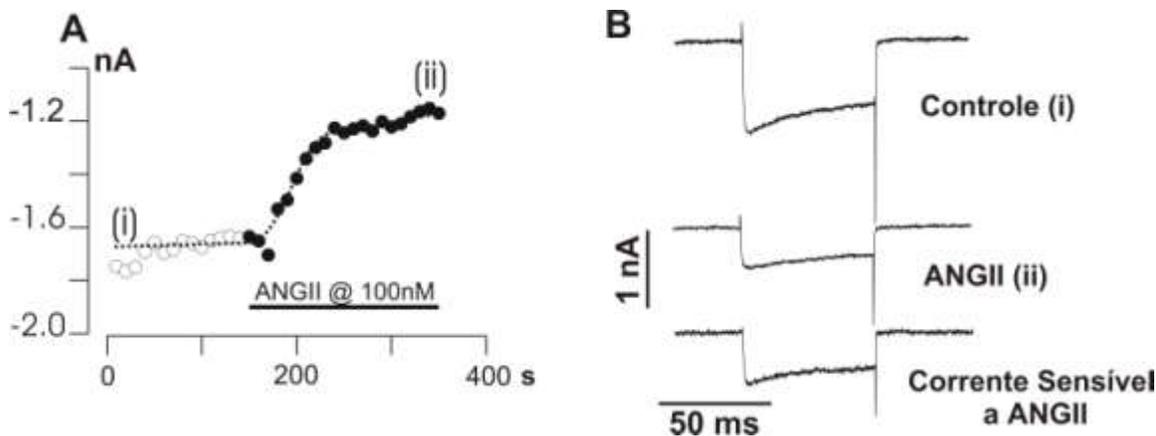


**Figura 12-** Efeito da angiotensina II (100 nM) na frequência de disparos dos neurônios nodosos na presença de 4-AP (3 mM). O painel A mostra o controle com 1 X threshold. O painel B mostra um potencial de ação evocado por 1 X threshold na presença de 4-AP. O painel C mostra um potencial de ação evocado por 1 X threshold na presença de 4-AP e angiotensina II. O painel D mostra o controle com 2 X threshold. O painel E mostra um potencial de ação evocado por 2 X threshold na presença de 4-AP. O painel E mostra um potencial de ação evocado por 2 X threshold na presença de 4-AP e angiotensina II. Potenciais de ação evocados com a injeção de 250 pA na primeira linha e 500 pA na segunda linha.

#### **4.4- ANGIOTENSINA II INIBE AS CORRENTES DE CÁLCIO ATIVADAS POR ALTA VOLTAGEM**

Foi estudado o efeito da angiotensina II (100 nM) sobre as correntes de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso. Para tal usamos um protocolo, já descrito na metodologia, capaz de isolar as correntes de cálcio ativadas por baixa e alta voltagem. As correntes de potássio foram bloqueadas com o TEA e, para evitar a interferência das correntes de sódio esse íon foi substituído por colina. Os neurônios do gânglio nodoso eram repetitivamente despolarizados, a uma frequência de 0,1 Hz, a partir de um potencial de repouso de  $-80$  mV para  $-40$  mV por 100 ms, para inativar as correntes de cálcio do tipo T e subsequentemente despolarizar para 0 mV por 100 ms. A despolarização final produz uma corrente de entrada que foi completamente bloqueada por cádmio (100  $\mu$ M), um bloqueador não específico de canais para cálcio. A aplicação de angiotensina II (100 nM) leva a uma inibição de 50% da corrente total de cálcio. A figura 13 no painel A está representado o curso temporal da inibição pela angiotensina II da corrente de cálcio obtida em resposta a um pulso constante de despolarização (0 mV). O painel B mostra os registros representativos para as correntes de cálcio adquiridas nos pontos indicados. O último registro mostrado no painel B foi obtido através de uma subtração digital dos registros controle (i) e na presença de ANG II (ii). O traçado (iii) representa o componente sensível à angiotensina II.

## Angiotensina II Inibe as Correntes de Cálcio em Neurônios do Gânglio Nodoso

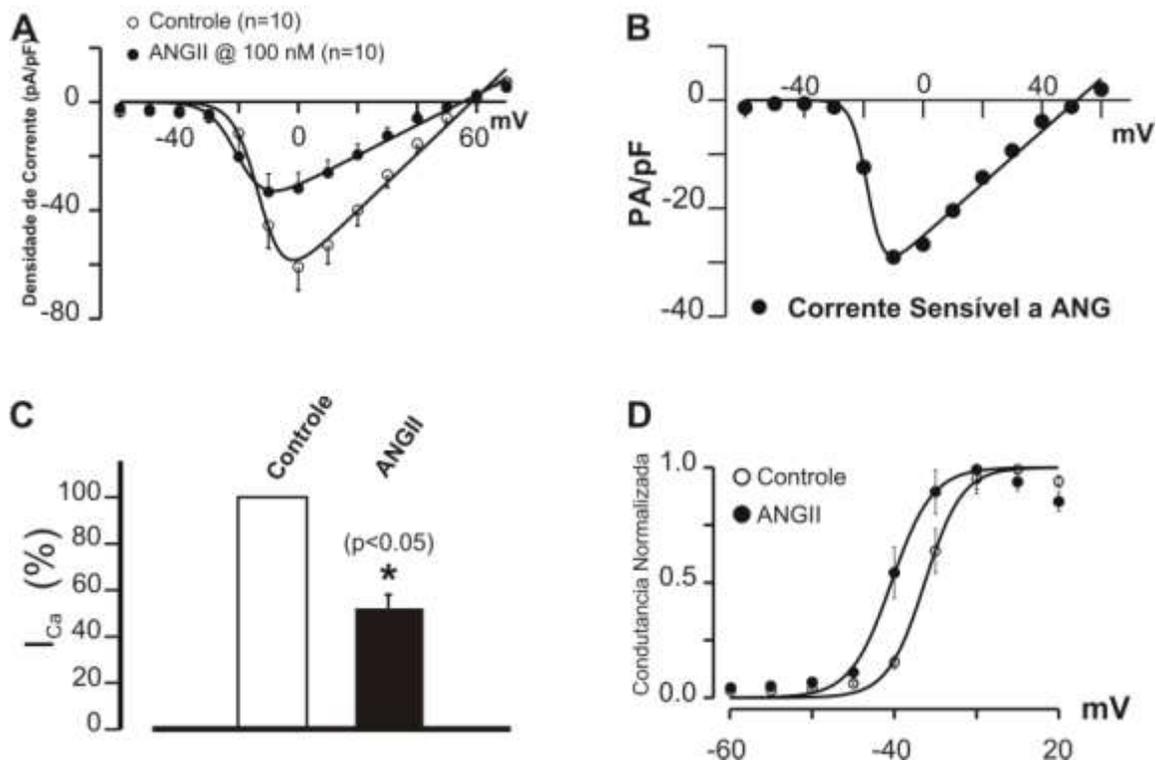


**Figura 13- Angiotensina II inibe as correntes de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso.** O painel A mostra o curso temporal da inibição da corrente de cálcio induzida pela ANG II. Cada ponto representa o valor do pico da corrente medida a cada 10 s. Os símbolos vazios indicam os valores do controle e os preenchidos na presença de ANG II. Painel B mostra os registros representativos das correntes nessa célula tomados em pontos temporais distintos e progressivos (i e ii).

A dependência de voltagem dos canais para cálcio na ausência e na presença de ANG II foi estudada a partir da determinação da relação entre a densidade de corrente e o potencial de membrana ( $I_xV$ ). As correntes foram ativadas aplicando-se pulsos despolarizantes a partir de  $-80$  mV, primeiro para  $-40$  mV por 100 ms e depois para potenciais entre  $-40$  mV e  $60$  mV em intervalos de 10 mV. No painel A (Figura 14) estão os valores médios de densidade de corrente na ausência (círculos abertos,  $N=10$ ) e depois da aplicação de angiotensina II (círculos fechados,  $N=10$ ). O valor de potencial onde a

corrente atinge seu valor máximo, na presença de ANG II, foi deslocado de 6 mV para a direção hiperpolarizante ( $p < 0,005$ ,  $n = 10$ ). Em 0 mV a densidade da corrente de cálcio foi de  $-60,9 \pm 8,7$  pA/pF no controle e de  $-31,9 \pm 5,7$  pA/pF na presença de angiotensina II representando um bloqueio de  $45,4 \pm 5,9$  % (Figura 14, painel C). O painel B (Figura 7) representa a dependência de voltagem dos canais para cálcio que foram sensíveis à ANG II. Para melhor quantificar o efeito da angiotensina II na ativação da corrente de cálcio, foi calculada a condutância da membrana para cada valor de potencial (ver Métodos) e normalizada em relação a condutância máxima (Figura 14C). O ajuste foi feito usando-se a função de Boltzmann (como descrito em Métodos). A figura 14C mostra os pontos experimentais calculados e a curva resultante do ajuste. A análise das curvas mostrou que o ponto médio ( $V_{50}$ ) e a inclinação da curva são  $-12,5 \pm 1,5$  mV e  $3,2 \pm 0,5$  mV para o controle e  $-18,4 \pm 2,8$  mV e  $3,1 \pm 0,5$  mV para angiotensina II, respectivamente. Esses resultados indicam que a angiotensina II inibe as correntes de cálcio e, aparentemente, muda a sua dependência de voltagem para a ativação.

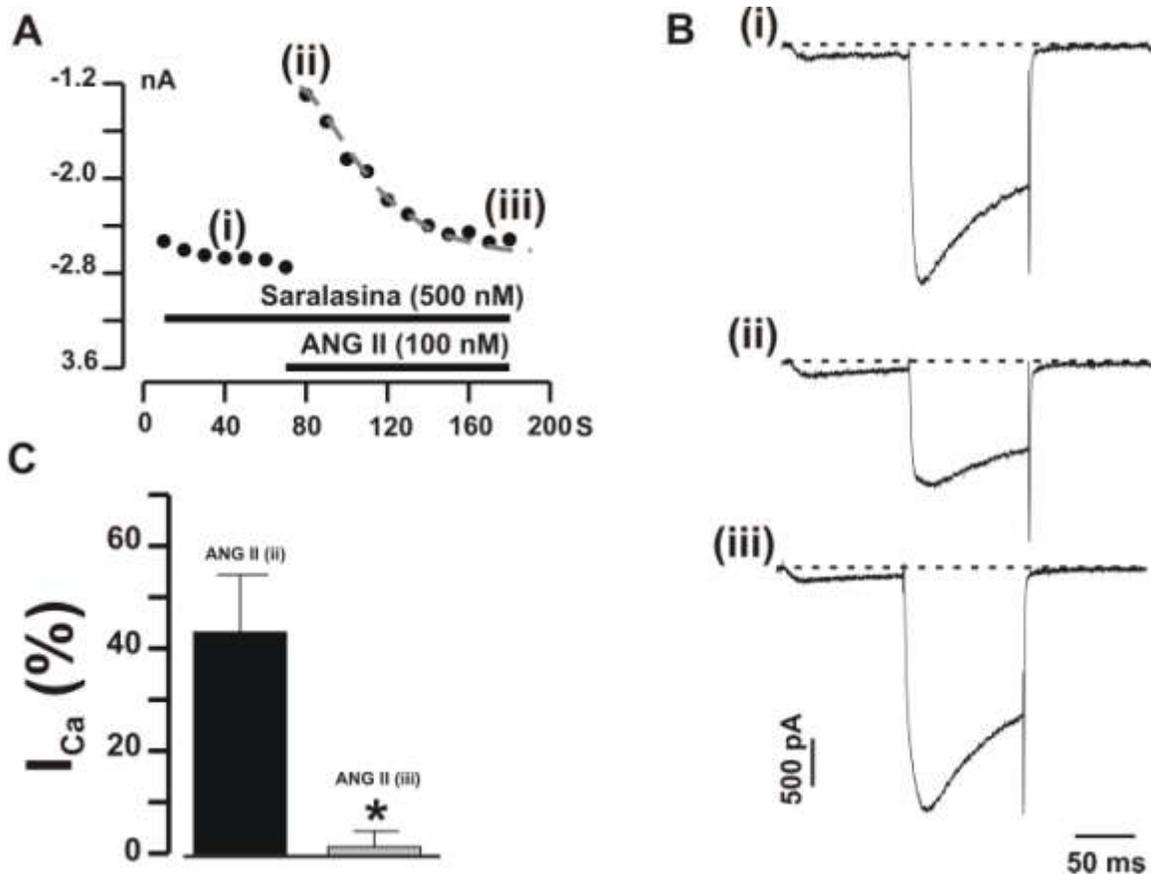
## Angiotensina II Modifica Ativação da Corrente de Cálcio em Neurônios do Gânglio Nodoso



**Figura 14- Caracterização do efeito da ANG II sobre as correntes de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso.** Painel A, relação densidade de corrente vs voltagem na ausência e na presença de angiotensina II (100 nM, N=10). Painel B, relação densidade de corrente e voltagem da corrente sensível a angiotensina II obtida através da diferença entre os pontos controle e na presença de ANG II. A curva foi obtida usando a equação de Boltzmann como descrito em Métodos. Painel C, porcentagem de inibição da corrente macroscópica total de cálcio em 0 mV. Painel D, condutância normalizada. O ajuste seguiu a distribuição de Boltzmann com os parâmetros descritos no texto.

Para se provar que a inibição da corrente total de cálcio pela angiotensina II era dependente da ativação dos receptores para angiotensina II nos neurônios do gânglio nodoso usamos, inicialmente, um antagonista não seletivo de receptores para angiotensina II. Saralasin (500 nM) foi perfundida antes da aplicação de angiotensina II. Como é visto na figura 15A, a saralasin abole o componente persistente da inibição pela angiotensina II e revela um componente transitório dessa inibição que não era visível quando angiotensina II era aplicada sozinha (N=4). Esse resultado sugere um componente inibitório independente dos receptores para angiotensina II do tipo AT1 ou AT2. Na parte B da figura 15 estão exemplos de registros das correntes de cálcio na presença de saralasin (Bi), saralasin e ANG II após 10 s (Bii) e saralasin e ANG II após 100 s (Biii). O painel C resume os resultados obtidos quando as correntes de cálcio foram adquiridas depois da aplicação da angiotensina II na presença mantida da saralasin. A barra preta representa a inibição das correntes de cálcio após 10 s de aplicação de angiotensina II e a barra cinza representa a inibição após 100 s de aplicação de angiotensina II. É importante ressaltar que na concentração de 500 nM a saralasin não mostrou efeito significativo sobre a corrente total de cálcio.

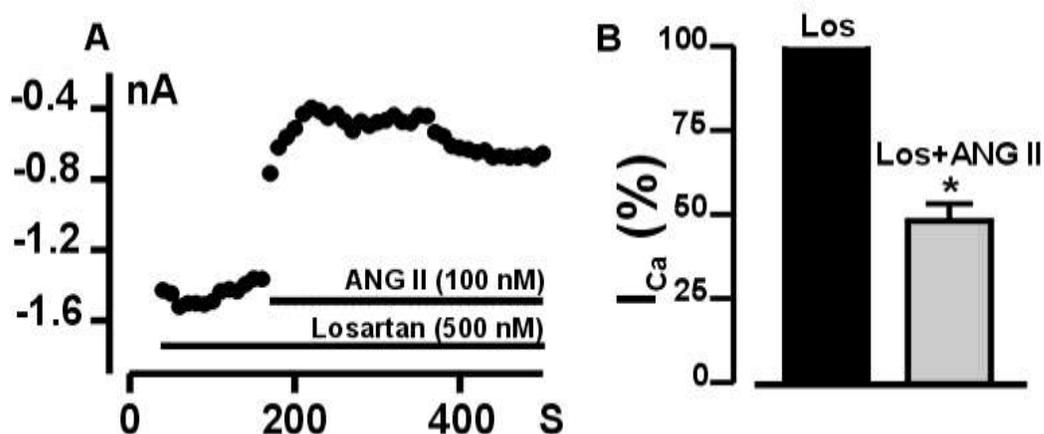
### Efeito da Saralasin na Inibição da Corrente de Cálcio via Angiotensina II



**Figura 15- Efeito da saralasin sobre a inibição das correntes de cálcio induzida por ANG II.** Painel A, amplitude da corrente de cálcio em função do tempo mostrando que: (i) saralasin (500 nM) não induziu mudanças; (ii) o bloqueio pela angiotensina II na presença de saralasin e (iii) depois de aproximadamente 80 s na presença contínua de saralasin e angiotensina II. A amplitude da corrente volta para valores próximos do controle. Painel B, registros das correntes de cálcio obtidas em resposta a pulsos de voltagem de  $-80$  mV para  $0$  mV antes (i) e depois da aplicação de angiotensina II (ii e iii) na presença de saralasin. Painel C, porcentagem de inibição das correntes de cálcio obtida nos neurônios logo após a aplicação (barra preta,  $N=4$ ) ou depois de  $\sim 110$  s da aplicação de angiotensina II (barra cinza,  $N= 4$ ). Observar que a saralasin estava presente durante o todo o experimento. Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

O painel A da figura 16 mostra o efeito do losartan, um antagonista específico de receptores para angiotensina II do tipo AT1, sobre o bloqueio parcial induzido pela angiotensina II. Depois de um pré-tratamento com 500 nM de losartan o efeito inibitório exercido pela angiotensina II na corrente de cálcio não foi abolido. A diminuição dos valores da corrente atingiu cerca de  $48,6 \pm 5,1$  %, como pode ser visto na figura 16A e 16B ( $p < 0,05$ ,  $N=7$ ). É importante notar que o curso temporal do efeito da angiotensina II na presença de losartan na corrente de cálcio é muito similar àquele para a angiotensina II (ver Figura 13). Esses resultados indicam que a inibição da corrente de cálcio pela ANG II em neurônios do gânglio nodoso não se dá através do receptor AT1.

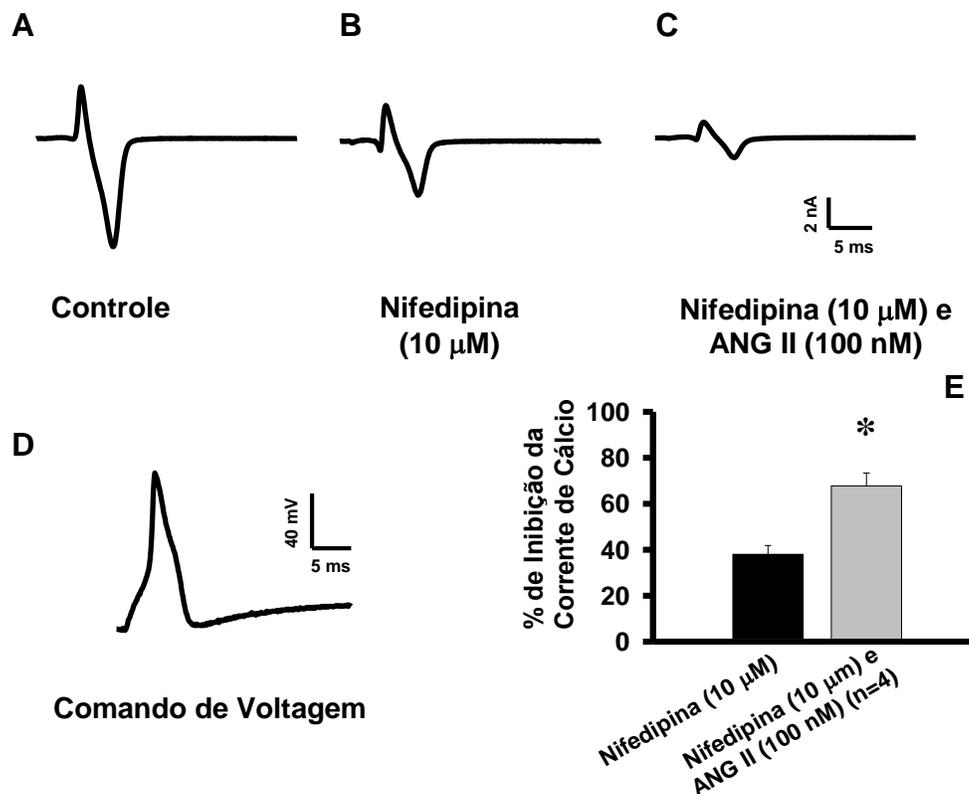
#### Efeito do Losartan (500 nM) na Inibição da Corrente de Cálcio via Angiotensina II



**Figura 16- Losartan não abole o efeito da ANG II.** Painel A, amplitude da corrente (em 0 mV) em função do tempo indicando que o losartan (500 nM) não modificou a inibição da corrente de cálcio pela angiotensina II. Painel B, a barra preta representa a condição controle (somente losartan) e a barra cinza representa a porcentagem de inibição da corrente pela angiotensina II na presença do losartan. Os asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ ,  $N=7$ ).

Como a dependência de voltagem da corrente sensível a ANG II assemelhava-se muito à corrente do tipo L, nós resolvemos investigar a possibilidade da ANG II estar inibindo exclusivamente o componente devido a ativação dos canais do tipo L. Para isso nós bloqueamos esses canais com nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador para canais para cálcio do tipo L, e posteriormente perfundimos angiotensina II. Foi utilizado um potencial de ação, como mostrado na figura 17D, previamente gravado no modo “current-clamp” como comando de voltagem, dessa maneira a corrente de cálcio estudada corresponderia a entrada de cálcio ativada por um potencial de ação. A nifedipina inibiu  $38,0 \pm 3,8\%$  ( $N=4$ ,  $p < 0,05$ ) da corrente total de cálcio ativada pelo potencial de ação; angiotensina II juntamente com nifedipina inibiu  $67,0 \pm 5,5\%$  da corrente total. Como angiotensina II, quando aplicada na ausência de qualquer inibidor (figura 14, painel C) inibe ~40% da corrente total e na presença de nifedipina inibiu cerca de 30 % da corrente de cálcio resistente à nifedipina. Os resultados nos permitem concluir que a maior parte da inibição da corrente de cálcio pela angiotensina não se dá nos canais do tipo L. A parte A da figura 17 mostra um registro de corrente típica de cálcio ativada pelo potencial de ação, em seguida é mostrada a inibição da corrente do tipo L pela nifedipina (B). Na presença de nifedipina a angiotensina II é perfundida e uma inibição subsequente é observada (painel C). A porcentagem de inibição é mostrada no painel D.

**Efeito da Nifedipina (10  $\mu$ M) na Inibição da  
Corrente de Cálcio via Angiotensina II**

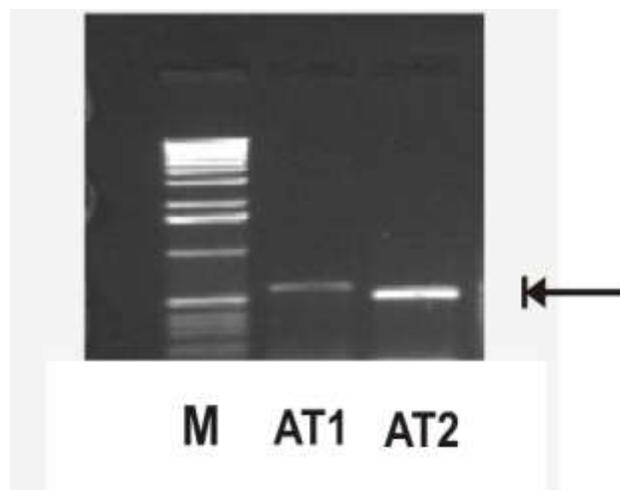


**Figura 17- Efeito da Nifedipina (10  $\mu$ M) na Inibição da Corrente de Cálcio via ANG II.** Os painéis A, B e C mostram os registros de correntes de cálcio obtidos em resposta a pulsos de voltagem na forma de potenciais de ação obtidos previamente (ver painel D). Painel B, inibição da corrente de cálcio pela nifedipina (10  $\mu$ M). Painel C, inibição da corrente de cálcio pela nifedipina e angiotensina II. O gráfico do painel D mostra a inibição das correntes de cálcio por nifedipina (38%  $\pm$  3,8, N=4, barra preta) e nifedipina juntamente com angiotensina II (67,7%  $\pm$  5,5, N=4, barra cinza,  $p < 0,05$ ).

#### 4.5- Presença de ARN Mensageiro Para os Receptores AT1 e AT2 no Gânglio Nodoso.

Para investigar a presença de ARN mensageiro para os receptores para angiotensina II nos neurônios do gânglio nodoso de ratos adultos, utilizou-se a técnica de RT-PCR, já descrita em Métodos. A figura 18 mostra um gel representativo dos experimentos onde foi verificado a presença de transcritos tanto para os receptores de angiotensina II AT1 quanto AT2.

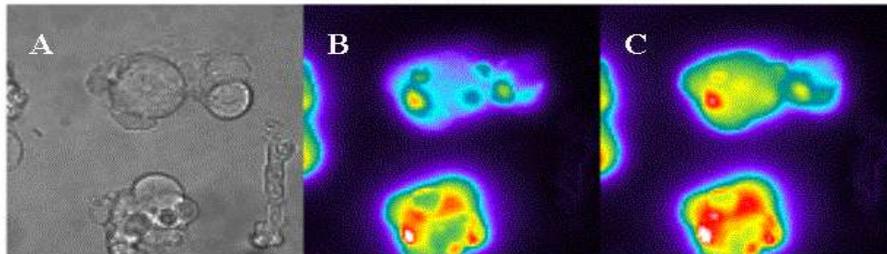
#### RT-PCR dos Neurônios do Gânglio Nodoso Para Detectar Transcritos de AT1 e AT2



**Figura 18- Presença de ARN mensageiro de AT1 e AT2 no gânglio nodoso.** Canaleta 2 mostra o produto de PCR para os “primers” de AT1 com 599 pares de base, canaleta 3 produto de PCR para os “primers” de AT2 com 519 pares de bases. Na canaleta 1 o padrão de peso molecular de 1 Kb (Gibco).

#### **4.6- ANGIOTENSINA II CAUSA UM AUMENTO TRANSIENTE DE CÁLCIO NO CITOPLASMA DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO NODOSO.**

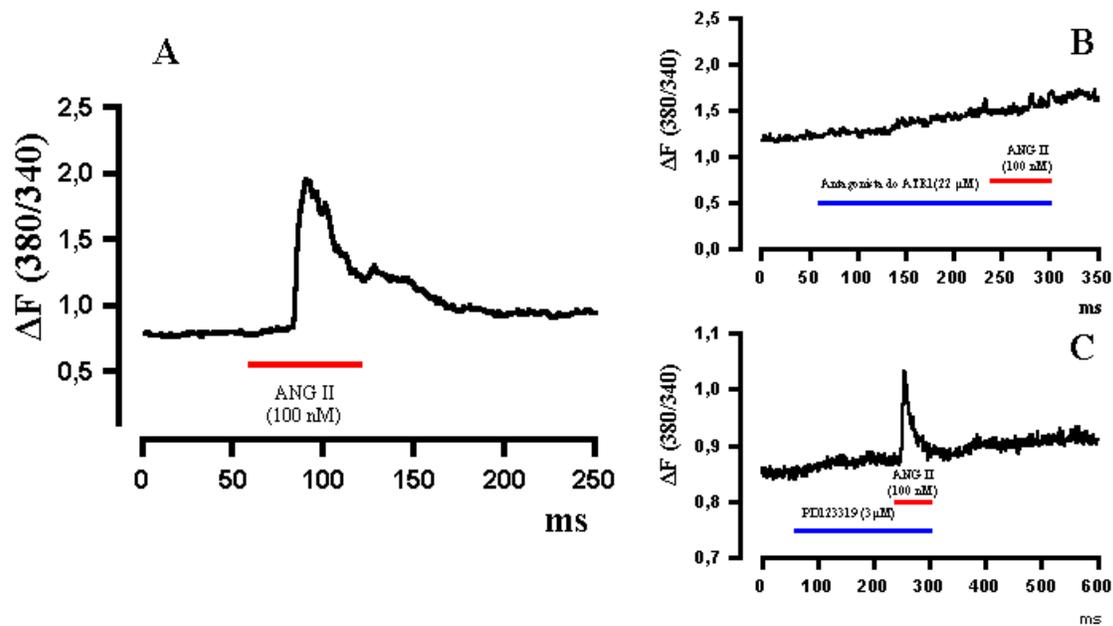
A principal via de sinalização da angiotensina II é pela produção do inositol-1,4,5-trisfosfato, o que leva a uma liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Como o cálcio intracelular participa de uma série de processos bioquímicos, inclusive a modulação de canais iônicos, foi importante saber se a aplicação de angiotensina II nos neurônios do gânglio nodoso era capaz de levar a um aumento do cálcio no citoplasma celular. Para tal usou-se técnicas de microfluorimetria, onde os neurônios eram “carregados” com uma sonda de cálcio “ratiométrica”, a Fura-2. Essa molécula emite fluorescência na faixa de 560 nm. Quando o Fura-2 não está ligada ao cálcio é excitada a 380 nm, quando ligada é excitada a 340 nm. A figura 19 mostra uma célula em contraste de fase no painel A. O painel B mostra a fluorescência basal da fura 2 e o painel C mostra a fluorescência durante a perfusão de angiotensina II (100 nM). Em 12 células testadas todas responderam com um transiente de cálcio à aplicação de angiotensina II a 30°C.



**Figura 19- ANG II aumenta a concentração de cálcio intracelular.** Painel A, micrografia de contraste de fase dos neurônios do gânglio nodoso em cultura primária “carregados” com Fura-2. Painel B, fluorescência das células no repouso. Painel C, aumento da fluorescência durante a perfusão com angiotensina II (100 nM).

Para sabermos qual o receptor de angiotensina II seria o responsável pelo transiente de cálcio observado, nós usamos antagonistas específicos para os receptores para angiotensina II como mostra a figura 20. Verificou-se que na presença do antagonista do AT1, o transiente de cálcio é abolido (Painel B, N=8) . Quando usamos o antagonista para os receptores AT2 não observamos alterações significativas na concentração de cálcio intracelular (Painel C, N=7). Portanto, podemos sugerir que o transiente de cálcio evocado pela angiotensina II é devido a ativação do receptor AT1.

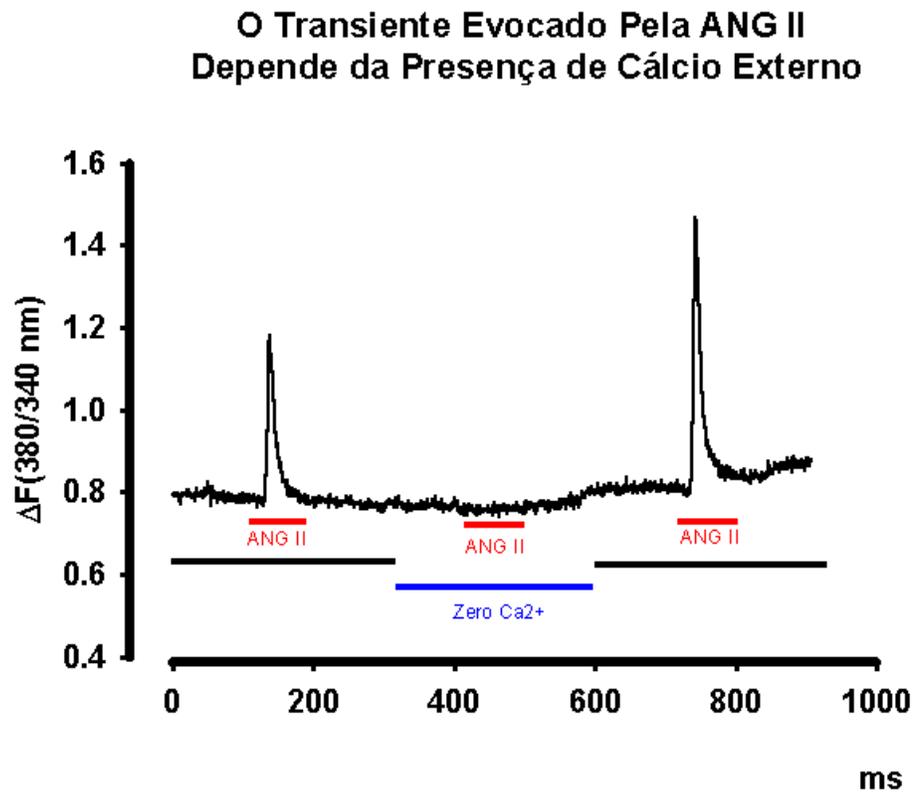
## ANG II Evoca Transiente de Cálcio



**Figura 20- ANG II evoca transientes de cálcio.** Medidas das variações na concentração de cálcio citossólica em resposta a estimulação com ANG II. Painel A, aumento típico da concentração de cálcio citossólica em um neurônio do gânglio nodoso em resposta a aplicação de angiotensina II (100 nM). Painel B, bloqueio do transiente evocado pela angiotensina II pelo antagonista dos receptores do tipo AT1 (N=8). Painel C, transiente de cálcio evocado pela angiotensina II na presença do antagonista dos receptores AT2 (N=7).

Para investigarmos a participação do cálcio extracelular no transiente evocado pela estimulação com angiotensina II em neurônios do gânglio nodoso, usamos uma solução externa livre de cálcio (zero nominal). Quando angiotensina II era aplicada na ausência de cálcio extracelular o transiente de cálcio não mais se desenvolvia (N= 4) como pode ser verificado pela inspeção da figura 21. Pode-se concluir com base nestas

observações que o transiente de cálcio provocado pela angiotensina II em neurônios do gânglio nodoso depende da presença do cálcio no meio extracelular.



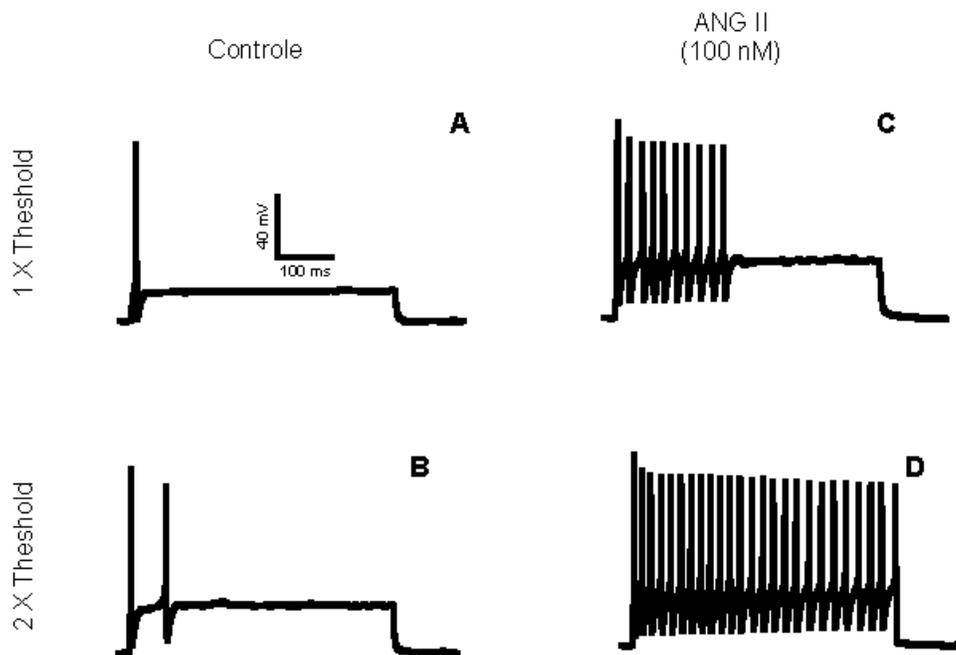
**Figura 21.** O transiente de cálcio evocado pela ANG II depende da presença de cálcio no meio extracelular.

#### **4.6- Efeito da Angiotensina II em Modelos Animais Que Desenvolvem Hipertensão de Maneira Espontânea.**

Como os neurônios do gânglio nodoso parecem ter um papel importante no controle da atividade de diversos órgãos vitais e, como temos demonstrado até agora a ANG II exerce uma função regulatória muito significativa nesses neurônios, ficamos bastante interessados em investigar qual seria o efeito da ANG II nos neurônios do nodoso isolados de animais que estivessem experimentando níveis altos de angiotensina II circulante. A literatura trás uma quantidade enorme de dados sobre um modelo de hipertensão onde os animais são hipertensos desde o nascimento. Esse modelo é conhecido como SHR do inglês “Spontaneous Hypertensive Rats” e possuem o seu “background” genético que são os WKY (“Wistar Kyoto”, ratos normotensos).

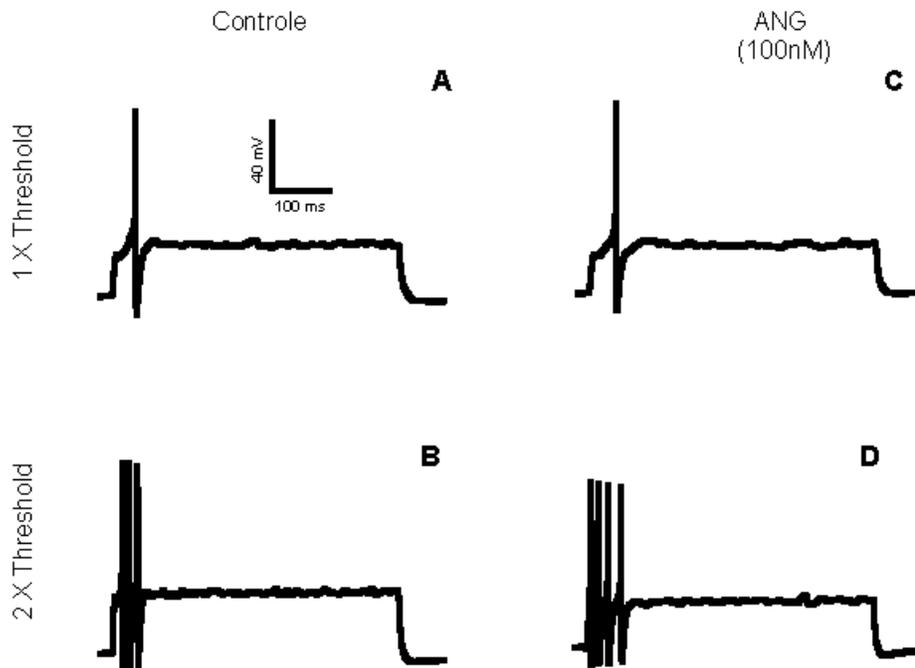
Decidimos estudar o efeito da angiotensina II na excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso provenientes de animais hipertensos. Os animais WKY responderam com aumento da excitabilidade a aplicação de angiotensina II, da mesma maneira que os animais usados anteriormente, “wistar”, como mostra a figura 22 (N=9). Os animais SHR não responderam a aplicação da angiotensina II com aumento da frequência de disparos de potenciais de ação (N=12), como mostra a figura 23.

### Efeito da ANG II nos Neurônios do Gânglio Nodoso de Animais WKY



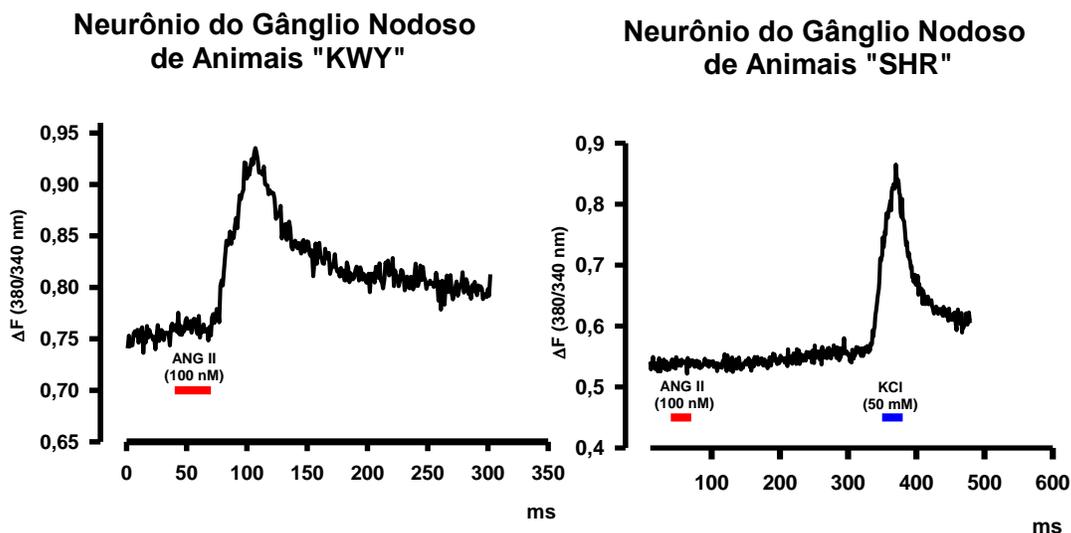
**Figura 22- Efeito da ANG II nos neurônios do gânglio nodoso de animais WKY.** onde os potenciais de ação foram evocados com uma injeção de corrente despolarizante de 300 pA (1X threshold) por 500 ms e de 600 pA (2X threshold) também por 500 ms. O painel A representa a condição controle usando-se 1X o threshold. O painel B mostra o controle quando 2X o threshold é usado. O painel C representa a condição experimental onde a angiotensina II (ANG II) na concentração de 100 nM está presente em 1X threshold. O painel D mostra angiotensina II quando 2X threshold é usado. Estes experimentos foram realizados a uma temperatura de  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ .

### Efeito da ANG II nos Neurônios do Gânglio Nodoso de Animais SHR



**Figura 23- Efeito da angiotensina II nos neurônios do gânglio nodoso de animais SHR.** Os potenciais de ação foram evocados com uma injeção de corrente despolarizante de 100 pA (1X threshold) por 500 ms e de 200 pA (2X threshold) também por 500 ms. O painel A representa a condição controle usando-se 1X o threshold. O painel B mostra o controle quando 2X o threshold é usado. O painel C representa a condição experimental onde a angiotensina II (ANG II) na concentração de 100 nM está presente em 1X threshold. O painel D mostra angiotensina II quando 2X threshold é usado. Estes experimentos foram realizados a uma temperatura de  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ .

Decidimos também estudar o efeito da angiotensina II sobre os níveis de cálcio intracelular nos neurônios isolados do gânglio nodoso dos animais com fenótipo normal (WKY) e hipertenso (SHR). Os neurônios do gânglio nodoso provenientes dos animais controle (ratos WKY) desenvolveram um transiente de cálcio quando a angiotensina II (100 nM) era aplicada (Figura 15, gráfico da esquerda, N=6). Contudo as células dos animais SHR não foram capazes de evocar um transiente de cálcio em resposta a angiotensina II (Figura 15, gráfico da direita, N=10). Estes resultados sugerem que nos animais SHR, pelo menos no gânglio nodoso, a densidade de expressão dos receptores AT1 está reduzida apesar de não termos evidências diretas para reforçar esta assertiva.



**Figura 24-** Medidas dos transientes de cálcio evocado pela ANG II em neurônios de animais WKY e SHR. O gráfico da esquerda mostra que a angiotensina II (100 nM) evoca um transiente de cálcio em um neurônio do gânglio nodoso de ratos WKY (N=6).

O gráfico da direita mostra que angiotensina II (100 nM) foi incapaz de evocar um transiente de cálcio em animais SHR (N=10), contudo quando uma alta concentração de potássio é usada um transiente nítido de cálcio foi observado.

## 5- DISCUSSÃO

A angiotensina II aumentou a frequência de disparos de potenciais de ação em neurônios do gânglio nodoso. Esse efeito já havia sido descrito utilizando-se animais anestesiados e um microeletrodo de tungstênio para captar os potenciais de ação no espaço extracelular (Thompson *et al.*, 2000b), com uma concentração que difere da usada no nosso trabalho (100 nM vs 10  $\mu$ M). Nossos dados sugerem que o aumento na descarga de potenciais de ação é dependente da ativação dos receptores AT1, uma vez que o CV 113344 considerado um antagonista para os receptores AT1, previne o aumento da excitabilidade na presença da ANG II (ver Figura 9). Esse aumento de frequência de disparo foi observado tanto em neurônios do tipo tônico quanto em neurônios do tipo fásico, portanto o alvo da ativação dos receptores AT1 deve ser um canal expresso de maneira similar em ambos fenótipos neuronais.

A angiotensina II não modificou de modo significativo os parâmetros elétricos passivos desses neurônios (resistência de entrada e potencial de repouso, Tabela 3) nem dos parâmetros ativos estudados (ver Tabela 4). Observamos, no entanto, uma modificação significativa da reobase. Como a reobase influencia diretamente o valor do limiar de excitabilidade seria esperado que, uma mudança em um desses parâmetros causasse uma mudança no outro também.

Nós procuramos investigar as bases iônicas desse aumento de frequência de descarga. Como no modelo matemático desenvolvido por Schild et al (1994), baseado nos potenciais de ação dos neurônios nodosos, foi visto que as correntes de potássio sensíveis a 4-AP, a  $I_A$  e a  $I_D$ , são responsáveis pela hiperpolarização dos potenciais de ação nesses neurônios, logo a inibição dessas correntes de potássio levaria a um aumento da frequência de disparos (Schild *et al*; 1994). Com base nesse modelo a nossa primeira hipótese foi que o aumento da frequência de disparos causada pela angiotensina II era consequência de uma inibição nas correntes de potássio, principalmente as sensíveis a 4-AP. Nossa hipótese tinha respaldo na literatura, já que a angiotensina II tem a capacidade de inibir diversos tipos de correntes de potássio (Wang *et al.*, 1997).

Para testarmos a nossa hipótese isolamos as correntes de potássio desses neurônios e verificamos se a presença de angiotensina II causaria uma modulação nessas correntes. O peptídeo não apresentou efeito significativo na corrente total de potássio, nem na corrente do tipo retificadora retardada (Figura 10A e 10B). Quando testamos a ação da angiotensina II sobre a corrente do tipo IA verificamos que angiotensina II foi capaz de inibir essa corrente de potássio. Essa corrente apresenta uma inativação rápida e é ativada em potenciais entre  $-50$  e  $-40$ .

Esse efeito sobre a corrente de potássio do tipo IA poderia ser o responsável exclusivo do aumento da frequência de disparos dos neurônios nodosos. Para confirmarmos essa possibilidade usamos uma estratégia de oclusão em experimentos de current clamp, onde medíamos os potenciais de ação. Primeiramente a corrente do tipo IA era bloqueada com 4-AP e em seguida perfundíamos angiotensina II na presença da 4-AP. Como os canais do tipo IA estavam ocluídos pela presença da 4-AP, se a

angiotensina II tivesse efeito exclusivo nos canais para potássio do tipo IA, a perfusão da angiotensina II não seria capaz de modificar a frequência de disparos de potenciais de ação. O que observamos foi que a angiotensina II foi capaz de aumentar o número de potenciais de ação disparados mesmo na presença da 4-AP. O aumento da frequência de disparos causado pela angiotensina II na presença da 4-AP foi menor que o aumento causado na ausência do bloqueador o que sugere uma participação importante do bloqueio da corrente de potássio pela angiotensina II para que haja um aumento da frequência de disparos de potenciais de ação. Contudo esse não é o mecanismo exclusivo desse aumento na excitabilidade. Uma outra curiosidade foi o aumento da duração do potencial de ação causado pela 4-AP, o que não foi observado quando a angiotensina II era usada. Esse dado vai de encontro ao que nós havíamos postulado. Se a angiotensina II agisse de uma maneira apenas similar a 4-AP nós esperaríamos os mesmos tipos de alterações no potencial de ação dos neurônios nodosos, o que não observamos. Para continuarmos buscando as bases iônicas para essa mudança nós decidimos estudar a corrente de cálcio isoladamente e investigarmos se angiotensina II estava modulando essa corrente.

Os canais para cálcio ativados por voltagem têm um papel importante no controle da excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso. Por exemplo, já foi mostrado que a hiperpolarização pós-potencial lenta (“Slow Afterpotential Hyperpolarization”), uma hiperpolarização que se desenvolve depois de aproximadamente 1 minuto após a deflagração dos potenciais de ação, é um fenômeno dependente da entrada de cálcio pelos canais para cálcio ativados por voltagem, mais especificamente os canais do tipo N (Córdoba) e esse fenômeno modula de forma decisiva a excitabilidade já que leva a uma

hiperpolarização. Além disso, esses neurônios têm uma alta densidade de canais para potássio operados por voltagem e por cálcio. Essa corrente de potássio tem uma grande participação no controle da excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso (Hay 1994 Faber, 2003) e a sua ativação depende também da quantidade de cálcio presente no citoplasma celular. Essas evidências mostram que modificações na corrente de cálcio ativada por voltagem podem ter conseqüências eletrofisiológicas, dentre elas o aumento da freqüência de disparos de potenciais de ação. Nós investigamos a ação da angiotensina II nas correntes de cálcio ativadas por alta voltagem nos neurônios do gânglio nodoso e verificamos que o peptídeo tinha a capacidade de inibir a corrente de cálcio nesses neurônios.

Já havia sido mostrado que angiotensina II modulava a corrente de cálcio em neurônios do gânglio nodoso (Bacal *et al*;1994). Nesse trabalho foram usados neurônios nodosos provenientes de animais neonatos e que, dependendo da ninhada, apresentavam um aumento ou uma diminuição da corrente de cálcio. Nós utilizamos neurônios nodosos provenientes de animais adultos e em todos os nossos experimentos nunca se observou aumento da corrente de cálcio e sim uma diminuição em conseqüência da aplicação da angiotensina II. Essa discrepância pode ser devido à idade dos animais usados nos dois estudos. Outra diferença marcante foi o receptor utilizado para mediar os efeitos. Bacal e Kunze (1994) mostraram que a modulação da corrente de cálcio era via receptor AT1 e nós observamos que esse receptor não estava envolvido na inibição da corrente de cálcio dos neurônios nodosos de ratos adultos (Dzau, 1993a;Moreira *et al.*, 2005;Saavedra, 1992a).

No estudo entre a relação densidade de corrente vs voltagem foi observada que a angiotensina II estava inibindo a corrente de cálcio em potenciais acima de  $-20$  mV. Porém em potenciais menores que  $-20$  mV a corrente de cálcio aumentava em resposta à perfusão de angiotensina II. Essa observação foi confirmada com a construção do gráfico para a ativação da condutância (Figura 14D). A inclinação da curva não muda com a aplicação de angiotensina II, mas o potencial em que a metades dos canais estão ativados muda de 6 mV na direção hiperpolarizante. A corrente de cálcio do tipo T era inativada por um pré-pulso para  $-40$  mV por 100 ms e o nosso estudo foi feito exclusivamente nas correntes de cálcio ativadas em altos potenciais. As correntes de cálcio mais abundantes em neurônios do gânglio nodoso são L e N, porém os canais do tipo P/Q também estão presentes (Córdoba-Rodrigues *et al.*, 1999). Nós sugerimos que essa mudança na ativação causada pela angiotensina II é devido a um bloqueio seletivo de um tipo de canal para cálcio operado por voltagem, muito provavelmente o canal do tipo N, visto que a sua ativação está em torno de  $-20$  mV e a ativação dos canais do tipo L é na vizinhança de  $-30$  mV, deixando a corrente total livre do componente com a ativação mais positiva, levando a uma mudança no  $V_{1/2}$ . Se angiotensina II não estivesse bloqueando seletivamente os canais iônicos para cálcio uma mudança na ativação não seria possível a não ser que essa facilitação da corrente de cálcio em potenciais mais negativos fosse consequência de um fenômeno divorciado da inibição da corrente. Uma possibilidade é que a angiotensina II possa estar levando à produção de espécies reativas do oxigênio. Essa hipótese foi levantada porque em neurônios do NTS angiotensina II leva a um aumento de espécies reativas de oxigênio o que causa uma facilitação na corrente de cálcio carregada pelos canais do tipo P/Q (Wang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1998). Contudo

outros estudos mostraram que a oxidação dos canais para cálcio do tipo L levava a uma redução na corrente (Chiamvimonvat *et al.*, 1995). O estado de oxidação dos canais pode levar a diferentes modificações fisiológicas, dependendo de qual canal está sendo investigado. Essa é uma questão interessante especialmente quando se sabe que os neurônios nodosos são capazes de produzir NO e que NO tem um papel importante na frequência de disparos de potenciais de ação (Cohen *et al.*, 1994). A mudança na ativação das correntes de cálcio pode ser consequência de um único fenômeno ou de dois fenômenos distintos. Se a angiotensina II bloqueia exclusivamente um tipo de canal para cálcio com uma ativação em potenciais mais positivos quando essa corrente é subtraída da corrente total há uma mudança na ativação. A outra possibilidade é que a angiotensina II esteja facilitando a abertura de canais de cálcio em potenciais mais negativos, por uma via de sinalização celular específica como pode ser o caso da produção de NO, e através de uma outra via inibindo essa corrente em potenciais mais positivos. Com o intuito de esclarecer o primeiro ponto (inibição exclusiva de um tipo de canal), usamos ferramentas farmacológicas para bloquear um tipo de corrente de cálcio e testar a angiotensina II na corrente total restante. Nós usamos o potencial de ação do neurônio nodoso como o comando de voltagem e a corrente de cálcio foi isolada. Na presença de nifedipina (10  $\mu$ M), um bloqueador específico de canais para cálcio do tipo L, angiotensina II foi capaz de bloquear 30 % da corrente restante. Angiotensina II bloqueia cerca de 50% dos canais de cálcio ativados por alta voltagem, desses 50%, 30% pode ser atribuído ao bloqueio dos canais do tipo L e os restantes 20% pode ser do tipo N (mais provável por ser um dos canais de cálcio mais abundantes nessas células) ou P/Q. Podemos concluir que a angiotensina II não é um bloqueador para um canal específico, portanto o mecanismo

responsável pela mudança na ativação da corrente de cálcio causada pela angiotensina II ainda não foi desvendado.

Para sabermos qual o receptor de angiotensina II responsável pela inibição da corrente de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso utilizamos antagonistas desses receptores. O primeiro a ser utilizado foi um antagonista não específico que bloqueia tanto receptores do tipo AT1 quanto AT2, que é conhecido como saralasin (500 nM). Na presença de saralasin observamos um fenômeno interessante quando aplicamos angiotensina II: a corrente de cálcio foi rapidamente bloqueada (10 segundos após a aplicação da angiotensina II), porém esse bloqueio decaía para níveis iguais ao controle depois de 100 segundos. Quando angiotensina II atinge a preparação os seus receptores estão bloqueados pela saralasin, portanto o peptídeo pode ser metabolizado em outra substância ativa do sistema renina-angiotensina como, por exemplo, angiotensina-(1-7) que poderia agir em seu próprio receptor. Outra possibilidade é que a própria angiotensina II esteja agindo em um outro receptor quando o AT1 e o AT2 não estão disponíveis. Investigamos a possibilidade da angiotensina-(1-7) ter efeito nos neurônios do gânglio nodoso já que angiotensina-(1-7) pode ser formada através da metabolização da angiotensina II pela ECA-2. Nós verificamos que a angiotensina-(1-7) tinha efeito na corrente de cálcio dos neurônios nodosos, contudo para obtermos inibição da corrente de cálcio pela angiotensina-(1-7) tivemos que usar uma concentração muito alta (10  $\mu$ M) do peptídeo, portanto seria difícil atingir essa concentração partindo de 100 nM de angiotensina II (dados não mostrados). Como essa inibição na presença de saralasin desaparece em 100 s, o receptor deve sofrer uma dessensibilização no mesmo espaço de tempo.

Quando usamos o antagonista de receptores de AT1, losartan (500 nM) o efeito da angiotensina II nas correntes de cálcio não foi abolido e a corrente de cálcio foi inibida de 48%. Esses resultados indicam que o receptor AT1 não está envolvido no efeito inibitório induzido pela angiotensina II em neurônios do gânglio nodoso. Provavelmente o receptor envolvido na inibição da corrente de cálcio é o AT2, porém não foi possível fazermos uma confirmação direta porque o antagonista desse receptor, o PD 123,319, inibiu a corrente de cálcio.

Como nos tínhamos evidências fisiológicas e farmacológicas da presença dos receptores de angiotensina II nos neurônios nodosos quando em cultura, nós decidimos investigar a presença do transcrito desses receptores no gânglio utilizando a técnica de RT-PCR. Ambos os transcritos, de AT1 e de AT2, foram encontrados no gânglio nodoso, possibilitando a presença desses receptores nos neurônios do gânglio nodoso. A angiotensina II leva a um aumento da pressão arterial, pode ser que quando a concentração desse peptídeo estiver aumentada na circulação, possa atingir os neurônios do gânglio nodoso e deflagrar um aumento da frequência de disparos de potenciais de ação. Essa mudança na excitabilidade seria a forma pela qual os neurônios nodosos comuniquem ao NTS a mudança na periferia. Uma outra possibilidade plausível para a presença dos transcritos no corpo celular dos neurônios nodosos é uma função fisiológica desses receptores nos terminais pré-sinápticos localizados no NTS. Quando uma dupla ligação foi feita no vago na parte distal em relação ao corpo celular, se verificou que o sinal dos receptores para angiotensina II era abolido do NTS, indicando que os receptores presentes no NTS são sintetizados no corpo celular dos neurônios do gânglio nodoso e se encontram nos seus terminais pré-sinápticos. Portanto o fato de encontrarmos ARN

mensageiro para os receptores no gânglio nodoso e de observarmos respostas fisiológicas à angiotensina II quando essas células se encontram em cultura não necessariamente implica na presença desses receptores no gânglio nodoso no animal vivo. Um indicador forte para um papel fisiológico dos receptores de angiotensina II nos neurônios do gânglio nodoso é que, quando esse peptídeo é testado em animais anestesiados houve um aumento no número de potenciais de ação (Thompson *et al.*, 2000a).

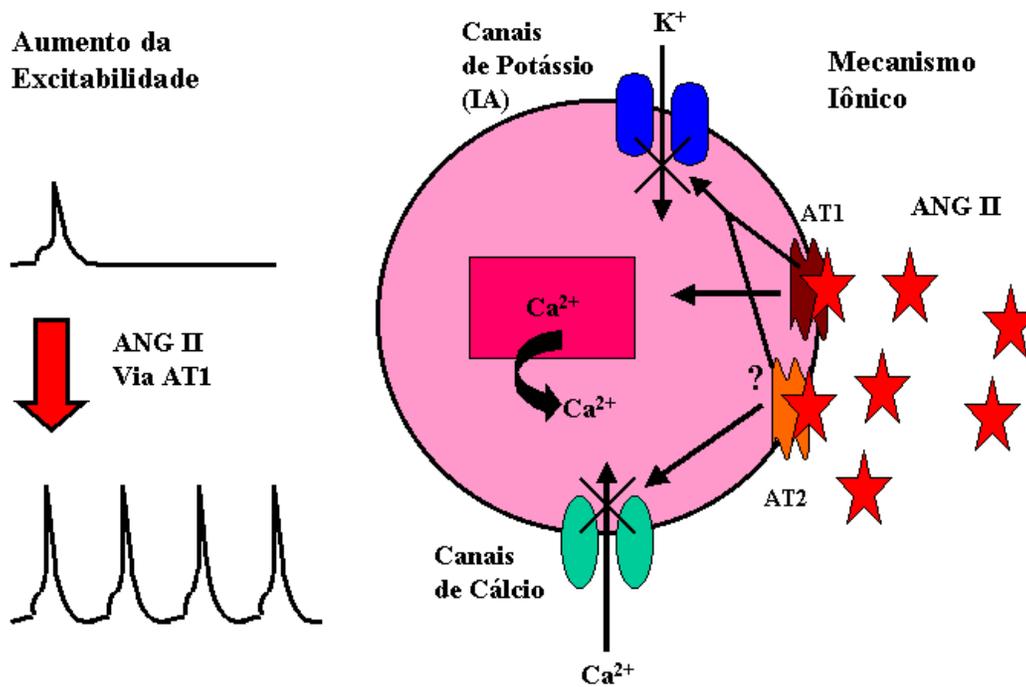
Apesar da angiotensina II estimular múltiplas vias de transdução de sinal dependendo do tipo celular, predominantemente a via da fosfolipase C  $\beta$  é recrutada levando à liberação de cálcio do retículo citoplasmático via formação de IP3. Quando estudamos a possibilidade do aumento de cálcio nos neurônios do gânglio nodoso através de técnicas microfluorimétricas, nós observamos que nessas células a angiotensina II pela ativação dos receptores AT1 causa um aumento na concentração de cálcio citossólico (Figuras 19 e 20). O transiente de cálcio deflagrado pela angiotensina II é dependente do cálcio extracelular (Figura 21). Quando o aumento de cálcio se dá exclusivamente pela ativação de uma via de sinalização que ativa os receptores do retículo endoplasmático, a concentração extracelular não modifica essa transiente. Como nos neurônios do gânglio nodoso o desenvolvimento do transiente de cálcio depende do cálcio extracelular não podemos afirmar que esse efeito é uma consequência direta da ativação de uma via de sinalização, como a da fosfolipase C. Como já discutido anteriormente, nós observamos nos experimentos onde a corrente de cálcio foi isolada que a angiotensina II desloca a ativação da corrente de cálcio para potenciais mais próximos do potencial de repouso. O que pode estar acontecendo, é que, na presença da angiotensina II os canais para cálcio dos neurônios do gânglio nodoso estão conduzindo próximo ao potencial de repouso.

Esse possível influxo de cálcio é um passo necessário para o desenvolvimento do transiente de cálcio. Um experimento para provar essa hipótese é usar um bloqueador de canais para cálcio inespecífico na presença de concentração normal de cálcio no meio extracelular, tal como cobalto ou cádmio, e aplicar a angiotensina II. Caso o influxo de cálcio pelos canais operados por voltagem seja essencial, o transiente seria abolido na presença dos bloqueadores desses canais. O único problema com esse modelo é que o transiente de cálcio ativado pela angiotensina II depende da ativação do receptor AT1 e a modulação das correntes de cálcio não depende da ativação dos receptores AT1.

O aumento da excitabilidade depende da ativação dos receptores AT1, portanto é difícil estabelecer uma relação entre o aumento da excitabilidade e a inibição das correntes de cálcio, já que essa inibição é independente do receptor AT1.

Os receptores para a angiotensina II já foram identificados nos neurônios do gânglio nodoso em suas terminações pré-sinápticas, localizadas no núcleo do trato solitário. Apesar desse conjunto de evidências, a presença dos transcritos dos receptores AT1 e AT2 nos neurônios do gânglio nodoso ainda não havia sido investigada.

### Efeito da ANG II (100 nM) nos Neurônios Nodosos



**Figura 25-** Sumário das ações da ANG II nos neurônios do gânglio nodoso.

Nós também investigamos a ação da angiotensina II em animais que desenvolveram hipertensão. O sistema renina-angiotensina tem um papel vital na manutenção da pressão arterial, tanto a curto quanto a longo prazo (ver Introdução), portanto nós tivemos a curiosidade de investigar se, nos neurônios do gânglio nodoso de animais hipertensos a angiotensina II era capaz de deflagrar os mesmos fenômenos que em animais normotensos. A angiotensina II não foi capaz de aumentar a excitabilidade dos neurônios do gânglio nodoso dos animais *SHR*, apesar de ser capaz de aumentar a excitabilidade dos neurônios provenientes dos animais *WKY* que são pertencentes ao

mesmo “pool” genético porém sem apresentarem hipertensão. Quando os experimentos para a investigação dos transientes de cálcio deflagrados pela angiotensina II foram feitos com os animais SHR foi visto que os animais hipertensos não foram capazes de responder à aplicação de angiotensina II, ou seja, não detectamos nenhuma variação significativa nos níveis de cálcio citossólico. Os animais WKY responderam de maneira similar aos ratos Wistar. O que pode estar acontecendo é que em animais hipertensos há um nível alto de angiotensina II circulante e uma “adaptação” dos neurônios, como por exemplo uma internalização dos receptores do tipo AT1, o que impossibilitaria a transdução da resposta à angiotensina II. Vai ser necessário a realização de outros experimentos para investigarmos o mecanismo pelo(s) qual(is) a resposta a angiotensina II é abolida em animais SHR.

## **6- PERSPECTIVAS FUTURAS**

Um trabalho de doutorado não é o fim de uma etapa e sim a abertura de possibilidades. A interação entre angiotensina II e neurônios do gânglio nodoso me proporcionou inúmeras surpresas, algumas delas desagradáveis, como foi o caso do efeito agonista do bloqueador de AT2, tanto nos estudos de “current clamp” quando na inibição das correntes de cálcio. Porém as surpresas prazerosas em muito sobre passam os infortúnios. Eu posso citar o estudo do efeito, ou melhor, falta de efeito, da angiotensina II nos animais SHR, outro exemplo é a dependência do cálcio extracelular no desenvolvimento do transiente de cálcio gerado pelo peptídeo.

È inquestionável o meu interesse em continuar trabalhando com o sistema nervoso periférico e sua modulação pelos peptídeos do sistema renina angiotensina. O sistema nervoso periférico muitas vezes está colocado em uma posição desprestigiada quando comparado com o sistema nervoso central. É importante lembrar que olhar, ouvir, sentir o quente e o frio, apreciar um bom vinho depende dos neurônios do sistema nervoso periférico logo a sua importância deve ser revista. Angiotensina II altera a fisiologia de um tipo especial de neurônios periféricos, os neurônios aferentes viscerais. As duas importantes perguntas que surgem com essa descoberta são: **“COMO?”** e **“POR QUÊ?”**. Eu decidi durante o meu doutoramento tentar responder COMO e para tal focalizei nas bases iônicas dessas mudanças. Usar técnicas eletrofisiológicas me proporcionou a chance de em primeiro lugar monitorar, em tempo real, mudanças nos potenciais de ação das células, em segundo lugar isolar e investigar separadamente algumas correntes iônicas que participam da geração dos potenciais de ação e o mais importante satisfação instantânea com um experimento produtivo.

O caminho natural para as pessoas que optaram pela carreira científica é um bom treinamento de pós-doutorado, portanto eu espero que esse seja o meu caminho. Se eu tiver a oportunidade de escolher um projeto a ser desenvolvido durante essa fase da minha carreira sem dúvida alguma eu optaria pela investigação aprofundada dos efeitos da angiotensina II em animais hipertensos por achar que entender a falta de ação desses peptídeos nos animais hipertensos é importante e que pode nos levar a um melhor entendimento da patofisiologia de uma doença importante, a hipertensão.

## BIBLIOGRAFIA

- Bacal, K. & Kunze, D. L. (1994). Dual effects of angiotensin II on calcium currents in neonatal rat nodose neurons. *J.Neurosci.* **14**, 7159-7167.
- Baker, K. M., Booz, G. W., & Dostal, D. E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu.Rev.Physiol* **54**, 227-241.
- Baltatu, O., Campos, L. A., & Bader, M. (2004). Genetic targeting of the brain renin-angiotensin system in transgenic rats: impact on stress-induced renin release. *Acta Physiol Scand.* **181**, 579-584.
- Beierwaltes, W. H. (1997). Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Am.J.Physiol* **272**, R1359-R1364.
- Beldent, V., Michaud, A., Bonnefoy, C., Chauvet, M. T., & Corvol, P. (1995). Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. Effect of the amino-terminal domain in the solubilization process. *J.Biol.Chem.* **270**, 28962-28969.
- Ben Ari, E. T. & Garrison, J. C. (1988). Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am.J.Physiol* **255**, E70-E79.
- Bielefeldt, K. (2000). Differential effects of capsaicin on rat visceral sensory neurons. *Neuroscience* **101**, 727-736.
- Bielefeldt, K., Ozaki, N., Whiteis, C., & Gebhart, G. F. (2002). Amitriptyline inhibits voltage-sensitive sodium currents in rat gastric sensory neurons. *Dig.Dis.Sci.* **47**, 959-966.
- Bielefeldt, K., Whiteis, C. A., Chapleau, M. W., & Abboud, F. M. (1999). Nitric oxide enhances slow inactivation of voltage-dependent sodium currents in rat nodose neurons. *Neurosci.Lett.* **271**, 159-162.
- Boehm, M. & Nabel, E. G. (2002). Angiotensin-converting enzyme 2--a new cardiac regulator. *N.Engl.J.Med.* **347**, 1795-1797.

Brown, A. J., Casals-Stenzel, J., Gofford, S., Lever, A. F., & Morton, J. J. (1981). Comparison of fast and slow pressor effects of angiotensin II in the conscious rat. *Am.J.Physiol* **241**, H381-H388.

Burson, J. M., Aguilera, G., Gross, K. W., & Sigmund, C. D. (1994). Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am.J.Physiol* **267**, E260-E267.

Campos, F. V., Moreira, T. H., Beirao, P. S., & Cruz, J. S. (2004). Veratridine modifies the TTX-resistant Na<sup>+</sup> channels in rat vagal afferent neurons. *Toxicol* **43**, 401-406.

Carey, R. M., McGrath, H. E., Pentz, E. S., Gomez, R. A., & Barrett, P. Q. (1997). Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J.Clin.Invest* **100**, 1566-1574.

Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., & Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol.Rev.* **55**, 579-581.

Chaki, S. & Inagami, T. (1992). A newly found angiotensin II receptor subtype mediates cyclic GMP formation in differentiated Neuro-2A cells. *Eur.J.Pharmacol.* **225**, 355-356.

Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Kamp, T. J., Kallen, R. G., Hofmann, F., Flockerzi, V., & Marban, E. (1995). Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. *Circ.Res.* **76**, 325-334.

Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., Johnson, A. L., & . (1989). Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **165**, 196-203.

Cohen, A. S., Weinreich, D., & Kao, J. P. (1994). Nitric oxide regulates spike frequency accommodation in nodose neurons of the rabbit. *Neurosci.Lett.* **173**, 17-20.

Cordoba-Rodriguez, R., Moore, K. A., Kao, J. P., & Weinreich, D. (1999). Calcium regulation of a slow post-spike hyperpolarization in vagal afferent neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 7650-7657.

Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-dos-Santos, A. J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y., & Penninger, J. M. (2002). Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* **417**, 822-828.

Danilczyk, U., Eriksson, U., Crackower, M. A., & Penninger, J. M. (2003). A story of two ACEs. *J.Mol.Med.* **81**, 227-234.

Danser, A. H. (2003). Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **35**, 759-768.

Danser, A. H., van Kats, J. P., Admiraal, P. J., Derkx, F. H., Lamers, J. M., Verdouw, P. D., Saxena, P. R., & Schalekamp, M. A. (1994). Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* **24**, 37-48.

Data, J. L., Gerber, J. G., Crump, W. J., Frolich, J. C., Hollifield, J. W., & Nies, A. S. (1978). The prostaglandin system. A role in canine baroreceptor control of renin release. *Circ.Res.* **42**, 454-458.

de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol.Rev.* **52**, 415-472.

de Lannoy, L. M., Danser, A. H., van Kats, J. P., Schoemaker, R. G., Saxena, P. R., & Schalekamp, M. A. (1997). Renin-angiotensin system components in the interstitial fluid of the isolated perfused rat heart. Local production of angiotensin I. *Hypertension* **29**, 1240-1251.

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., & Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ.Res.* **87**, E1-E9.

Donoghue, S., Garcia, M., Jordan, D., & Spyer, K. M. (1982a). Identification and brain-stem projections of aortic baroreceptor afferent neurones in nodose ganglia of cats and rabbits. *J.Physiol* **322**, 337-352.

Donoghue, S., Garcia, M., Jordan, D., & Spyer, K. M. (1982b). The brain-stem projections of pulmonary stretch afferent neurones in cats and rabbits. *J.Physiol* **322**, 353-363.

Dudley, D. T., Hubbell, S. E., & Summerfelt, R. M. (1991). Characterization of angiotensin II (AT<sub>2</sub>) binding sites in R3T3 cells. *Mol.Pharmacol.* **40**, 360-367.

Dzau, V. J. (1993). Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. *Basic Res.Cardiol.* **88 Suppl 1**, 1-14.

Faber, E. S. & Sah, P. (2003). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel inactivation contributes to spike broadening during repetitive firing in the rat lateral amygdala. *J.Physiol* **552**, 483-497.

Ferguson, A. V. & Li, Z. (1996). Whole cell patch recordings from forebrain slices demonstrate angiotensin II inhibits potassium currents in subfornical organ neurons. *Regul.Pept.* **66**, 55-58.

Fruhbeck, G. (2004). The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr.Med.Chem.Cardiovasc.Hematol.Agents* **2**, 197-208.

Gallinat, S., Busche, S., Raizada, M. K., & Sumners, C. (2000). The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **278**, E357-E374.

Gerber, J. G., Anderson, R. J., Schrier, R. W., & Nies, A. S. (1982). Prostaglandins and the regulation of renal circulation and function. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res.* **10**, 227-254.

Greenberg, S. G., Lorenz, J. N., He, X. R., Schnermann, J. B., & Briggs, J. P. (1993). Effect of prostaglandin synthesis inhibition on macula densa-stimulated renin secretion. *Am.J.Physiol* **265**, F578-F583.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.

Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N., & Breyer, M. D. (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J.Clin.Invest* **94**, 2504-2510.

Hay, M. (1998). Cyclosporine A modulation of Ca<sup>++</sup> activated K<sup>+</sup> channels in cardiac sensory afferent neurons. *Brain Res.* **786**, 243-247.

Hay, M. & Lindsley, K. A. (1995). Metabotropic glutamate receptor inhibition of visceral afferent potassium currents. *Brain Res.* **698**, 169-174.

Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J., & Kobilka, B. K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* **377**, 744-747.

Ichiki, T., Herold, C. L., Kambayashi, Y., Bardhan, S., & Inagami, T. (1994). Cloning of the cDNA and the genomic DNA of the mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochim.Biophys.Acta* **1189**, 247-250.

Ikeda, S. R. & Schofield, G. G. (1987). Tetrodotoxin-resistant sodium current of rat nodose neurones: monovalent cation selectivity and divalent cation block. *J.Physiol* **389**, 255-270.

Itoh, S. & Carretero, O. A. (1985). Role of the macula densa in renin release. *Hypertension* **7**, 149-154.

Jafri, M. S., Moore, K. A., Taylor, G. E., & Weinreich, D. (1997). Histamine H1 receptor activation blocks two classes of potassium current, IK(rest) and IAHP, to excite ferret vagal afferents. *J.Physiol* **503 ( Pt 3)**, 533-546.

Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y. V., Lifton, R. P., Williams, C. S., Charru, A., Hunt, S. C., Hopkins, P. N., Williams, R. R., Lalouel, J. M., & . (1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* **71**, 169-180.

Kageyama, R., Ohkubo, H., & Nakanishi, S. (1984). Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* **23**, 3603-3609.

Kakar, S. S., Musgrove, L. C., Devor, D. C., Sellers, J. C., & Neill, J. D. (1992). Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **189**, 289-295.

Kerr, N. C., Holmes, F. E., & Wynick, D. (2004). Novel isoforms of the sodium channels Nav1.8 and Nav1.5 are produced by a conserved mechanism in mouse and rat. *J.Biol.Chem.* **279**, 24826-24833.

Kim, H. S., Krege, J. H., Kluckman, K. D., Hagaman, J. R., Hodgin, J. B., Best, C. F., Jennette, J. C., Coffman, T. M., Maeda, N., & Smithies, O. (1995). Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 2735-2739.

Koike, G., Horiuchi, M., Yamada, T., Szpirer, C., Jacob, H. J., & Dzau, V. J. (1994). Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **203**, 1842-1850.

Kunz, R., Kreutz, R., Beige, J., Distler, A., & Sharma, A. M. (1997). Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* **30**, 1331-1337.

Lancaster, E., Oh, E. J., & Weinreich, D. (2001). Vagotomy decreases excitability in primary vagal afferent somata. *J.Neurophysiol.* **85**, 247-253.

Lancaster, E. & Weinreich, D. (2001). Sodium currents in vagotomized primary afferent neurones of the rat. *J.Physiol* **536**, 445-458.

Langford, K., Frenzel, K., Martin, B. M., & Bernstein, K. E. (1992). The Genomic Organization of the Rat At1 Angiotensin Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **183**, 1025-1032.

Laursen, J. B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B. A., & Harrison, D. G. (1997). Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* **95**, 588-593.

Lavoie, J. L., Cassell, M. D., Gross, K. W., & Sigmund, C. D. (2004). Adjacent expression of renin and angiotensinogen in the rostral ventrolateral medulla using a dual-reporter transgenic model. *Hypertension* **43**, 1116-1119.

- Leal-Cardoso, H., Koschorke, G. M., Taylor, G., & Weinreich, D. (1993). Electrophysiological properties and chemosensitivity of acutely isolated nodose ganglion neurons of the rabbit. *J.Auton.Nerv.Syst.* **45**, 29-39.
- Li, A., Segui, J., Heinemann, S. H., & Hoshi, T. (1998). Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Neurosci.* **18**, 6740-6747.
- Li, Y. W. & Guyenet, P. G. (1996). Angiotensin II decreases a resting K<sup>+</sup> conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. *Circ.Res.* **78**, 274-282.
- Li, Z. & Ferguson, A. V. (1996). Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience* **71**, 133-145.
- Linaz, S. L. (1984). Role of prostaglandins in renin secretion in the isolated kidney. *Am.J.Physiol* **246**, F811-F818.
- Lind, R. W., Swanson, L. W., Bruhn, T. O., & Ganten, D. (1985). The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the rat. *Brain Res.* **338**, 81-89.
- Macrez, N., Morel, J. L., Kalkbrenner, F., Viard, P., Schultz, G., & Mironneau, J. (1997a). A beta gamma dimer derived from G(13) transduces the angiotensin AT(1) receptor signal to stimulation of Ca<sup>2+</sup> channels in rat portal vein myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 23180-23185.
- Marrero, M. B., Paxton, W. G., Schieffer, B., Ling, B. N., & Bernstein, K. E. (1996). Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* **8**, 21-26.
- Masaki, H., Kurihara, T., Yamaki, A., Inomata, N., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kizima, K., Maruyama, K., Horiuchi, M., Dzau, V. J., Takahashi, H., Iwasaka, T., Inada, M., & Matsubara, H. (1998). Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor causes attenuated response to AT<sub>1</sub> receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J.Clin.Invest* **101**, 527-535.
- McFarlane, S. & Cooper, E. (1991). Kinetics and voltage dependence of A-type currents on neonatal rat sensory neurons. *J.Neurophysiol.* **66**, 1380-1391.

Mei, N. (1970a). [Anatomical arrangement and electrophysiological properties of sensitive vagal neurons in the cat]. *Exp.Brain Res.* **11**, 465-479.

Mei, N. (1970b). [Cardiovascular and respiratory vagal mechanoreceptors in the cat]. *Exp.Brain Res.* **11**, 480-501.

Mei, N. (1970c). [Gastrointestinal vagal mechanoreceptors in the cat]. *Exp.Brain Res.* **11**, 502-514.

Mendelsohn, F. A., Quirion, R., Saavedra, J. M., Aguilera, G., & Catt, K. J. (1984). Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 1575-1579.

Moreira, T. H., Rodrigues, A. L., Beirao, P. S., Dos Santos, R. A., & Santos, C. J. (2005). Angiotensin II inhibition of Ca(2+) currents is independent of ATR1 angiotensin II receptor activation in rat adult vagal afferent neurons. *Auton.Neurosci.* **117**, 79-86.

Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E., & Dzau, V. J. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J.Biol.Chem.* **268**, 24539-24542.

Murasawa, S., Matsubara, H., Urakami, M., & Inada, M. (1993). Regulatory elements that mediate expression of the gene for the angiotensin II type 1a receptor for the rat. *J.Biol.Chem.* **268**, 26996-27003.

Navar, L. G. & Nishiyama, A. (2004). Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **13**, 107-115.

Noda, K., Feng, Y. H., Liu, X. P., Saad, Y., Husain, A., & Karnik, S. S. (1996). The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* **35**, 16435-16442.

Noda, K., Saad, Y., & Karnik, S. S. (1995). Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. *J.Biol.Chem.* **270**, 28511-28514.

- Oh, E. J. & Weinreich, D. (2002). Chemical communication between vagal afferent somata in nodose Ganglia of the rat and the Guinea pig in vitro. *J.Neurophysiol.* **87**, 2801-2807.
- Phillips, M. I., Speakman, E. A., & Kimura, B. (1993). Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul.Pept.* **43**, 1-20.
- Rajagopalan, S., Laursen, J. B., Borthayre, A., Kurz, S., Keiser, J., Haleen, S., Giaid, A., & Harrison, D. G. (1997). Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* **30**, 29-34.
- Saavedra, J. M. (1992). Brain and pituitary angiotensin. *Endocr.Rev.* **13**, 329-380.
- Saavedra, J. M. (1999b). Emerging features of brain angiotensin receptors.
- Schild, J. H., Clark, J. W., Hay, M., Mendelowitz, D., Andresen, M. C., & Kunze, D. L. (1994). A- and C-type rat nodose sensory neurons: model interpretations of dynamic discharge characteristics. *J.Neurophysiol.* **71**, 2338-2358.
- Shapiro, M. S., Wollmuth, L. P., & Hille, B. (1994). Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron* **12**, 1319-1329.
- Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., & Corvol, P. (1988). Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 9386-9390.
- Speth, R. C. & Kim, K. H. (1990). Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine<sup>6</sup> angiotensin II. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **169**, 997-1006.
- Staessen, J. A., Kuznetsova, T., Wang, J. G., Emelianov, D., Vlietinck, R., & Fagard, R. (1999). M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J.Hypertens.* **17**, 9-17.
- Stansfeld, C. E. & Wallis, D. I. (1985). Properties of visceral primary afferent neurons in the nodose ganglion of the rabbit. *J.Neurophysiol.* **54**, 245-260.

Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., & Lynch, K. R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* **242**, 1444-1446.

Sumners, C., Zhu, M., Gelband, C. H., & Posner, P. (1996). Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents: intracellular mechanisms. *Am.J.Physiol* **271**, C154-C163.

Takeuchi, K., Alexander, R. W., Nakamura, Y., Tsujino, T., & Murphy, T. J. (1993). Molecular structure and transcriptional function of the rat vascular AT1a angiotensin receptor gene. *Circ.Res.* **73**, 612-621.

Ter Horst, G. J., de Boer, P., Luiten, P. G., & van Willigen, J. D. (1989). Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* **31**, 785-797.

Thompson, G. W., Horackova, M., & Armour, J. A. (2000). Chemotransduction properties of nodose ganglion cardiac afferent neurons in guinea pigs. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **279**, R433-R439.

Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.* **275**, 33238-33243.

Traynor, T. R., Smart, A., Briggs, J. P., & Schnermann, J. (1999). Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am.J.Physiol* **277**, F706-F710.

Udem, B. J. & Weinreich, D. (1993). Electrophysiological properties and chemosensitivity of guinea pig nodose ganglion neurons in vitro. *J.Auton.Nerv.Syst.* **44**, 17-33.

van Kats, J. P., Duncker, D. J., Haitzma, D. B., Schuijt, M. P., Niebuur, R., Stubenitsky, R., Boomsma, F., Schalekamp, M. A., Verdouw, P. D., & Danser, A. H. (2000). Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II. *Circulation* **102**, 1556-1563.

- Wagenaar, L. J., Voors, A. A., Buikema, H., & van Gilst, W. H. (2002). Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can.J.Cardiol.* **18**, 1331-1339.
- Wang, D., Summers, C., Posner, P., & Gelband, C. H. (1997). A-type K<sup>+</sup> current in neurons cultured from neonatal rat hypothalamus and brain stem: modulation by angiotensin II. *J.Neurophysiol.* **78**, 1021-1029.
- Wang, G., Anrather, J., Huang, J., Speth, R. C., Pickel, V. M., & Iadecola, C. (2004). NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J.Neurosci.* **24**, 5516-5524.
- Weihprecht, H., Lorenz, J. N., Briggs, J. P., & Schnermann, J. (1994). Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am.J.Physiol* **266**, F227-F239.
- Weston, J. A. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv.Morphog.* **8**, 41-114.
- Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B., & de Gasparo, M. (1989). Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **163**, 284-291.
- Wright, J. W., Reichert, J. R., Davis, C. J., & Harding, J. W. (2002). Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **26**, 529-552.
- Zhu, Y. C., Zhu, Y. Z., Lu, N., Wang, M. J., Wang, Y. X., & Yao, T. (2003). Role of angiotensin AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **30**, 911-918.