

ADRIANA ZAPPAROLI

**EXPRESSÃO DO SUPRESSOR DE SINALIZAÇÃO DE
CITOCINA (SOCS-3) EM HIPOTÁLAMO DE
RATO ESPONTANEAMENTE HIPERTENSO:
efeito sobre a excreção renal de sódio
induzida pela Angiotensina II**

CAMPINAS

Unicamp

2008

ADRIANA ZAPPAROLI

**EXPRESSÃO DO SUPRESSOR DE SINALIZAÇÃO DE
CITOCINA (SOCS-3) EM HIPOTÁLAMO DE
RATO ESPONTANEAMENTE HIPERTENSO:
efeito sobre a excreção renal de sódio
induzida pela Angiotensina II**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em
Farmacologia

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO

**CAMPINAS
Unicamp
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

Z18e Zapparoli, Adriana
 Expressão do supressor de sinalização de citocina (SOCS-3) em
 hipotálamo de rato espontaneamente hipertenso: efeito sobre excreção
 renal de sódio induzida pela angiotensina II / Adriana Zapparoli.
 Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: José Antonio Rocha Gontijo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Hipertensão arterial. 2. Sistema Nervoso Central.
3. Angiotensina. 4. Natriurese. 5. Teste de função renal. I. Gontijo,
José Antonio Rocha. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Expression of supressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in
spontaneous hypertensive rat hypothalamus: effect on renal
sodium excretion induced by angiotensin II**

Keywords: • Arterial hypertension
 • Central Nervous System
 • Angiotensin
 • Natriuresis
 • Kidney function Tests

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

Profa. Dra. Maria José Freitas Queiroz Alves

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Data da defesa: 24 - 04 - 2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

Membros:

Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves

Handwritten signatures in blue ink are present next to the names of the examiners. The signatures are: José Antônio Rocha Gontijo, Heitor Moreno Júnior, José Francisco Figueiredo, Márcio Alberto Torsoni, and Maria José Queiroz de Freitas Alves. The signature of Maria José Queiroz de Freitas Alves is written in a cursive style and includes the name "maria José A F Alves".

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/04/2008

*Agradeço
a todos que colaboraram
direta e indiretamente
para realização do trabalho.*

	Pág.
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxxix
1- INTRODUÇÃO	35
1.1- Hipertensão e angiotensina II	37
1.2- Mecanismos celulares de atividade farmacológica e receptores de angiotensina II	37
1.3- Sistema de sinalização da angiotensina II pela via JAK/STAT/SOCS	39
1.4- Ação intra-renal da angiotensina II	41
1.5- Ação da angiotensina II sobre sistema nervoso central	42
1.6- Interação da angiotensina II com os hormônios hipofisários	45
1.7- Ratos espontaneamente hipertensos - SHR - Modelo de hipertensão essencial	45
2- OBJETIVOS	49
3- MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1- Grupos experimentais	55
3.2- Método indireto de medida de pressão arterial caudal	55

3.3- Técnica de estereotaxia.....	56
3.4- Desenho experimental.....	56
3.5- Protocolo para avaliação da resposta dipsogênica.....	57
3.6- Protocolo para avaliação da manipulação renal de sódio e filtração glomerular -Técnica de <i>clearance</i>	57
3.6.1- Dosagens e análises bioquímicas.....	58
3.7- Cálculos e análise estatística - <i>Clearances</i> renais.....	58
3.8- Protocolo para extração de tecidos, imunoprecipitação e <i>immunoblotting</i>	59
3.8.1- Soluções empregadas em experimentos de <i>Western blotting</i> ..	59
3.8.2- Homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais.....	61
3.8.3- Imunoprecipitação e <i>Immunoblotting</i>	62
3.9- Análise Estatística - Biologia Molecular.....	63
4- RESULTADOS.....	65
4.1- Via de sinalização celular - níveis de proteínas citosólicas em ratos WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo.....	67
4.2- Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo.....	71
4.3- Ingestão hídrica pós-estímulo intracerebroventricular com solução de angiotensina II.....	72

4.4- Estudo funcional renal - <i>Clearances</i> de creatinina e lítio pré e pós-estímulo i.c.v com 400pmol de angiotensina II em animais WKy e SHR após o desenvolvimento hipertensivo.....	75
5- DISCUSSÃO.....	79
6- CONCLUSÃO.....	89
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8- ANEXOS.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	- hormônio adenocorticotrópico
ADH	- hormônio antidiurético
ADP	- núcleo pré-óptico anterodorsal
ANF	- fator atrial natriurético
AngII	- angiotensina II
ANOVA	- análise de variância
ANP	- peptídeo atrial natriurético
AT1, AT2	- receptores de angiotensina II do tipo 1 e 2
AVP	- arginina-vasopressina
AV3V	- terceiro ventrículo anteroventral
BSA	- soro de albumina bovino
Ca⁺²	- cálcio
CCr	- clearance de creatinina
CIS	- proteínas SH2 induzidas pelas citocinas
CK	- clearance de potássio
CLi	- clearance de lítio
CNa	- clearance de sódio
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEMIB	- Centro de Bioterismo da Unicamp
CRF	- fator liberador de corticotrofina
CRH	- hormônio de liberação de corticotropina
Cu	- cobre

DDNa	- aporte distal de sódio a partir dos túbulos proximais
DP	- desvio padrão
DTT	- ditioneitol
EDTA	- ácido etileno diamino tetracético
EGF	- fator de crescimento epidérmico
ECA	- enzima conversora de angiotensina I
ERSNA	- atividade nervosa simpática renal eferente
FeNa	- fração de excreção de sódio
FePNa	- fração de excreção proximal de sódio
FePPNa	- fração de excreção pós-proximal de sódio
Gq	- proteína Gq
H2O DEPC	- água desionizada previamente tratada com DEPC - dietil pirocarbonato
H2O2	- peróxido de hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
i.c.v	- intracerebroventricular
i.p	- intraperitoneal
IGF	- fator de crescimento
IL	- interleucina
IP3	- inositol trifosfato
JAK	- proteína janus kinase
JH1-7	- domínio de homologia JAK conservados 1-7
K	- potássio
KDa	- quilo dalton

MgCl₂	- cloreto de magnésio
MPOL	- núcleo lateral pré-óptico medial
MSH	- hormônio melanotrófico
Na	- sódio
Na⁺/K⁺ ATPase	- proteína da membrana celular
Na₃VO₄	- ortovanadato de sódio
NaCl	- cloreto de sódio
NAD	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)
NaF	- fluoreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
NO	- óxido nítrico
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OVL_T	- órgão vascular da lâmina terminal
PAC	- pressão arterial caudal
PBS	- tampão fosfato de sódio
PCL	- enzima da membrana fosfolipase C
PGE₂	- prostaglandina
PNa	- concentração de sódio no plasma
PKC	- proteína quinase
POMC	- pró-opiomelanocortina
PVN	- núcleo paraventricular
RFG	- ritmo de filtração glomerular

SFO	- órgão subfornical
SRAA	- sistema renina-angiotensina-aldosterona
SDS	- duodecil sulfato de sódio
SEM	- erro padrão da média
SHR	- linhagem geneticamente hipertensa Okamoto-Aoki
SOCS	- proteína supressora da sinalização de citocina
SON	- núcleo supra-óptico
SNC	- sistema nervoso central
SNS	- sistema nervoso simpático
STAT	- proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição gênica
Trisma base	- hidroximetil amino metano
U	- concentração urinária
UKV	- excreção urinária de potássio
UNaV	- excreção urinária de sódio
vs	- versos
WKy	- Wistar Kyoto

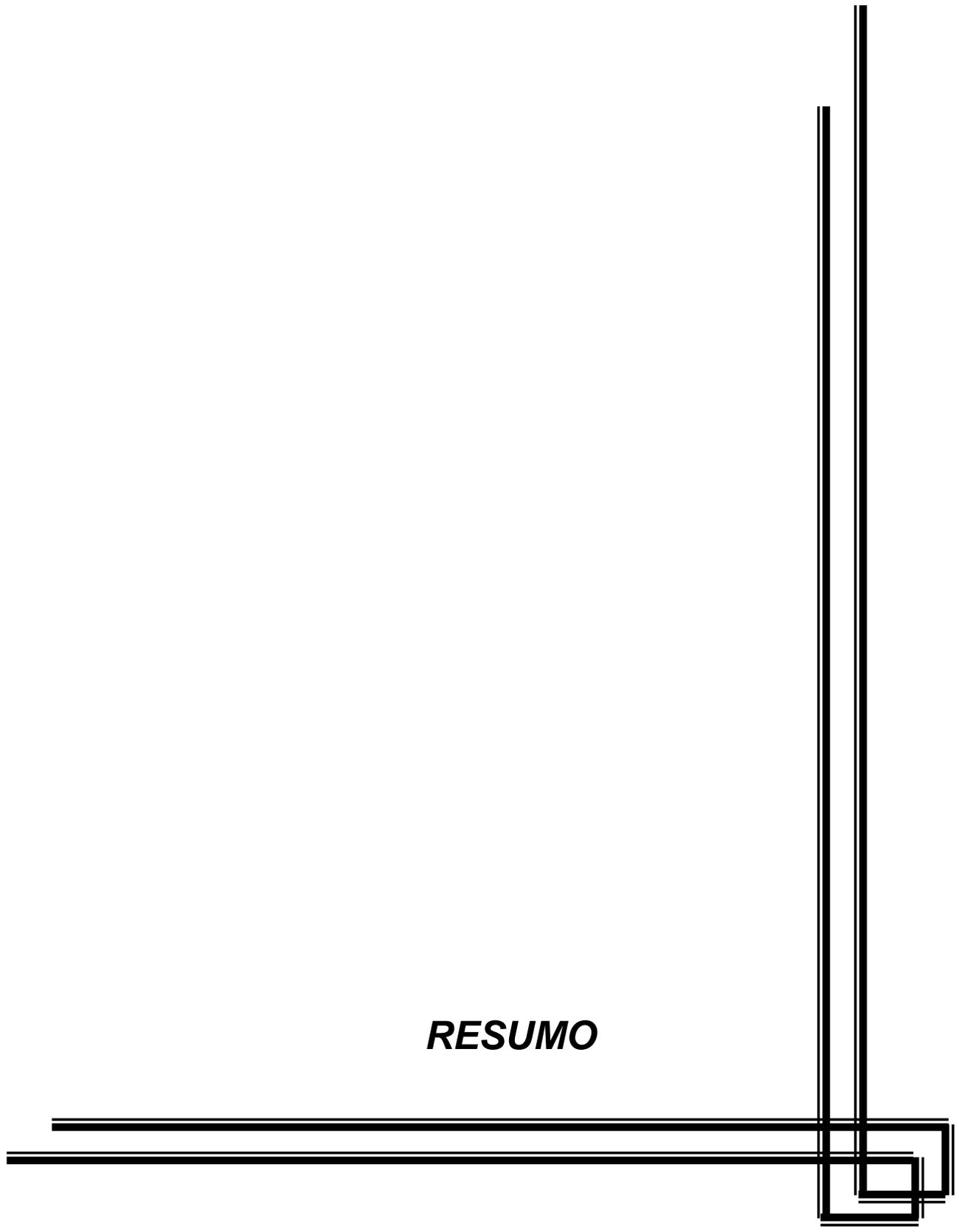
LISTA DE TABELAS - ANEXOS

	Pág.
Tabela A- Expressão protéica de JAK-2.....	111
Tabela B- Expressão protéica de SOCS-3.....	111
Tabela C- Associação protéica entre SOCS-3 e JAK-2.....	111
Tabela D- Medida indireta de pressão arterial em WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo.....	112
Tabela E- Curva dose-resposta ingestão hídrica (ml) pós-estímulo com angiotensina II i.c.v.....	112
Tabela F- 30 minutos de ingestão hídrica (ml/100g p.c.) pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v. em animais WKy e SHR de 12 semanas.....	112
Tabela G- <i>Clearance</i> de creatinina (CCr).....	113
Tabela H- Fração de excreção renal de sódio (FENa).....	113
Tabela I- Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa).....	114
Tabela J- Fração de excreção renal de potássio (FEK).....	114
Tabela K- Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa).....	115

LISTA DE FIGURAS – RESULTADOS

	Pág.
Figura A- Expressão protéica de JAK-2.....	68
Figura B- Expressão protéica de SOCS-3.....	69
Figura C- Associação protéica entre SOCS-3 e JAK-2.....	70
Figura D- Medida indireta de pressão arterial em WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo.....	71
Figura E- Curva dose-resposta ingestão hídrica (ml) pós-estímulo com angiotensina II i.c.v.....	73
Figura F- 30 minutos de ingestão hídrica (ml/100g p.c.) pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v. em animais WKy e SHR de 12 semanas.....	74
Figura G- <i>Clearance</i> de creatinina (CCr).....	76
Figura H- Fração de excreção renal de sódio (FENa).....	77
Figura I- Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa).....	77
Figura J- Fração de excreção renal de potássio (FEK).....	77
Figura K- Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa).....	77

RESUMO



A angiotensina II pode contribuir com o distúrbio do metabolismo renal de sódio presente em ratos espontaneamente hipertensos.

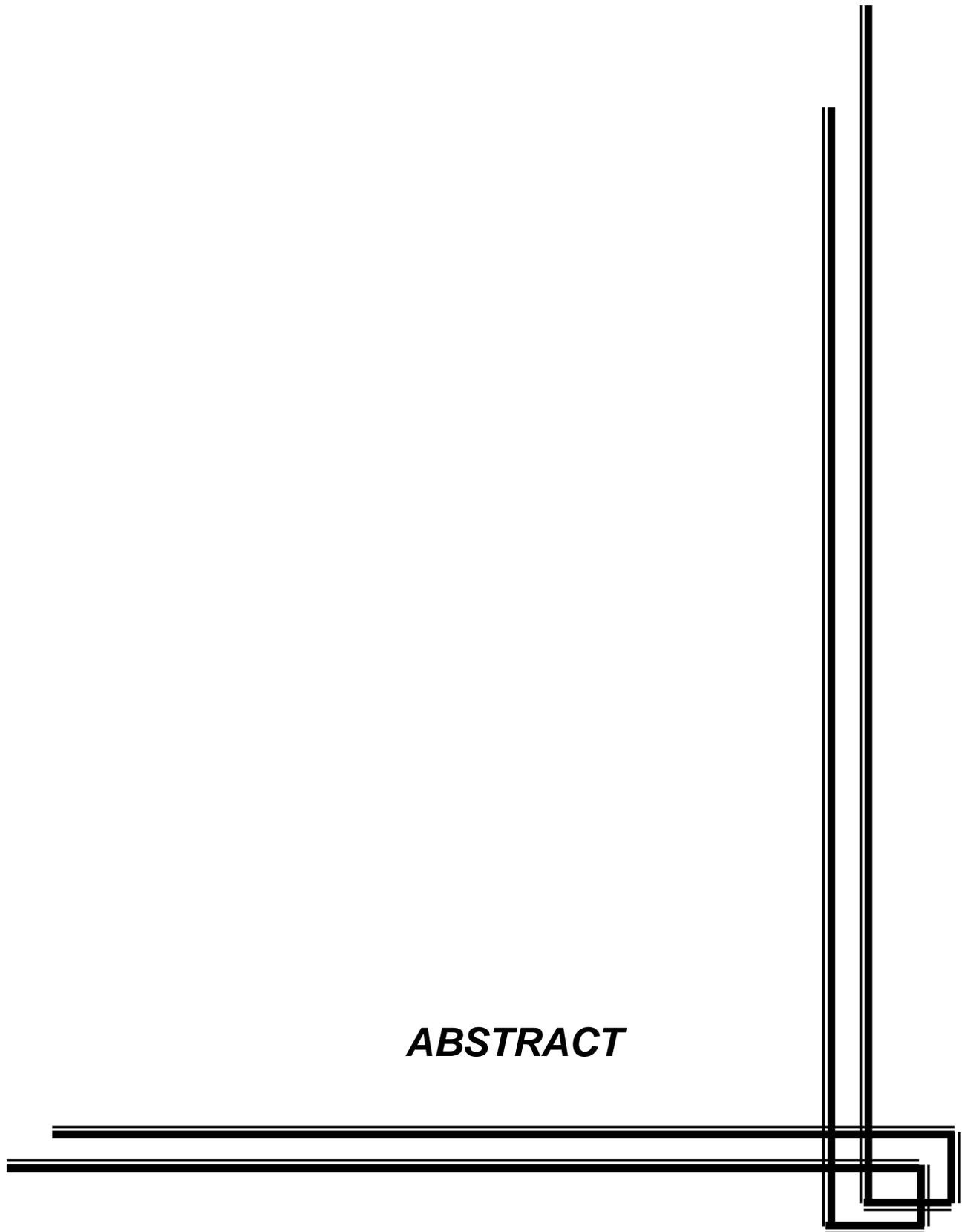
Inicialmente, o estudo atentou à possibilidade de envolvimento da expressão do supressor de sinalização de citocinas (SOCS-3) (técnica de *Western blotting*) em hipotálamo de SHR durante o desenvolvimento hipertensivo (método indireto para medida de pressão arterial). Segundo, pós-estimulação aguda i.c.v com angiotensina II, avaliou a dipsogênese, o ritmo de filtração glomerular (técnica de *clearance* de creatinina), o manuseio tubular renal de sódio (técnica de *clearance* de lítio) e potássio em SHR e WKy.

Os resultados obtidos confirmaram a estimulação central do receptor de angiotensina II e os seus efeitos dipsogênico e natriurético. A administração i.c.v de angiotensina II diminuiu o *clearance* de creatinina e, reciprocamente, aumentou a excreção tubular renal de sódio e de potássio nas duas linhagens, porém acentuadamente em WKy. Por outro lado, se comparada à diferença da expressão de JACK-2/SOCS-3 idade-dependente, a alteração da resposta funcional renal pós-estímulo intracerebroventricular com angiotensina II sugere uma disfunção das vias neurais existentes em animais SHR.

As evidências supracitadas acrescentam à idéia existente na literatura que, a angiotensina II atuando no sistema nervoso central é um instrumento para regulação da homeostase do fluido corporal. Possivelmente, a resposta neural inapropriada resulte na inabilidade do manuseio hidrossalino e, conseqüentemente, colabore com o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR.

Palavras-chave: Hipertensão arterial, SNC, angiotensina II; SOCS-3; SHR; função renal; natriurese; clearance de lítio.

ABSTRACT



There is a surprising lack of experimental data on the renal sodium handle mechanisms induced by i.c.v injection of AngII in hypertensive animals. Thus, we hypothesized that a presumable blunted response to centrally injected AngII may contribute to sodium metabolism disturbances observed in SHR. The study was performed after acute i.c.v AngII administration on tubular sodium handling, evaluated by lithium clearance, in conscious, unrestrained rats and their sham-operated appropriate WKy controls. The present series of experiments were also designed to investigate the possible involvement of SOCS-3 expression in AngII-induced control of water ingestion in SHR hypothalamus. Our results confirm earlier reports on the potent natriuretic effects of central AngII receptor stimulation. The i.c.v application of AngII significantly decreased CCr and reciprocally promotes increased absolute and fractional excretion rates of sodium and potassium in both WKy and SHR animals. The magnitude of the renal response to AngII was significantly greater in WKy rats than in SHR. The enhancement of renal function following the centrally applied AngII in WKy rats as compared with SHR associated with age-related difference in JACK-2/SOCS-3 expression suggest that a dysfunction in the angiotensin neural pathways exists in SHR. Our findings lend further support to the idea that AngII in CNS is an instrumental in the regulation of body fluid homeostasis. Speculatively, it seems interesting to suggest that perhaps one of the CNS inappropriate AngII pathway response defects may result in inability of renal tubules to handle the hydrosaline balance, consequently may contributing with development of arterial hypertension in genetically hypertensive rats from Kyoto.

Keywords: Arterial hypertension; central nervous system; angiotensin II; SOCS-3, SHR, kidney function; natriuresis; lithium clearance.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Hipertensão e angiotensina II

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam a existência de quase um bilhão de hipertensos. Aventa-se que com o envelhecimento populacional este número alcance um bilhão e meio de pessoas no ano de 2025 (McLean et al., 2007; Kearney et al., 2005).

De longa data se reconhece a hipertensão arterial como um importante fator de risco e/ou acelerador de progressão da lesão renal em estágios mais avançados. Acredita-se que o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a alteração do manuseio tubular renal de sódio se enredem à patogênese da hipertensão (Ledigham e Cohen, 1963) e ainda que, por suas ações vasoconstritora e antinatriurética, a angiotensina II (Szczepanska-Sadowska, 2006; Osborn et al., 2000) desempenhe um papel importantíssimo em estudos voltados à manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico.

1.2- Mecanismos celulares de atividade farmacológica e receptores de angiotensina II

O sistema renina-angiotensina consiste de a renina produzida pelo rim, de o substrato da renina (angiotensionogênio) produzido pelo fígado, e de a enzima conversora da angiotensina (ECA) localizada nos pulmões. Sabe-se atualmente que muitos tecidos contêm renina, angiotensinogênio e ECA podendo sintetizar a angiotensina II. Por definição, a angiotensina II é um octapeptídeo formado a partir da angiotensina I e pela ação da enzima hidrolítica conversora da angiotensina I (ECA) (Inagami et al., 1999). Consideram-na o “efetor molecular” responsável pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, por meio de sua interação com os receptores de superfície celular, e de efeitos celulares (Allen et al., 2003). O receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT₁) é uma glicoproteína possuidora de sete segmentos transmembranares composta por 359 aminoácidos. O AT₂ apresenta 363 aminoácidos e possui baixa

homologia ao AT₁. Ambos ativam um grupo de proteínas *acopladoras* denominadas “proteínas G” (Zhuang et al., 1994), as quais regulam os sistemas de transdução intracelulares ou modulam diretamente os canais iônicos. A especificidade pela qual o receptor interage com a proteína G define o tipo de resposta celular. O receptor do tipo AT₁ intervém com a proteína da família G_{q/11} ativando o sinal de cálcio e os sistemas mediados pela proteína quinase C. O AT₂ interage com a proteína G_{iα 2,3} (Kang et al., 1994; Zhang e Pratt, 1994). Entre as ações Gq-mediadas pelo receptor AT₁ incluem-se a vasoconstrição, a facilitação adrenérgica e a ativação de tirosina quinase pelas proteínas quinases presentes no citosol. Julga-se alto os níveis de expressão do receptor do tipo AT₂ em tecidos fetais, os quais diminuem após o nascimento (Barber et al., 1999). É dito que a expressão de AT₂ pode ser potencializada sob condição prolongada de estimulação, visto que o receptor sofre a internalização após ligar-se a angiotensina II (Hein et al., 1997). No entanto, a sua função parece associada à antagonização dos efeitos mediados pelo receptor AT₁. Existem relatos experimentais salientando as finalidades opostas entre AT₁ e AT₂ sobre a regulação da pressão sanguínea. No caso, o AT₂ é considerado um receptor de resposta depressora, operante por um mecanismo ainda desconhecido (Scheuer e Perrone, 1993). Algumas conclusões (Lo et al., 1995) salientam que em rins de ratos o AT₂ vincula-se ao efeito de retenção de sódio e de supressão da diurese. Afigura-se também que o AT₂ atenua a resposta pressórica e mitogénica de AT₁ à angiotensina II, mas por mecanismos diferenciados (Lo et al., 1995), sugerindo a representação inicial e primária da angiotensina II de efeito antinatriurético. O receptor de angiotensina II também é ligado ao aumento de síntese e de secreção de aldosterona; à liberação de catecolaminas pela supra-renal; à constrição arteriolar eferente renal; - à resposta tubular proximal renal devido a sua expressão no glomérulo, arteríolas e células intersticiais ao longo da vasa recta; - à diminuição do barorreflexo; - à ativação do sistema nervoso simpático central e periférico (Matsusaka et al., 1996). No sistema nervoso central o receptor de angiotensina do tipo 1 é encontrado em alta densidade em células do órgão subfornical (SFO), núcleo paraventricular

hipotalâmico (PVN), núcleo lateral pré-óptico medial (MPOL), núcleo pré-óptico anterodorsal (ADP) e órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) (Xu e Xinghong, 1999; Bunnemann et al., 1992), estas áreas são relacionadas à sede (Fitzsimons, 1998) como descrito detalhadamente mais adiante. Os neurônios do núcleo supra-óptico (SON) expressam AT₁, porém em menor concentração que SFO, PVN, MPOL, ADP e OVLT. A expressão de AT₂ no sistema nervoso central inclui as áreas do tronco cerebral (locus ceruleus e oliva inferior), núcleos talâmicos, septo lateral e amígdala (núcleo amigdalóide central e núcleo amigdalóide medial) (Song et al., 1992; Tsutsumi e Saavedra, 1991).

1.3- Sistema de sinalização da angiotensina II pela via JAK/STAT/SOCS

Além de ativar a via de sinalização associada à proteína G, a ligação da angiotensina II ao seu receptor AT₁ é capaz de induzir uma cascata de ativação via tirosinas quinases, desde os tipos não receptores [Src, Fyn, Yes, Pyk2, FAK, e Janus kinase 2 (JAK-2)] até os tipos receptores (de EGF e PDGF) (Bernstein et al., 1998; Sadoshima, 1998), que regulam as vias efetoras intracelulares, incluindo a do sinal de transdução e ativador de transcrição (STAT) (Venema et al., 1998). A sinalização por meio da família JAK foi descrita inicialmente para receptores da família de citocinas, incluindo os receptores de interleucinas e interferon, mas estudos subseqüentes mostraram que a cascata JAK/STAT pode ser ativada por receptores associados à proteína G (Marrero et al., 1995). Sendo considerada o foco do estudo atual, a via JAK/STAT é constituída pela família Janus kinase (JAK), composta por quatro membros (JAK-1, JAK-2, JAK-3 e TYK-2), com pesos moleculares que variam entre 120/130 KDa (Ihle, 2001). Define-se a JAK como uma proteína citosólica com atividade tirosina quinase (Bjorbaek et al., 1997). A STAT é uma proteína transdutora-de-sinal-e-ativadora-de-transcrição, predominantemente STAT-1 e STAT-3, que conduz o sinal gerado ao núcleo celular, onde coordenará a transcrição dos genes neurotransmissores responsáveis pelos sinais (Bjorbaek e Kahn, 2004). Com relação aos efeitos promovidos pela

angiotensina II, a proteína JAK se liga ao receptor promovendo o recrutamento de mais um receptor que se encontre nas adjacências. Forma-se então uma estrutura transitoriamente dimérica. Esta modificação conformacional induz a atividade catalítica da “JAK-2-associada” a qual se auto fosforila em resíduos de tirosina, tornando-se ativa e promovendo o recrutamento de moléculas da família STATs (Sayeski et al., 2001). Deste modo, pode-se afirmar que a via de sinalização JAK/STAT se constitui numa via de ligação direta entre o receptor de membrana e o núcleo celular, com a finalidade de ativar a transcrição de genes alvos, ou seja, um conjunto em particular de proteína-quinase JAKs fosforila os resíduos de tirosinas de fatores de transcrição STATs, os quais se dimerizam e vão para o núcleo celular (Inagami et al., 1999).

Dados presentes na literatura sugerem que um dos mecanismos reguladores negativos da via JAK/STAT seria promovido pela indução de uma proteína supressora da sinalização de citocinas denominada pela sigla SOCS. Entre elas está a SOCS-3, que é detentora da promoção de um efeito de retroalimentação negativo sobre a via JAK/STAT, possivelmente caracterizando a forma mais duradoura de inibição de sinalização celular. A angiotensina II está apta a induzir a expressão de proteínas da família SOCS em tecidos de animais *in vivo* e em culturas de células (Emanuelli et al., 2000). Neste caso específico, após induzida, ela se liga ao resíduo do receptor de angiotensina II e diminui a sua capacidade de fosforilar a STAT em tirosina (Emanuelli et al., 2001; Ueki et al., 2004). Além disso, a SOCS-3 é hábil em provocar a degradação proteossômica, através de um mecanismo dependente de ubiquitinação (Rui et al., 2002), com implicações moleculares e funcionais. Portanto, a SOCS-3 representa uma interface distal nos sistemas de sinalização de angiotensina II. Se por um lado isso possa representar uma proteção aos órgãos-alvo contra um estímulo constante, por outro a indução de expressão da SOCS-3 pode impedir uma transmissão eficiente de sinal.

1.4- Ação intra-renal da angiotensina II

A angiotensina II cumpre funções importantes atuando por meio dos rins, supra-renais e dos vasos sanguíneos na tentativa de manter a pressão arterial, a volemia e a natremia em níveis adequados as necessidades orgânicas. A síntese da angiotensina II é iniciada e regulada pela ativação da renina (uma enzima pertencente à superfamília das proteases), como previamente citado. O rim é a principal fonte de renina ativa que é armazenada nos grânulos das células do aparelho justaglomerular renal. O aparelho justaglomerular é formado por células situadas na parede da arteríola aferente próximas ao glomérulo, onde a renina é principalmente sintetizada e armazenada, e pela mácula densa que inclui as células do túbulo contorcido distal em uma região onde esse segmento aproxima-se anatomicamente do glomérulo e das arteríolas aferente e eferente (Patzak et al., 2005). Genericamente, a secreção de renina pelo rim é estimulada quando ocorre a diminuição da volemia, da pressão arterial sistêmica ou do líquido corpóreo total. Sob circunstâncias fisiológicas normais, os mecanismos intra-renais primários que regulam a liberação de renina são: **1-** a carga de cloreto de sódio na mácula densa; **2-** o sensor barorreceptor da arteríola aferente. Ambos os mecanismos funcionam em cada nefro, o qual regula a liberação de renina do seu próprio aparelho justaglomerular. A baixa concentração de cloreto de sódio na mácula densa associada à baixa pressão aferente estimula a liberação de renina. A angiotensina II incita a síntese de a aldosterona, pelas células da zona glomerulosa do córtex adrenal a partir do colesterol, e atua em vários órgãos por meio da circulação. É considerada uma constante de auto-regulação do fluxo plasmático renal, da filtração glomerular renal (RFG) e atuante sobre as células mesangiais (Gouldsbrough et al., 2003).

Dentre outros, a homeostase do sistema renal depende de efeitos que incluem a dipsogênese, a vasoconstrição, a reabsorção renal de água e sódio por ação *direta* (sobre o túbulo proximal), *indireta* (por meio de seu efeito hemodinâmico), ou mesmo pela ação da aldosterona sobre o túbulo distal e coletor (Marrero et al., 1996). Ainda, ressalta-se a participação efetiva do sistema

nervoso simpático renal, e a abundante inervação adrenérgica intrínseca do rim (incluindo as arteríolas aferente e eferente, os túbulos proximal e distal, a alça de Henle ascendente e o aparelho justaglomerular) a qual modula a liberação de renina via receptores beta-adrenérgicos, controla a hemodinâmica renal via receptores alfa-adrenérgicos e a presença de catecolaminas, como dopamina e norepinefrina, pela estimulação direta ou reflexa (Kopp et al., 1983). Acredita-se que a alteração da atividade nervosa simpática renal possa influenciar diretamente a função destas unidades efetoras inervadas. Considerando-se alguns registros prévios em modelos de hipertensão experimental (Phillips, 2005), o aumento da atividade simpática pôde contribuir para a gênese da hipertensão arterial, através dos mecanismos supracitados. Sugere-se a participação efetiva do nervo renal no controle tubular renal de sódio, pois após a denervação observa-se a diminuição da reabsorção tubular proximal de sódio e água, retardando o desenvolvimento ou atenuando a magnitude da hipertensão (DiBona, 1997).

1.5- Ação da angiotensina II sobre sistema nervoso central

A função do sistema nervoso central no controle da pressão arterial e da homeostase hidrossalina têm sido demonstrada (DiBona, 2000a b), porém, os mecanismos subjacentes a estes fenômenos biológicos são pouco entendidos (Strazzullo et al., 2001). Citações destacam o envolvimento de estruturas ventriculares e de sítios cerebrais (aqui mencionados anteriormente pela presença de receptor do tipo AT1) e à ação centralmente mediada pela angiotensina II (Sunn et al., 2003), como acesso à compreensão da dipsogênese (Sayeski et al., 2001). Isto porque, além dos mecanismos de função renal regulando a excreção de água e eletrólitos, encontra-se o mecanismo de sede intimamente relacionado à moderação de o equilíbrio hidrossalino. O mecanismo de estímulo à sede destaca dois pontos de ajustes, sendo o volume total de líquido representado pela *volemia* e a *osmolalidade* dos tecidos figurada pela concentração de sódio dos compartimentos extracelulares do organismo

(Schreihof et al., 2000). Alguns receptores sensoriais detectam as variáveis. Os barorreceptores são sensíveis à variação da pressão sanguínea. Os osmorreceptores detectam as alterações osmóticas (Hagiwara et al., 2005) e são os quimiorreceptores que detectam a presença ou ausência de substâncias, como a angiotensina II (Jackiewicz et al., 2004). Alguns desses receptores supracitados são periféricos e localizados na parede dos vasos sanguíneos em pontos ditos estratégicos, como na circulação renal (May et al., 2000). Todavia, o conjunto de informações sobre a volemia e a osmolalidade que alcançam o hipotálamo acaba por chegar ao eixo hipotálamo-hipofisário por circuitos ainda mal conhecidos.

Os núcleos hipotalâmicos que originam os eixos (paraventricular e supra-óptico) constituem os dois principais integradores do servomecanismo de regulação hidrossalina (Latchford e Ferguson, 2005). Cavalcante-Lima e colaboradores demonstraram num trabalho recentemente publicado (2005) que, o estímulo dipsogênico requer a mediação do órgão subfornical para a resposta ingestiva. Além desta área, o órgão vascular da lâmina terminal possui o papel de mediar algumas ações, por ter suprimentos vasculares que não apresentam a barreira hematoencefálica típica presente em outras regiões cerebrais. Algumas investigações confirmam a existência de subpopulações distintas de neurônios nestas mesmas áreas respondendo a ínfimas concentrações de angiotensina II mediada por receptores AT₁ (Sunn et al., 2003).

Em um trabalho publicado em 1999 DiBona sugeriu que somada a sua ação periférica, a angiotensina II contribui para regulação da pressão arterial e do volume intravascular através de suas ações em diversos sítios cerebrais; que a distribuição de receptores AT₁ e AT₂ encontra-se em áreas do cérebro anterior e do tronco cerebral relacionadas à regulação da atividade nervosa simpática renal; que por meio de projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermediolateral da medula espinhal, ou pela participação de reflexos principais, modula a atividade nervosa simpática renal. Sendo assim, os aumentos agudos da concentração de angiotensina II

circulante podem afetar a atividade nervosa simpática por suas ações sobre o cérebro, gânglio simpático e terminação nervosa simpática (Reid, 1992).

As áreas onde a barreira hematoencefálica típica está ausente são consideradas de pronto acesso para angiotensina II sobre o sistema nervoso central. Por englobar os órgãos circumventriculares é dito que as projeções do órgão subfornical para o núcleo paraventricular, e de ambos para a medula rostral ventrolateral e para coluna intermediolateral, forneçam esta conectividade (Ferguson et al., 2001; Katahira et al., 1994; Moriguchi et al., 1994). A propósito, são dois os mecanismos de ação por meio do qual a angiotensina II pode atuar nos sítios cerebrais aumentando a atividade nervosa simpática periférica: um postula a inibição da regulação barorreflexa arterial da atividade nervosa simpática periférica, pela qual angiotensina II neuronal, originária do núcleo paraventricular e liberada no núcleo tracto solitário, inibe a liberação do neurotransmissor na primeira sinapse da via barorreflexa arterial, através dos receptores pré-sinápticos do tipo AT_1 (Campagnole-Santos et al., 1998; Casto e Phillips, 1986). O segundo postula que a angiotensina II, originária dos neurônios do núcleo paraventricular e liberada no núcleo do tracto solitário, medula rostral ventrolateral ou coluna intermediolateral, é ligada à ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos. A região da medula rostral ventrolateral possui um papel central no controle neural autônomo da circulação, incluindo a regulação barorreflexo arterial da atividade nervosa simpática periférica (Dampney et al., 1996; Dampney, 1994). Microinjeções de angiotensina II administradas na medula rostral ventrolateral podem aumentar os níveis da pressão arterial (Allen et al., 1998) e/ ou da atividade nervosa simpática periférica, facilitando a modulação barorreflexa arterial da atividade nervosa simpática renal. Há de se enfatizar que este tipo de administração i.c.v. remove alguns problemas relacionados à pressão arterial produzidos pela administração intravenosa, mas não distingue exatamente o local de sua atuação, pois se deve acatar a possibilidade da ocorrência da “difusão” através do sistema ventricular pelos sítios cerebrais ausentes da barreira-hematoencefálica típica, como previamente citados (DiBona, 2000a b).

1.6- Interação da angiotensina II com os hormônios hipofisários

A administração intracerebroventricular de angiotensina II estimula uma resposta célere identificada por receptores que seguem mediando às alterações da atividade neuronal, a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores e a modulação de outros neurônios (Fleegal e Summers, 2003). Atuando sobre a neuro-hipófise leva a excitação do sistema nervoso simpático, seguindo-se a liberação da vasopressina (Akine et al., 2003; Antunes-Rodrigues et al., 2004). Por outro lado, sobre a secreção dos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico influencia a excitação da adeno-hipófise subjugando a secreção do hormônio de liberação da corticotrofina (CRH) e a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Latchford e Ferguson, 2005). As catecolaminas como dopamina, noradrenalina, adrenalina e norepinefrina apresentam interações complexas com o sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina e fator atrial natriurético, além de estimularem a produção de prostaglandinas (Schor et al., 1981).

1.7- Ratos espontaneamente hipertensos - SHR - Modelo de hipertensão essencial

Há anos, a temática sobre a pressão arterial é considerada extremamente complexa. Por este despertar, em 1963 Okamoto e Aoki introduziram um novo modelo experimental de hipertensão sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse necessário. Os animais espontaneamente hipertensos (SHR) foram desenvolvidos por uma reprodução genética meticulosa, entre irmãos e irmãs, que uniformemente resultou em animais naturalmente portadores de doença hipertensiva em 100% dos descendentes. Desde então, o SHR é reconhecido como um excelente modelo de hipertensão experimental auxiliando em estudos clínicos de a hipertensão essencial humana. A semelhança entre a hipertensão humana e a observada em SHR inclui: - a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica;

- o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume (Trippodo e Frohlich, 1981; Uнденfreind e Spector, 1972); - a similaridade entre as respostas a tratamentos farmacológicos. Ainda, há o benefício de o animal apresentar um período curto de vida, ser pequeno, possuir um custo relativamente baixo e ser de fácil manutenção em biotério.

Porém, Trippodo e Frohlich em 1981 ressaltaram que, embora o SHR seja um excelente modelo da hipertensão essencial humana, há algumas ressalvas a serem julgadas como: - o reconhecimento da improbabilidade de que ambas as formas de hipertensão espontânea (no rato e no homem) sejam expressões idênticas de uma doença hipertensora determinada geneticamente; - a origem poligênica e as influências por fatores ambientais; - sendo o controle cardiocirculatório multifatorial, certos mecanismos pressóricos não se expressam, necessariamente, em ambas as situações; - o conceito fisiológico de que o desequilíbrio de um mecanismo regulatório envolva a expressão de um outro mecanismo, implicando em alterações secundárias, deve ocorrer nos dois modelos. E sendo a hipertensão dos SHR de desenvolvimento espontâneo, fatores ambientais tais como ingestão exagerada de sódio (Louis et al., 1971), estresse (Yamori et al., 1969), alterações sociais (Hallback et al., 1975) e alterações do ciclo claro/escuro (Lais et al., 1974) podem afetar esse desenvolvimento.

Independentemente da controvérsia quanto à similaridade ou não entre os SHR e a hipertensão essencial humana, este modelo revela-se extremamente útil para a melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos, quer do próprio modelo animal ou da hipertensão essencial do homem.

Com relação ao desenvolvimento hipertensivo em SHR jovens, relata-se que a mensuração indireta da pressão arterial sistólica, mostrou-se similar entre SHR e WKy na 2ª e 3ª semanas de vida; com uma pequena diferença na 4ª semana; por volta da 6ª semana a pressão arterial sistólica em SHR apresentou-se significativamente elevada, quando comparada ao WKy. Também, que o período de maior aumento da pressão arterial sistólica em SHR é

da 3^a à 10^a semana, e que esta pode aumentar até a 20^a semana de idade (Zicha e Kunes, 1999). Embora os mecanismos precisos por meio dos quais ocorra uma sustentada elevação da pressão arterial na linhagem geneticamente hipertensa Okamoto-Aoki (SHR) permaneçam por serem elucidados, as alterações no controle renal do equilíbrio homeostático de fluídos e eletrólitos relacionam-se às modificações centrais e dominantes de longo prazo envolvidas na elevação da pressão arterial nesta linhagem. Estas modificações do metabolismo hidrossalino são consideradas fatores importantes no processo patogenético da linhagem geneticamente hipertensa de Okamoto-Aoki (SHR), uma vez que está demonstrado que o consumo excessivo de sódio eleva, enquanto a restrição da ingestão de sal, geralmente, atenua a hipertensão arterial nesta espécie (Louis et al., 1969). É possível que qualquer desajuste da conexão entre os rins e o sistema nervoso provoque o desenvolvimento da hipertensão seguida de ação renal. O decréscimo de a pressão arterial associado à resposta natriurética em animais jovens SHR, se comparado aos WKY, pode refletir diferentes níveis de atividade eferente neural aos rins, significativamente maior em animais da linhagem SHR com idades entre 3-5 semanas (Judy et al., 1979).

Por conta dos fatores citados até aqui, muitos trabalhos se ocupam em delimitar a ação central da angiotensina II e a caracterizar os mecanismos hipotalâmicos que envolvem o controle da sede e da homeostase hidro-eletrolítica. Acredita-se que o acúmulo progressivo deste tipo de conhecimento seja uma possibilidade de revelação de alvos mais específicos à presença deste polipeptídeo, assim como a oportunidade de se estabelecer os locais centrais que modulam os seus efeitos (Sunn et al., 2003; May et al., 2000). Por outro lado, no túbulo proximal renal há uma variedade de transportadores que podem ser alvos do hormônio passíveis de modulação por peptídeos derivados da sua metabolização e/ou associados a respostas contrárias, como também, pelo envolvimento de vias de transdução de sinais (Zhuo e Li, 2007).

Embora existam referências literárias sobre as diversas vias de sinalização intracelular, estudos sobre a ativação de um possível servomecanismo negativo e a possibilidade de associação aos efeitos mediados pela injeção central

de angiotensina II, sobre a manipulação renal de sódio em ratos geneticamente hipertensos, são escassos (Hernandez-Vargas et al., 2005). Por conseqüência, considerando-se a possibilidade de que a ativação contínua de moléculas de sinalização promova efeitos deletérios sobre os diversos sistemas fisiológicos, a sua caracterização pode fornecer novos alvos para medidas de detecção, tratamento, prevenção e controle circunstancial de doenças renais, cardiovasculares e da hipertensão arterial.

2- OBJETIVOS

O presente estudo foi elaborado com o intuito de:

- 1-** Constatar a expressão, a transdução e a associação da proteína JAK-2 e SOCS-3 idade-dependente em hipotálamos de animais WKy e em SHR paralelamente ao desenvolvimento hipertensivo.
- 2-** Associar a possibilidade da influência desta mesma via de sinalização intracelular ao consumo espontâneo da água e a manipulação tubular renal de sódio mediado pelo estímulo central com a angiotensina II.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Grupos experimentais

O presente estudo foi dirigido pelas normas gerais estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) para investigação em animais de laboratório.

As investigações seguiram em gaiolas individuais, utilizando-se de animais pareados pela idade de nascimento, machos e obtidos de uma ninhada isogênica de animais espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos Wistar Kyoto (WKy). As colônias originárias e cedidas pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB/Unicamp), Campinas, SP, Brasil. Imediatamente após o desmame das crias, de quatro semanas de idade aproximadamente, os grupos de animais SHR e WKy (n=10) foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C), umidade e luminosidade (ciclos de 12 horas claro/escuro), com livre acesso a água e a ração standard para ratos de laboratório (Purina - conteúdos de Na⁺: 135 ± 3 µEq/g e K⁺: 293 ± 5 µEq/g), os quais foram estudados num intervalo entre 4, 8 e 12 semanas após o desmame.

3.2- Método indireto de medida de pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal foi estimada semanalmente em ratos conscientes e retidos em contentores apropriados pelo método de pletismografia de cauda. Utilizando-se de um electroesfigmomanômetro (Narco Bio-System, Austin, TX, USA), o procedimento indireto permite a mensuração consecutiva da pressão arterial com elevada correlação (coeficiente de 0.975) quando comparado ao registro da pressão direta intra-arterial (Lovenberg, 1987). A pressão média de três leituras consecutivas correspondeu à pressão arterial medida para os animais dos grupos de SHR e WKy.

3.3- Técnica de estereotaxia

Os animais com 12 semanas de idade foram instrumentados para os estudos de estímulo do sistema nervoso central através da implantação crônica i.c.v. de cânulas metálicas. Resumidamente, eles foram anestesiados com pentobarbital sódico (30-50 mg/kg peso corporal, i.p.) e, após a abolição dos reflexos córneo-palpebral e podal, posicionados para estereotaxia em aparelho Stoelting Co. Uma cânula de aço inoxidável (23-gauge) obliterada, por um obturador também de aço, foi estereotaxicamente implantada no ventrículo lateral cerebral direito, servindo-se de técnica e de coordenadas previamente estabelecidas: antero-posterior, 0.2 mm do bregma, lateral 1.5 mm e vertical 4.2 mm (Michelotto et al., 2002). Os ratos se recuperaram dos procedimentos cirúrgicos por um período de uma semana. As cânulas foram consideradas acessíveis e corretamente posicionadas quando houve uma clara resposta dipsogênica dos animais à injeção i.c.v. de angiotensina II (Johnson e Epstein, 1974), ou ainda pela aplicação do corante azul de Evans aduzido por todos os ventrículos cerebrais.

3.4- Desenho experimental

Para examinar o efeito promovido pela administração central da angiotensina II sobre os mecanismos de sede, o ritmo de filtração glomerular e a manipulação tubular renal de sódio, os ratos foram randomicamente definidos nos seguintes grupos experimentais onde os ratos receberam 3 µl de angiotensina II i.c.v. A medida do volume de ingestão hídrica foi realizada depois de 30 minutos. Dentro destes mesmos parâmetros, montou-se um novo grupo para avaliação da função renal, porém houve restrição hídrica. As coletas, para medidas de os volumes urinários, foram realizadas depois de 30, 60, 90 e 120 minutos.

3.5- Protocolo para avaliação da resposta dipsogênica

No intervalo que antecedeu ao teste dipsogênico, os animais foram submetidos à restrição hídrica e sólida. Inicialmente, os obturadores das cânulas metálicas foram substituídos por uma agulha injetora (30-gauge) conectada ao tubo PE-10 em uma seringa do tipo Hamilton de 10 µl, por onde 3 µl de veículo ou da solução de angiotensina II (40pmol, 400 pmol, 4nmol, 40nmol) foi injetado no ventrículo lateral. Após o estímulo, os animais foram acompanhados por um período de 30 minutos para resposta de ingestão hídrica.

3.6- Protocolo para avaliação da manipulação renal de sódio e filtração glomerular

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de aço inoxidável sem restrições de movimentos. Após receberem por gavagem o cloreto de lítio, LiCl 60 mmol/ 100 gr de peso corporal (Merck) (Garcia et al., 1991), 14 horas antes do início do experimento (este período é considerado ideal à obtenção de um fluxo regular e estável durante a coleta de urina) foram colocados em jejum para a ração sólida com livre acesso à água. Posteriormente, os animais foram submetidos à administração por gavagem de água (correspondente a 5% do seu peso corporal). Depois de 60 minutos, os ratos receberam uma segunda gavagem de igual volume; após 20 minutos (intervalo considerado necessário para ocorrer o esvaziamento gástrico), iniciou-se a coleta urinária denominada basal (30 minutos) em tubos graduados; então, foi injetado i.c.v. 3 µl da solução de 400 pmol de angiotensina II. As coletas urinárias foram reiniciadas em períodos de 30, 60, 90, 120 minutos pós-estímulo.

Posteriormente aos estudos funcionais, os animais foram anestesiados e as amostras de sangue coletadas por meio de punção cardíaca.

3.6.1- Dosagens e análises bioquímicas

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e alíquotas foram estocadas a -20°C até o momento das dosagens.

i- Lítio, sódio e potássio: a determinação plasmática e urinária de lítio, sódio e potássio foram realizadas por fotometria de chama, através de um fotômetro Micronal, São Paulo, mod. 262.

ii- Creatinina endógena: as concentrações urinárias e plasmáticas de creatinina foram determinadas através de espectrofotometria, pelo método colorimétrico Brod-Sirota, utilizando-se de equipamento (Micronal, São Paulo, S. P). Foram empregados para as dosagens bioquímicas os reagentes da marca SIGMA, soros controles e padrões da marca QUALITROL - Merck.

3.7- Cálculos e análise estatística - *Clearances* renais

Os *clearances* renais foram calculados por fórmulas convencionais $C=VU/P$ ($\mu\text{l}^{-1}/\text{min}^{-1}/100\text{g p.c}$), sendo U a concentração urinária, V o fluxo urinário por minuto e P a concentração plasmática de creatinina ou lítio.

O *clearance* de creatinina (CCr) foi usado para estimar a taxa de filtração glomerular (RFG) e o *clearance* de lítio (CLi) para medir a manipulação tubular renal de sódio e água (UI/min%).

A fração de excreção de sódio (FENa) e de potássio (FEK) foram calculadas como $C\text{Na}/C\text{Cr} \times 100$ (%) e $C\text{K}/C\text{Cr} \times 100$, onde CNa é o *clearance* de sódio, CK o *clearance* de potássio e CCr é o *clearance* de creatinina.

As frações de excreção proximal (FEPNa) e pós-proximal (FEPPNa) de sódio, foram calculados como $\text{CLi}/\text{CCr} \times 100$ e $\text{CNa}/\text{CLi} \times 100$ respectivamente e expressos em porcentagem (%).

O aporte distal de sódio a partir dos túbulos proximais (DDNa), foi calculado como $CLi \times PNa$ onde, PNa é a concentração de sódio no plasma expressa como mmol/min /100g do peso corpóreo.

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (MD \pm DP). O número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses (n). Os experimentos foram realizados possibilitando o estudo de todos os grupos de animais em paralelo.

Para a análise dos resultados, utilizou-se o teste de análise de variância de uma via (ANOVA) para medidas repetidas, seguindo-se ao de Test-*t* de Bonferroni pareado para análise da diferença entre os dois grupos de animais. A significância, indicada por um asterisco (*), é adotada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$).

3.8- Protocolo para extração de tecidos, imunoprecipitação e *immunoblotting*

Os experimentos de *Western blot* foram empregados para a determinação dos níveis de proteínas citosólicas em tecido hipotalâmico. A extração, imunoprecipitação e *immunoblotting* foram aplicadas como previamente descrito por Carvalheira e colaboradores em 2001. Preambularmente as administrações centrais de angiotensina II, foram coletadas as amostras de tecidos hipotalâmicos em animais normotensos (controles, WKy) e geneticamente hipertensos (SHR), com idades entre 4, 8 e 12 semanas, para avaliação dos níveis de proteínas citosólicas, antes e após o desenvolvimento hipertensivo nesta última linhagem.

3.8.1- Soluções empregadas em experimentos de *Western blotting*

- **Solução de Tampão de extração**: Utilizado para homogeneização do tecido hipotalâmico e para extração de proteínas. Composta por: 100mM Trisma base, pH 7.5; 10mM EDTA; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM de fluoreto de sódio;

10mM de ortovanadato de sódio; 2mM de PMSF diluído em álcool etílico; 1% de Triton X-100 e 0,1mg/ml de aprotinina. A solução preparada foi mantida em gelo durante todo o experimento. O ortovanadato de sódio e o PMSF foram acrescentados ao tampão no momento do uso.

- **Solução de Tampão de Laemmli**: Usada para armazenar em freezer as proteínas extraídas e posterior aplicação no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para eletroforese. Esta solução tem em sua constituição 0,1% de Azul de Bromofenol; 1M de Fosfato de Sódio, pH 7,0; 50% de glicerol e 10%SDS.
- **Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado**: Empregada na lavagem das amostras após a incubação com proteína A sepharose 6MB. É composta por 100mM de Trisma base; 10mM de EDTA; 2 mM de Ortovanadato de Sódio; Triton X-100. A solução preparada foi mantida em gelo durante todo o processo de lavagem das amostras.
- **Solução tampão para SDS-PAGE**: gel da fase de resolução (concentrador) “Resolving”: Utilizada para confecção do gel de resolução. Composta de 4mM de EDTA, 2% SDS e 750 mM de Trisma base, ph 8.9 (ajustado com ácido clorídrico).
- **Solução tampão para eletroforese gel da fase empilhamento (separador) “Stacking”**: Usada para confecção do gel onde ocorre o empilhamento das proteínas. Em sua composição há 4mM de EDTA; 2% SDS; 50mM Trisma base, com o pH 6.7 (ajustado com ácido fosfórico).
- **Solução tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**: Empregada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). É constituída por 200mM Trisma base; 1.52 M glicina; 7.18M EDTA e 0,4% SDS. Para o uso a solução foi diluída 1:4.

- **Solução tampão para transferência**: Empregada no processo de transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Composta de 25mM de Trisma base, 192 mM glicina, 20% Metanol e 0.02% SDS para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantido a 4°C.
- **Solução basal**: Usada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após a transferência. Em sua constituição há 150mM de NaCl; 10mM de Trisma base e 0.02% de Tween 20.
- **Solução bloqueadora**: Empregada para incubar a membrana de nitrocelulose após a transferência com a finalidade de diminuir as ligações inespecíficas. Composta de 5% de BSA dissolvido em solução basal.
- **Solução de anticorpo**; Contém anticorpos específicos para marcação das proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose. Em sua constituição há 3% de BSA, dissolvido em solução basal, mais os anticorpos utilizados nos experimentos em diluição estabelecida.
- **Solução de Iodo (¹²⁵I)**: É a solução que permite a visualização das bandas em auto-radiografia. É composta por 1% de BSA, dissolvido em solução basal, mais 5 microlitros de *proteína A* marcada com ¹²⁵I.

3.8.2- Homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais

Os tecidos hipotalâmicos foram obtidos e homogeneizados em solução tampão de extração, utilizando-se para isso de um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram então centrifugados (15.500 x g, 20 minutos, 4°C) para remoção do material insolúvel.

Uma parte do sobrenadante utilizado para o ensaio determinou o conteúdo de proteínas totais, através do método fotolorimétrico de Biureto (Bradford, 1976), a outra parte foi submetida à imunoprecipitação e *immunoblotting* com os anticorpos específicos.

3.8.3- Imunoprecipitação e *Immunoblotting*

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, o sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight* a 4° C com os seguintes anticorpos inerentes e específicos para via JAK/STAT/SOCS sendo: JAK-2 (policlonal de coelho, sc-7229 para imunoprecipitação); SOCS-3 (policlonal de coelho, sc-9023 para imunoprecipitação; policlonal de cabra sc-7009 para *immunoblotting*); anticorpo anti-PY PY20- (monoclonal de camundongo sc-508) da Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A sepharose 6 MB, por 2 horas à 4° C. Após este período as amostras foram centrifugadas (15.500 x g, 20 minutos, 4° C) e submetidas à lavagem, com a solução tampão apropriada, por 3 vezes em períodos de 5 minutos cada (15.500 x g, 4° C). No enalço, as proteínas foram precipitadas com tampão de Laemmli ⁽⁶⁴⁾ contendo 100 mmol/l de DTT e aquecidas em água fervente por 5 a 10 minutos. Consecutivamente, quantidades iguais de proteína (5mg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Desta maneira, a eletroforese das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos a 120V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-Rad (Towbin et al., 1979). A ligação dos anticorpos às proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com o tampão de bloqueio a temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi encubada (*overnight*) com os anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo; lavada por 15 minutos com a solução basal. Seguidamente, a membrana foi incubada com 5 microlitros de ¹²⁵I *Proteína A* (30uCi/ug) em solução de lodo por 120 minutos em

temperatura ambiente e, novamente, lavada por 30 minutos. A proteína A ¹²⁵I ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por auto-radiografia e em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isso, o cassete contendo a membrana e o filme foi mantido a temperatura de -80°C e seguido por 12-120 horas. O filme foi revelado e as bandas identificadas foram quantificadas nas suas áreas, utilizando-se de técnica de densitometria óptica através de um scanner de mesa Color Page HR6X (Genius) e o programa Scion Image (Scioncorp).

3.9- Análise Estatística - Biologia Molecular

Após a quantificação das bandas pela auto-radiografia e por densitometria, utilizou-se o *software* Scion Image (*Scioncorp*), procedeu-se à análise dos dados, comparando-se o valor da densidade das bandas com aquele obtido pelo grupo controle. Os resultados foram expressos em %. O grupo controle recebeu o valor de 100%. Os demais grupos normalizados e relacionados aos controles. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (média ± SEM) dos valores em %. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Via de sinalização celular - níveis de proteínas citosólicas em ratos WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo

As figuras abaixo ilustram as alterações idade-dependente da via de sinalização celular JAK-2/SOCS-3 em hipotálamos de SHR. Se comparados aos WKy, identifica-se a diminuição da fosforilação da proteína JAK-2 (figura A), o aumento da expressão da proteína SOCS-3 (figura B) e a ascensão progressiva da capacidade da proteína SOCS-3 em co-precipitar a porção de JAK-2 (figura C).

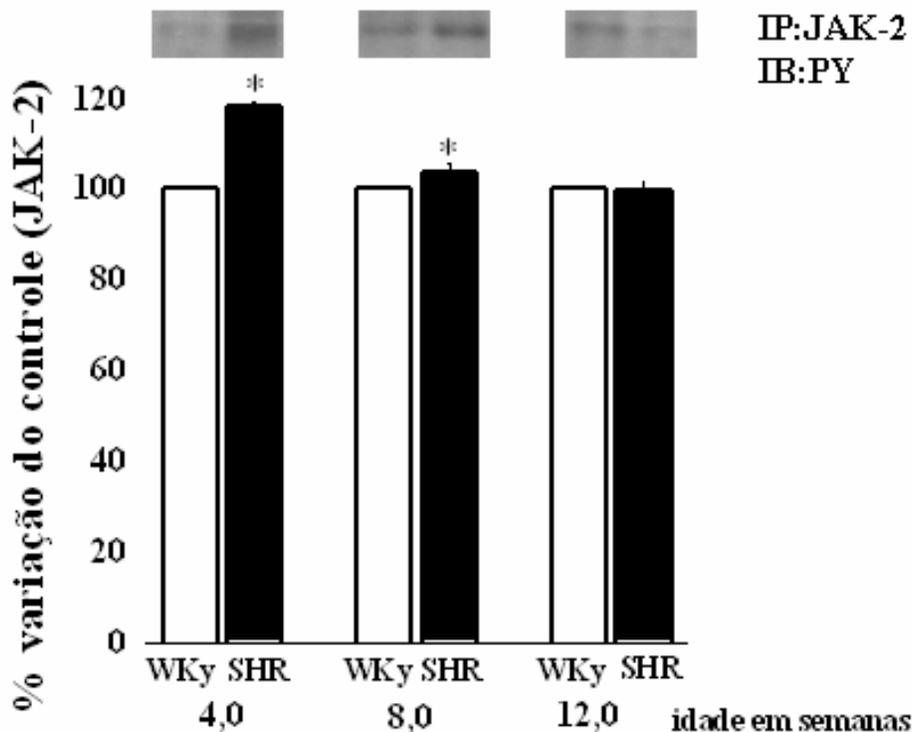


Figura A- Expressão protéica de JAK-2

Figura A- Expressão protéica de JAK-2 em hipotálamo de ratos SHR e WKy. Após 4, 8 e 12 semanas, os hipotálamos provenientes dos animais foram extraídos e homogeneizados conforme descrito nos protocolos disponíveis em Materiais e Métodos. Os extratos protéicos submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-JAK-2, e à *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti-fosfotirosina (anti-pY). Pela quantificação das bandas (*ScionCorp*), o gráfico de barras demonstra a fosforilação de JAK-2 obtida, a qual é apresentada como média \pm erro padrão da média de três experimentos separados ($n=5$, média \pm EPM $p \leq 0.05$ quando comparados entre si e/ou ao controle).

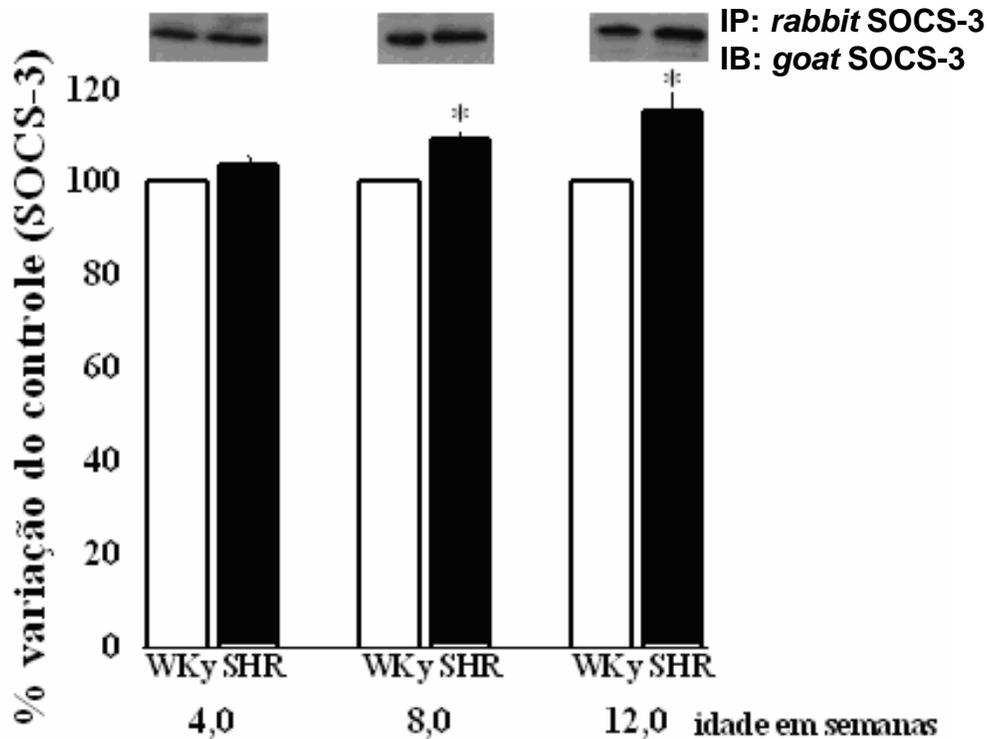


Figura B- Expressão protéica de SOCS-3

Figura B- Expressão protéica de SOCS-3 em hipotálamo de ratos SHR e WKy. Após 4, 8 e 12 semanas, os hipotálamos provenientes dos animais foram extraídos e homogeneizados conforme descrito nos protocolos disponíveis em Materiais e Métodos. Os extratos protéicos submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-*rabbit* SOCS-3, e à *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti-*goat* SOCS-3. Pela quantificação das bandas (*ScionCorp*), o gráfico de barras demonstra a expressão relativa de SOCS-3 obtida, a qual é apresentada como média \pm erro padrão da média de três experimentos separados ($n=5$, média \pm EPM $p \leq 0.05$ quando comparados entre si e/ou ao controle).

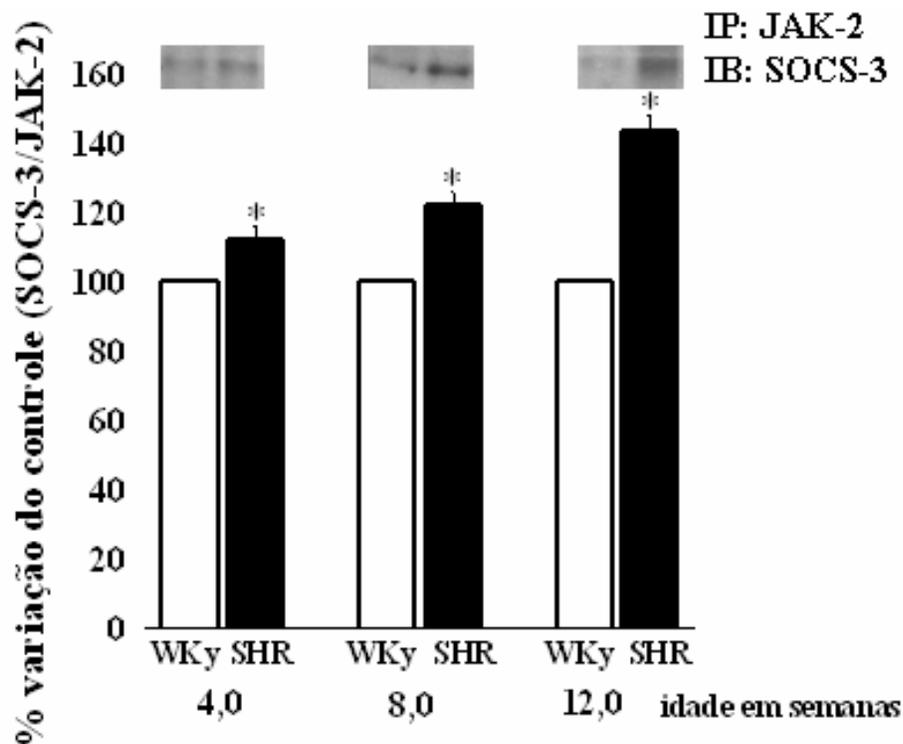


Figura C- Associação protéica entre SOCS-3 e JAK-2

Figura C- Associação entre JAK-2 e SOCS-3 em hipotálamo de ratos SHR e WKy. Após 4, 8 e 12 semanas, os hipotálamos provenientes dos animais foram extraídos e homogeneizados conforme descrito nos protocolos disponíveis em Materiais e Métodos. Os extratos protéicos submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-JAK-2, e à *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti-*goat* SOCS-3. Pela quantificação das bandas (*ScionCorp*), o gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SOCS-3 e JAK-2 obtida, a qual é apresentada como média \pm erro padrão da média de três experimentos separados ($n=5$, média \pm EPM $p \leq 0.05$ quando comparados entre si e/ou ao controle).

4.2- Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo

Os valores obtidos pelo método indireto para medida de pressão arterial sistólica são apresentados a seguir (figura D). A evolução é caracterizada pela ascensão progressiva idade-dependente dos índices pressóricos em animais da linhagem SHR quando comparados aos seus controles WKy.

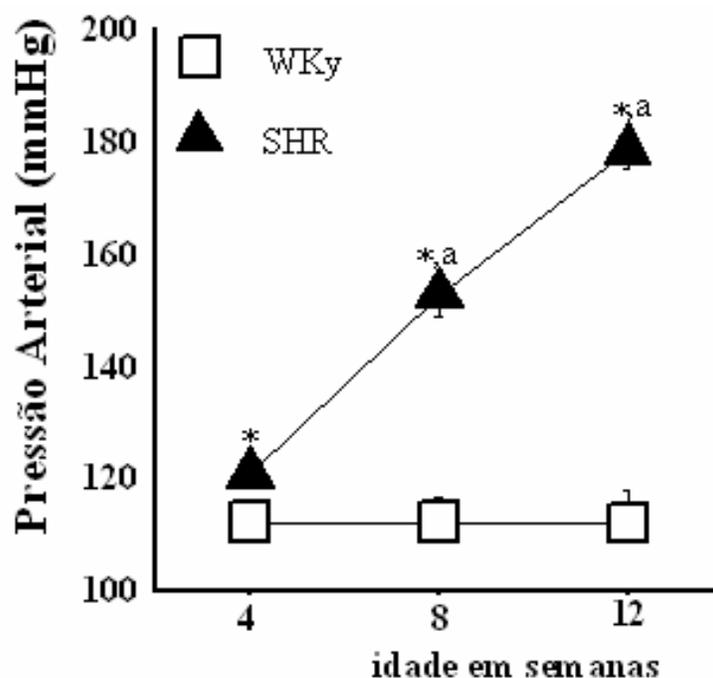


Figura D- Medida indireta de pressão arterial em WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo. Os resultados alcançados para as medidas de pressão arterial sistólica dos animais WKy e SHR são revelados pela figura D. Em todos os grupos, o $n=10$ e os valores do cômputo representados pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

4.3- Ingestão hídrica pós-estímulo intracerebroventricular com solução de angiotensina II

Para determinar a concentração adequada de solução de angiotensina II a ser administrada i.c.v e à avaliação posterior por meio das provas funcionais, fez-se necessário a realização de uma curva dose-resposta de efeito sobre a ingestão hídrica, com a medida final de o volume ingerido expressa em mililitros, 30 minutos pós-estímulo com 0,15M NaCl ou com solução de AngII em concentrações de 40pmol, 400pmol, 4nmol, 40nmol (figura E). Foi tomada como ideal a resposta promovida pós-estimulação i.c.v com 400pmol de AngII (figura F). O resultado mostra o aumento significativo da ingestão hídrica em mililitros por cem gramas de massa corpórea (ml/100g p.c.) tanto maior em WKy.

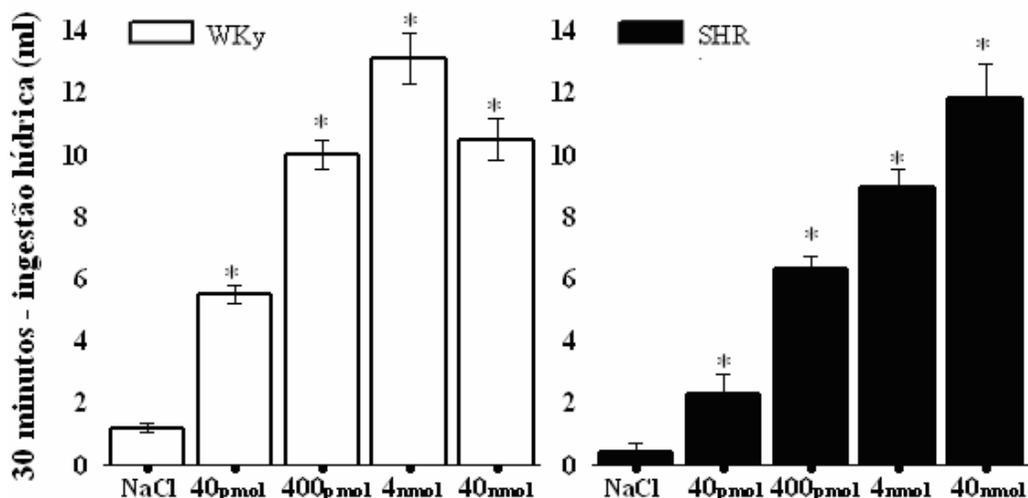


Figura E- Curva dose-resposta ingestão hídrica (ml) pós-estímulo com angiotensina II i.c.v

Figura E- Os resultados da curva dose-resposta de ingestão hídrica de animais com 12-14 semanas de idade WKy e SHR são revelados pela figura E. Os ratos foram canulados e receberam 3µl de solução salina ou 3µl de solução de angiotensina II (40pmol, 400pmol, 4nmol, 40nmol). Em ambos os grupos, o volume ingerido foi mensurado 30 minutos pós-estímulo. O número de animais é representado por $n=10$ e os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

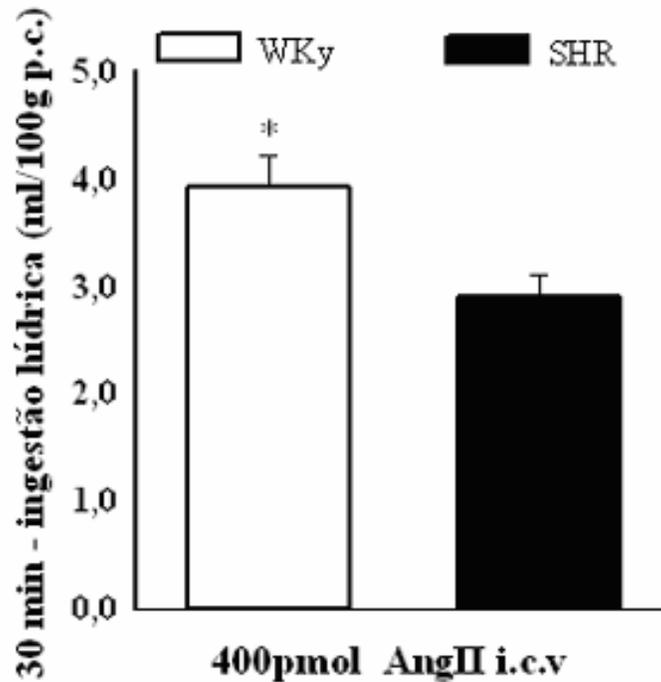


Figura F- 30 minutos de ingestão hídrica (ml/100g p.c) pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v. em animais WKy e SHR de 12 semanas

Figura F- Os resultados para o volume de ingestão hídrica em ml por 100g de peso corporal 30 minutos pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v, de animais com 12-14 semanas de idade WKy e SHR, são revelados pela figura F. Os ratos foram canulados e receberam 3µl de solução de angiotensina II (400pmol). O número de animais é representado por $n=10$; os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

4.4- Estudo funcional renal - *Clearances* de creatinina e lítio pré e pós-estímulo i.c.v com 400pmol de angiotensina II em animais WKy e SHR após o desenvolvimento hipertensivo

As figuras a seguir apontam para os resultados alcançados no estudo de a filtração glomerular e a manipulação renal de sódio e potássio. O acompanhamento ocorreu por um período basal de 30 minutos e pós-estimulação i.c.v com angiotensina II em concentração de 400pmol por 30, 60, 90 e 120 minutos.

Após o desafio, para ambas linhagens, observa-se a queda do *clearance* de creatinina (figura G), porém entre os períodos de 30 e 60 minutos é ainda mais evidente em WKy. A estimulação promove o acréscimo da fração de excreção de potássio (figura J) e de sódio (figura H), atentando-se ao fato de que a resposta natriurética está intimamente relacionada à ascensão de a excreção tubular renal pós-proximal (figura K) em relação à excreção proximal de sódio (figura I) e, ainda, de maneira superior em WKy.

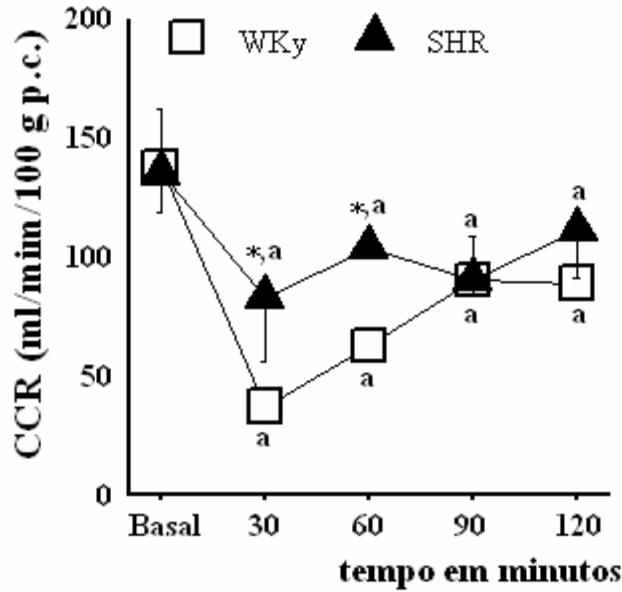


Figura G- Clearance de creatinina (CCr)

Figura G- Os resultados apresentam os efeitos da injeção i.c.v de 400pmol de angiotensina II sobre o clearance de creatinina (CCr) durante o estudo funcional renal nos grupos WKy e SHR. Os animais com idades entre 12-14 semanas foram canulados. Conforme o protocolo experimental descrito em Materiais e Métodos, após a coleta urinária de um período de 30 minutos denominado basal, os ratos receberam 3µl de solução salina ou 3µl de solução de 400pmol angiotensina II e foram acompanhados por 30, 60,90 e 120 minutos. O número de animais é representado por $n=10$ e os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

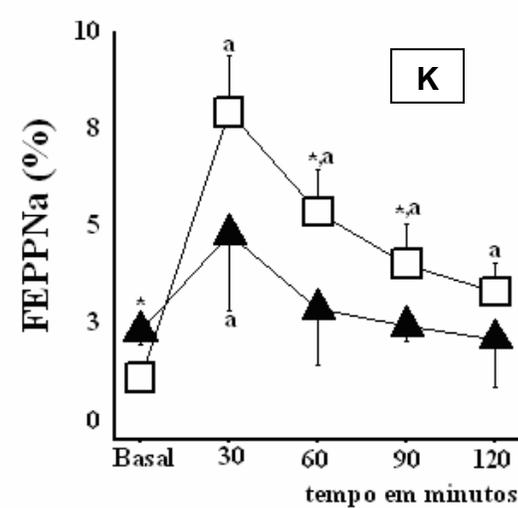
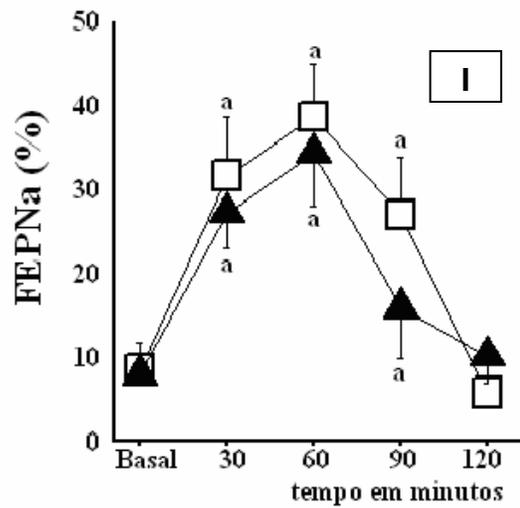
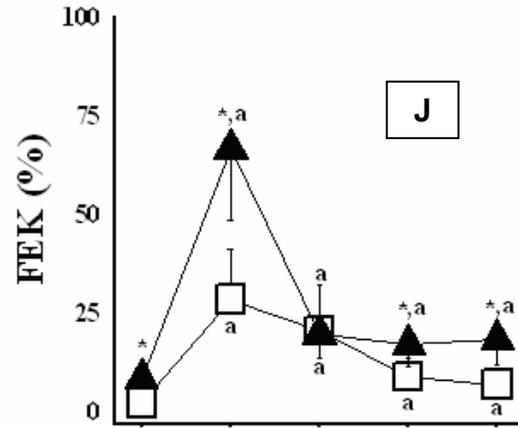
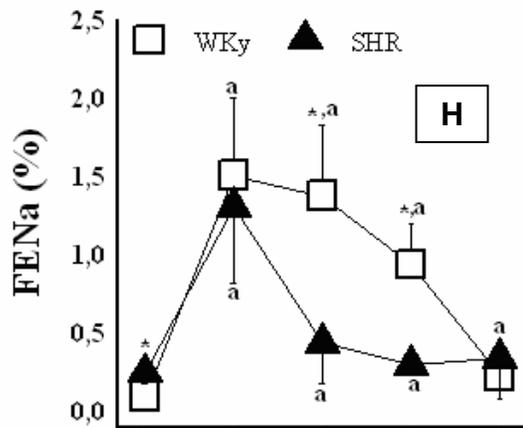


Figura H- Fração de excreção renal de sódio (FENa)

Figura I- Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa)

Figura J- Fração de excreção renal de potássio (FEK)

Figura K- Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa)

Constituído pelas figuras **H, I, J, K**, o painel anterior ilustra os efeitos promovidos pela injeção i.c.v com solução de 400pmol de angiotensina II sobre (H) fração de excreção renal de sódio (FENa), (I) proximal (FEPNa), (K) pós-proximal (FEPPNa) e (J) fração de excreção de potássio (FEK) durante o estudo funcional renal dos grupos de animais WKy e SHR. Os ratos com idades entre 12-14 semanas foram canulados. Conforme o protocolo experimental descrito em Material e Métodos, após a coleta urinária de um período de 30 minutos denominado basal, os ratos receberam 3µl de solução salina ou 3µl de solução de 400pmol angiotensina II e foram acompanhados por 30, 60,90 e 120 minutos. O número de animais é representado por $n=10$; os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (**a**).

4.1- Via de sinalização celular - níveis de proteínas citosólicas em ratos WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo

As figuras abaixo ilustram as alterações idade-dependente da via de sinalização celular JAK-2/SOCS-3 em hipotálamos de SHR. Se comparados aos WKy, identifica-se a diminuição da fosforilação da proteína JAK-2 (figura A), o aumento da expressão da proteína SOCS-3 (figura B) e a ascensão progressiva da capacidade da proteína SOCS-3 em co-precipitar a porção de JAK-2 (figura C).

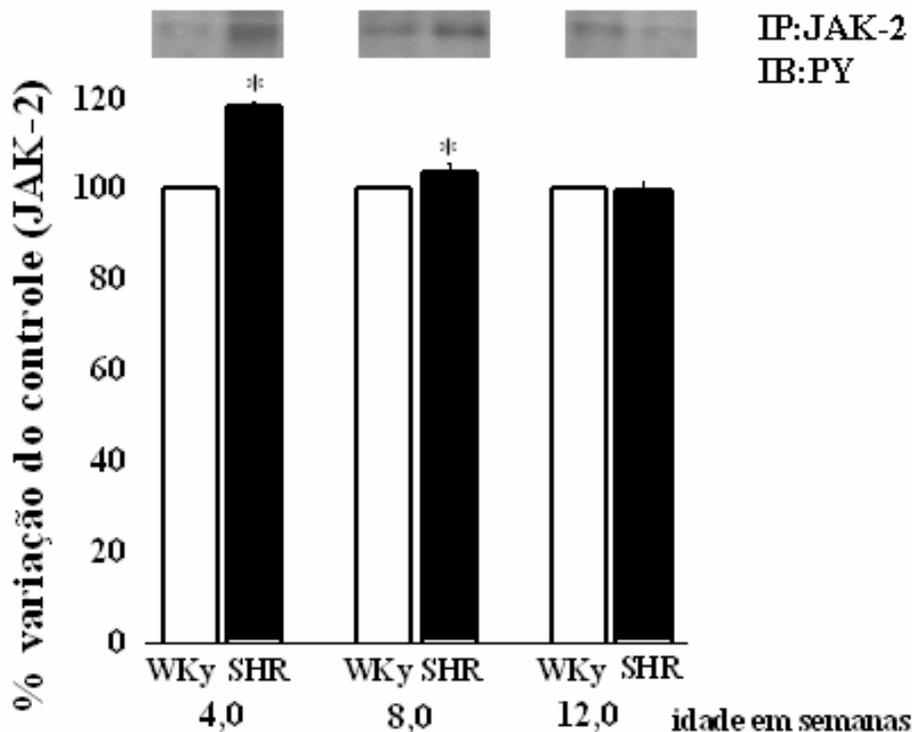


Figura A- Expressão protéica de JAK-2 em hipotálamo de ratos SHR e WKy. Após 4, 8 e 12 semanas, os hipotálamos provenientes dos animais foram extraídos e homogeneizados conforme descrito nos protocolos disponíveis em Materiais e Métodos. Os extratos protéicos submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-JAK-2, e à *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti-fosfotirosina (anti-pY). Pela quantificação das bandas (*ScionCorp*), o gráfico de barras demonstra a fosforilação de JAK-2 obtida, a qual é apresentada como média \pm erro padrão da média de três experimentos separados ($n=5$, média \pm EPM $p \leq 0.05$ quando comparados entre si e/ou ao controle).

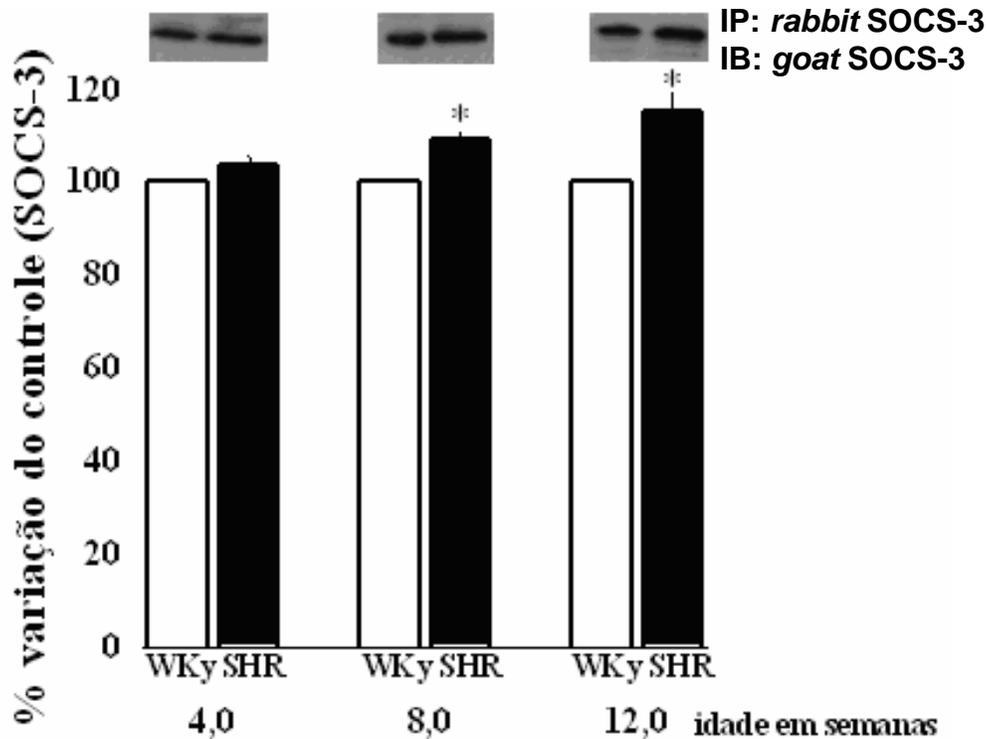


Figura B- Expressão protéica de SOCS-3 em hipotálamo de ratos SHR e WKy. Após 4, 8 e 12 semanas, os hipotálamos provenientes dos animais foram extraídos e homogeneizados conforme descrito nos protocolos disponíveis em Materiais e Métodos. Os extratos protéicos submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-*rabbit* SOCS-3, e à *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti-*goat* SOCS-3. Pela quantificação das bandas (*ScionCorp*), o gráfico de barras demonstra a expressão relativa de SOCS-3 obtida, a qual é apresentada como média \pm erro padrão da média de três experimentos separados ($n=5$, média \pm EPM $p \leq 0.05$ quando comparados entre si e/ou ao controle).

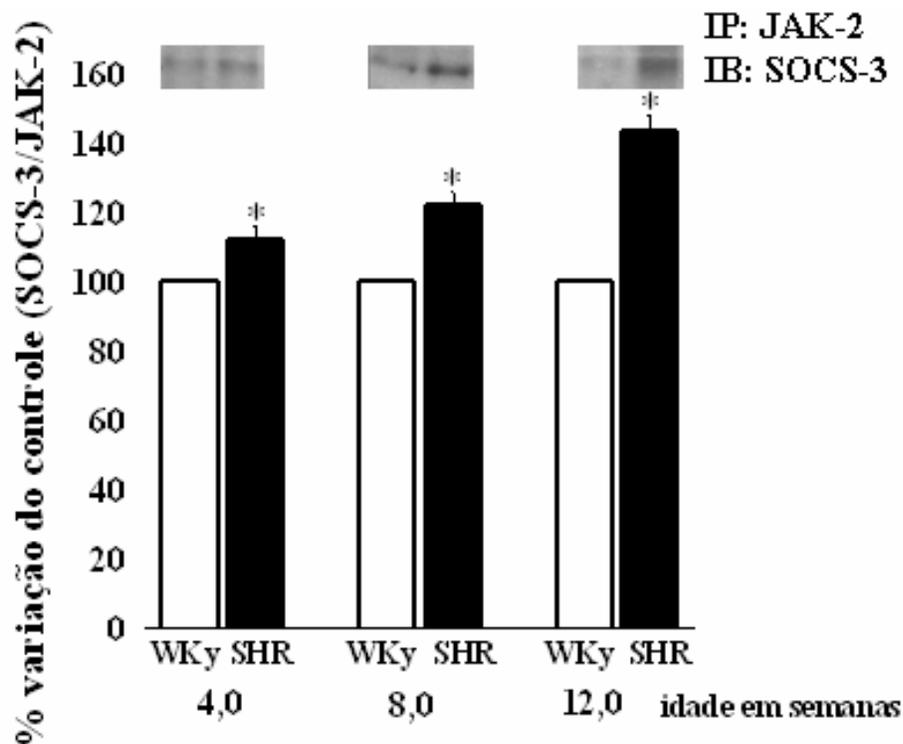


Figura C- Associação entre JAK-2 e SOCS-3 em hipotálamo de ratos SHR e WKy. Após 4, 8 e 12 semanas, os hipotálamos provenientes dos animais foram extraídos e homogeneizados conforme descrito nos protocolos disponíveis em Materiais e Métodos. Os extratos protéicos submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-JAK-2, e à *immunoblotting* (IB) com anticorpo anti-goat SOCS-3. Pela quantificação das bandas (*ScionCorp*), o gráfico de barras demonstra a associação relativa entre SOCS-3 e JAK-2 obtida, a qual é apresentada como média \pm erro padrão da média de três experimentos separados ($n=5$, média \pm EPM $p \leq 0.05$ quando comparados entre si e/ou ao controle).

4.2- Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo

Os valores obtidos pelo método indireto para medida de pressão arterial sistólica são apresentados a seguir (figura D). A evolução é caracterizada pela ascensão progressiva idade-dependente dos índices pressóricos em animais da linhagem SHR quando comparados aos seus controles WKy.

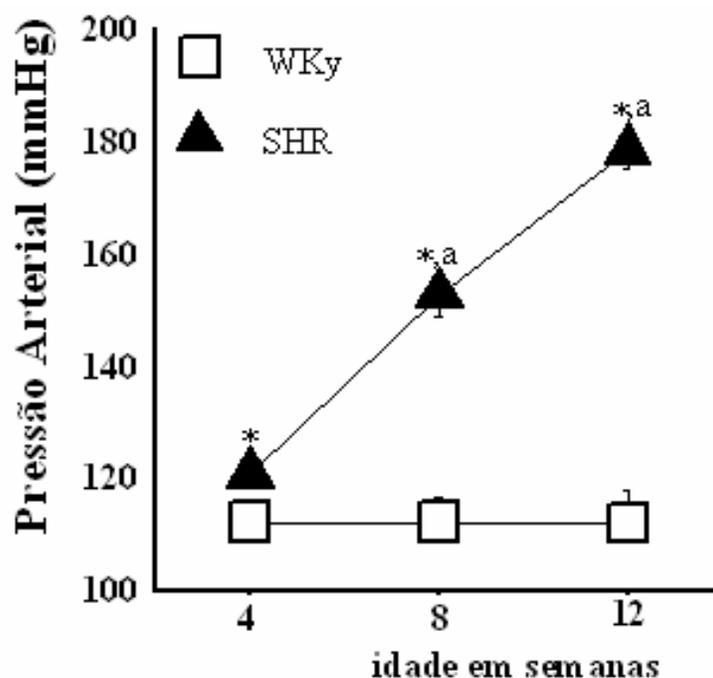


Figura D- Medida indireta de pressão arterial em WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo. Os resultados alcançados para as medidas de pressão arterial sistólica dos animais WKy e SHR são revelados pela figura D. Em todos os grupos, o $n=10$ e os valores do cômputo representados pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

4.3- Ingestão hídrica pós-estímulo intracerebroventricular com solução de angiotensina II

Para determinar a concentração adequada de solução de angiotensina II a ser administrada i.c.v e à avaliação posterior por meio das provas funcionais, fez-se necessário a realização de uma curva dose-resposta de efeito sobre a ingestão hídrica, com a medida final de o volume ingerido expressa em mililitros, 30 minutos pós-estímulo com 0,15M NaCl ou com solução de AngII em concentrações de 40pmol, 400pmol, 4nmol, 40nmol (figura E). Foi tomada como ideal a resposta promovida pós-estimulação i.c.v com 400pmol de AngII (figura F). O resultado mostra o aumento significativo da ingestão hídrica em mililitros por cem gramas de massa corpórea (ml/100g p.c.) tanto maior em WKy.

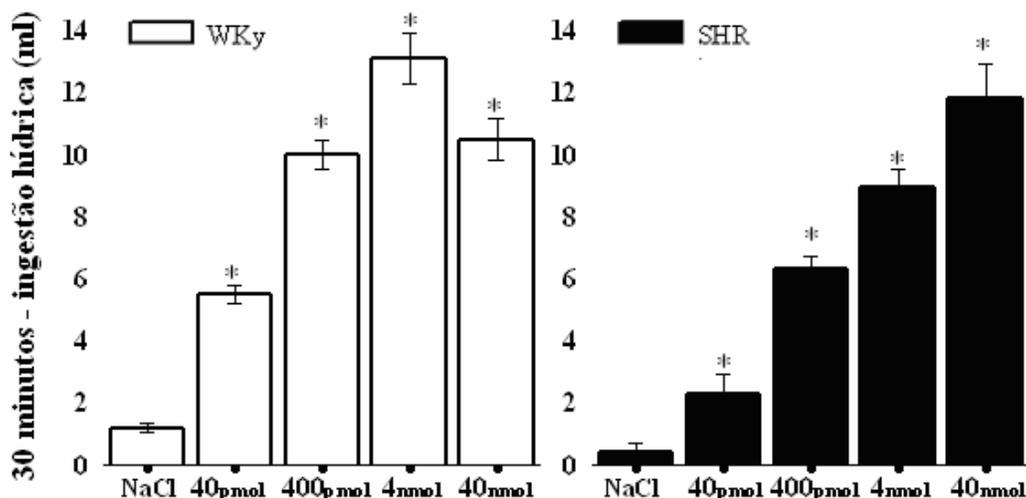


Figura E- Curva dose-resposta ingestão hídrica (ml) pós-estímulo com angiotensina II i.c.v.

Os resultados da curva dose-resposta de ingestão hídrica de animais com 12-14 semanas de idade WKy e SHR são revelados pela figura E. Os ratos foram canulados e receberam 3µl de solução salina ou 3µl de solução de angiotensina II (40pmol, 400pmol, 4nmol, 40nmol). Em ambos os grupos, o volume ingerido foi mensurado 30 minutos pós-estímulo. O número de animais é representado por $n=10$ e os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

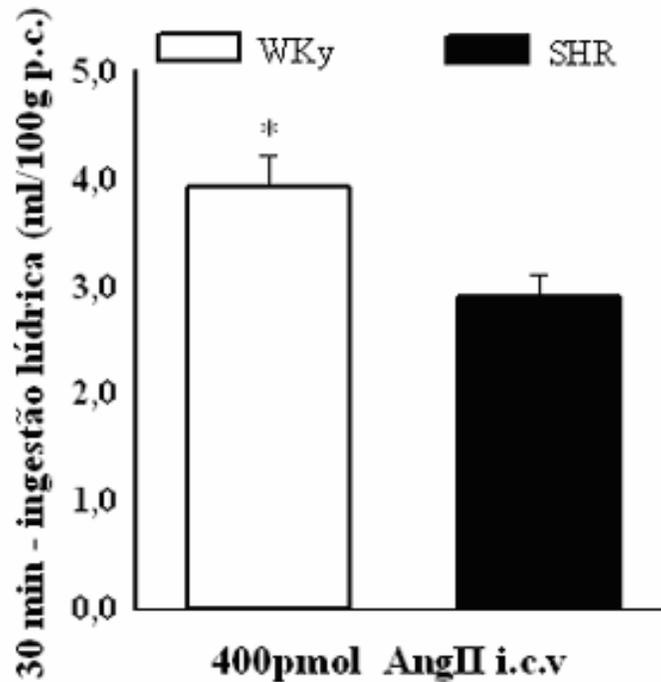


Figura F- 30 minutos de ingestão hídrica (ml/100g p.c) pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v. em animais WKy e SHR de 12 semanas.

Os resultados para o volume de ingestão hídrica em ml por 100g de peso corporal 30 minutos pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v, de animais com 12-14 semanas de idade WKy e SHR, são revelados pela figura F. Os ratos foram canulados e receberam 3 μ l de solução de angiotensina II (400pmol). O número de animais é representado por $n=10$; os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

4.4- Estudo funcional renal - *Clearances* de creatinina e lítio pré e pós-estímulo i.c.v com 400pmol de angiotensina II em animais WKy e SHR após o desenvolvimento hipertensivo

As figuras a seguir apontam para os resultados alcançados no estudo de a filtração glomerular e a manipulação renal de sódio e potássio. O acompanhamento ocorreu por um período basal de 30 minutos e pós-estimulação i.c.v com angiotensina II em concentração de 400pmol por 30, 60, 90 e 120 minutos.

Após o desafio, para ambas linhagens, observa-se a queda do *clearance* de creatinina (figura G), porém entre os períodos de 30 e 60 minutos é ainda mais evidente em WKy. A estimulação promove o acréscimo da fração de excreção de potássio (figura J) e de sódio (figura H), atentando-se ao fato de que a resposta natriurética está intimamente relacionada à ascensão de a excreção tubular renal pós-proximal (figura K) em relação à excreção proximal de sódio (figura I) e, ainda, de maneira superior em WKy.

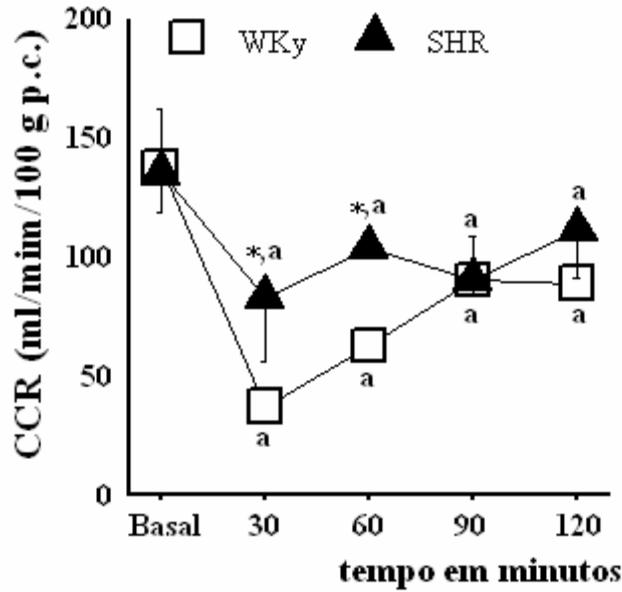


Figura G- Clearance de creatinina (CCr).

Os resultados apresentam os efeitos da injeção i.c.v de 400pmol de angiotensina II sobre o clearance de creatinina (CCr) durante o estudo funcional renal nos grupos WKy e SHR. Os animais com idades entre 12-14 semanas foram canulados. Conforme o protocolo experimental descrito em Materiais e Métodos, após a coleta urinária de um período de 30 minutos denominado basal, os ratos receberam 3µl de solução salina ou 3µl de solução de 400pmol angiotensina II e foram acompanhados por 30, 60,90 e 120 minutos. O número de animais é representado por $n=10$ e os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (a).

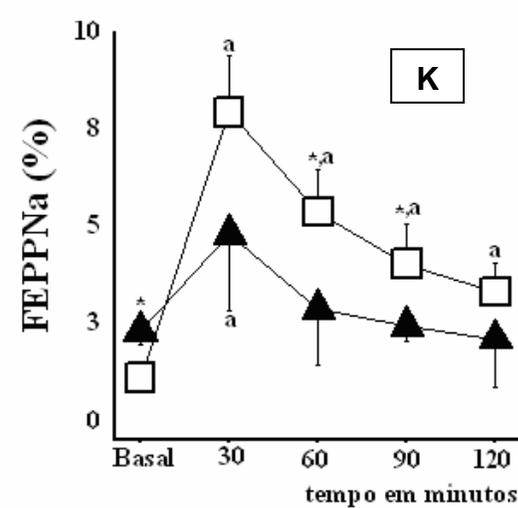
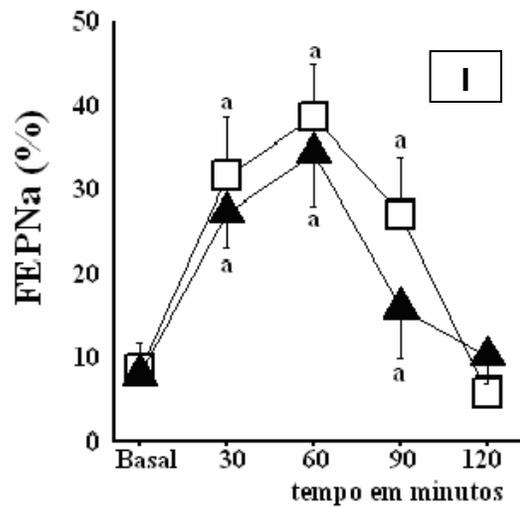
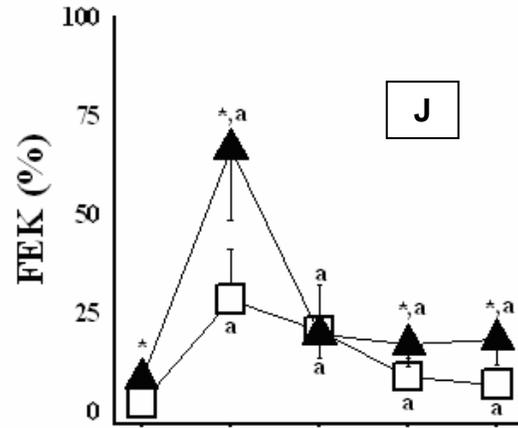
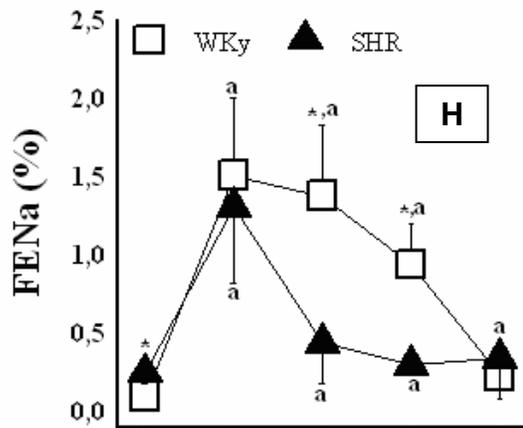


Figura H- Fração de excreção renal de sódio (FENa)

Figura I- Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa)

Figura J- Fração de excreção renal de potássio (FEK)

Figura K- Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa)

Constituído pelas figuras **H, I, J, K**, o painel anterior ilustra os efeitos promovidos pela injeção i.c.v com solução de 400pmol de angiotensina II sobre (H) fração de excreção renal de sódio (FENa), (I) proximal (FEPNa), (K) pós-proximal (FEPPNa) e (J) fração de excreção de potássio (FEK) durante o estudo funcional renal dos grupos de animais WKy e SHR. Os ratos com idades entre 12-14 semanas foram canulados. Conforme o protocolo experimental descrito em Material e Métodos, após a coleta urinária de um período de 30 minutos denominado basal, os ratos receberam 3µl de solução salina ou 3µl de solução de 400pmol angiotensina II e foram acompanhados por 30, 60,90 e 120 minutos. O número de animais é representado por $n=10$; os valores do cômputo pela média \pm desvio padrão (MD \pm DP). Os experimentos possibilitam o estudo em paralelo. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA para medidas repetidas) e o *Test-t* de Bonferroni (para diferença entre os grupos de animais). Para argüição, a significância acatada com um nível χ 5% ($p \leq 0,05$) para os grupos (*) e para os períodos (**a**).

5- DISCUSSÃO

Há tempos, alguns investigadores sugerem que a administração i.c.v de angiotensina II em animais normotensos promove o aumento da excreção renal de sódio (Andersson et al., 1972), a retenção de água, a secreção de vasopressina e a alteração da pressão arterial (Ferguson et al., 1997). No entanto, para os animais espontaneamente hipertensos tais informações são restritas.

Analisando-se os dados de constatação relacionados à ativação da via de sinalização celular JAK-2/SOCS-3 mediada por uma possível dessensibilização à angiotensina II em área hipotalâmica de SHR, verificou-se o aumento sustentado idade-dependente de expressão de SOCS-3 e de associação entre JAK-2/SOCS-3, seguido à diminuição de atividade de JAK-2, mas sem alteração da expressão protéica em animais da linhagem WKy. Na realidade, diversos sistemas participam do controle da transdução do sinal da angiotensina II. Acredita-se que as serinas e as quinases, ou as fosfatases de treonina atuem aumentando ou suprimindo a transdução de sinal, enquanto as fosfatases como SHIP1 e SHIP2 modulam as cascatas de sinalização. Também, considera-se a possibilidade de o bloqueio físico dos locais funcionais dos transdutores, conseqüentemente, gerando alterações sobre a via de sinalização celular (Inagami et al., 1999). Possivelmente, a redução idade-dependente da atividade de JAK-2 hipotalâmica revele a dessensibilização da via de angiotensina II em resposta ao estímulo prolongado (Torsoni et al., 2004) em animais SHR. Utilizando-se deste pressuposto, pode-se especular sobre uma factível regulação da via de sinalização celular coordenada pela SOCS-3. Assim admitindo, a exposição ao sinal extracelular não conduziria à resposta progressiva e descontrolada, ou seja, através da via JAK/STAT a proteína controladora da sinalização celular SOCS-3 forma um complexo com JAK-2 justificando o seu importante papel no servomecanismo de regulação negativa do sinal da via da angiotensina II em tecidos hipotalâmicos de ratos SHR. Além disso, pode-se aventar que o aumento sustentado idade-dependente de atividade da via JAK2/SOCS-3 em hipotálamo de SHR sinalize a hiperatividade central do sistema renina-angiotensina cerebral

(Zhu et al., 2006), sendo a hiperatividade considerada um fator de contribuição à patogênese da hipertensão na espécie (Veerasingham e Raizada, 2003).

Quanto aos achados das provas de mecanismos funcionais pós-estimulação i.c.v com 400 pmol de solução de angiotensina II, inicialmente, observa-se o aumento da ingestão hídrica, o qual ocorreu em média após 5 minutos e foi sustentado por um período de 10/15 minutos (Fitzsimons, 1998), porém muito maior em WKy do que em SHR. Baseado em mecanismos fisiológicos clássicos sobre a dipsogênese, julga-se que a ingestão de água e de sal seja controlada pela volemia e pela osmolalidade por meio de receptores sensoriais (Fitzsimons e Moore-Gillon, 1980). Sabendo-se que o órgão subfornical é o local central de atuação da angiotensina II na promoção de o efeito dipsogênico (Peng et al., 2003; Magiapane et al., 1984; Magiapane e Simpson, 1980a), afirma-se que uma via de regulação angiotensinérgica de resposta dipsogênica se inicie pós-estimulação com solução de angiotensina II (400pmol), excitando os neurônios desta área, permitindo o livre acesso para o núcleo paraventricular e, finalmente, projetando-se aos centros autônomos, medula ventrolateral rostral e para a coluna de células intermediolateral da medula espinhal, com a possibilidade de envolvimento de diferentes mecanismos pré e pós-sinápticos. No caso, a sede é considerada secundária a percepção para o impulso de ingestão líquida (Sakai et al, 2007; Hagiwara et al., 2005; Ozaky et al., 2004; LaGrange et al., 2003). Além de a projeção dirigida ao núcleo paraventricular hipotalâmico e aos neurônios tonicamente excitados pela estimulação endógena dos receptores AT1, cita-se a inibição de todos os mecanismos nervosos simpáticos pós-inativação do núcleo paraventricular (Allen, 2002). Para a finalização da resposta inicial de ingestão hídrica, menciona-se que a injeção intracerebroventricular de angiotensina II promova o aumento seletivo de liberação de noradrenalina pelo hipotálamo anterior e, conseqüentemente, a diminuição da resposta dipsogênica inicial (Miyakubo et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Este mecanismo é observado em ambas as linhagens, porém, enfatizando-se que a resposta é muito maior na linhagem WKy. Este dado

indica claramente a atenuação da resposta de ingestão hídrica mediada pela injeção de angiotensina II em SHR, se comparados aos WKy.

Por intermédio dos resultados obtidos nas provas de função renal (*clearances* de creatinina e lítio) atenta-se à resposta natriurética associada à ascensão da excreção tubular renal pós-proximal de sódio induzida pelo estímulo central com solução de angiotensina II para ambas as espécies. Há três características principais neste estudo que ampliam algumas observações precedentes (Andersson et al., 1972) no que diz respeito à natriurese induzida pela administração i.c.v com angiotensina II: primeiramente, a resposta natriurética também é atenuada na espécie hipertensiva; segundo, há uma independência entre a resposta de ingestão hídrica e de efeitos renais; terceiro, existe autonomia entre a filtração glomerular e a manipulação tubular renal de sódio.

Estudos prévios demonstraram a excreção tubular renal de sódio aumentada logo na primeira fração urinária coletada aos 5 minutos, como também, aos 60 minutos após a injeção i.c.v de angiotensina II (Shoji et al., 1991; Bjorbaek et al., 1997), confirmando a averiguação do presente trabalho para WKy e SHR. Em outros dois trabalhos investigativos, relatou-se a capacidade de a angiotensina II induzir primeiramente a ingestão hídrica e depois o apetite preferencial de sódio (Unger et al., 1989), também em animais anefréticos (Fluharty e Manaker, 1983), embora os pesquisadores do último estudo sugerissem que o apetite de sódio induzido pela angiotensina II não seja secundário à perda, mas possivelmente pelo efeito central do peptídeo sobre o balanço intestinal de líquido e de eletrólito.

Torna-se importante salientar que na investigação atual, a resposta natriurética foi induzida por injeções i.c.v do peptídeo numa concentração em pmol, sendo esta considerada inferior às doses requeridas para promover o ato de beber, de aumento pressórico ou de liberação de hormônios hipofisários, sob as mesmas circunstâncias experimentais. Publicado em 1983, o estudo de Schelling et al. indica que as concentrações de angiotensina II no líquido cefalorraquidiano de ratos permanecem em torno de 29.5 ± 5.9 fmol/ml. Supondo-se um volume de

distribuição em torno dos 200 µl, as concentrações de angiotensina II do líquido cerebrospinal reproduzida no protocolo que vigora se aproximam da escala fisiológica.

As injeções i.c.v. de angiotensina II promoveram a diminuição da creatinina associada à pronunciada excreção de sódio em ratos WKy, quando comparados a SHR. Por estes resultados, demonstra-se que a angiotensina II é um potente agente dipsogênico e um componente primordial do sistema renina-angiotensina de controle da homeostase de líquido e de sódio em ratos das linhagens WKy e SHR.

A respeito do mecanismo fisiológico pelo qual a angiotensina II centralmente mediada induz aos efeitos natriuréticos, pode-se considerar primeiramente que o sistema nervoso central influencie diretamente a excreção tubular renal do sódio por meio de rotas neurais. Em segundo, que os fatores hemodinâmicos podem ser responsáveis por alterações de excreção do eletrólito. Em terceiro lugar, que a natriurese venha resultar de flutuações em nível de fatores neurais influenciando a manipulação tubular renal de sódio. Algumas evidências suportam a idéia de a associação entre o sistema nervoso simpático e o controle da excreção urinária de sódio (Dibona, 2000b e 1999). A redução do tráfego do nervo simpático ao rim poderia estar envolvida, pois a reabsorção tubular de sódio estaria aumentada em condições de estimulação dos nervos renais. Relatos precedentes afirmam que em ratos conscientes as injeções i.c.v. de angiotensina II em doses entre 1 a 100 nmol induzem a redução imediata de atividade do nervo renal eferente e de renina plasmática (Kanna et al., 1991; Iwata et al., 1984). A influência do sistema nervoso simpático sobre a função renal em animais hipertensos é um campo de pesquisa relativamente inexplorado. No entanto, algumas descrições literárias sugerem a sua participação na patogênese da hipertensão genética mediada por sua influência na função renal (Boer et al., 2005). Outros autores (Brody e Johnson, 1980; Gontijo et al., 1992) demonstraram que o aumento da atividade adrenérgica hipotalâmica promove o aumento na excreção urinária de sódio e de água, e que a angiotensina II pode

estimular os centros adrenérgicos das áreas periventriculares aumentando a pressão sanguínea, e assim a natriurese é dita secundária aos aumentos dos níveis pressóricos. Reflete-se inclusive sobre o valimento de outros fatores independentes. A pressão arterial, por exemplo, pode afetar o manuseio tubular renal do sódio, reduzindo a atividade do nervo renal e os níveis de renina secundariamente à ativação barorreceptora, aliás, seguindo-se de outros fatores físicos como a resistência vascular renal e o fluxo renal de sangue (Granger et al., 2002). Selkurt et. al. em 1965 e outros investigadores (Granger et al., 2002; Persson, 2002) propuseram que a pressão arterial elevada modifica a reabsorção de sódio com o esmaecimento de solutos medulares pelo aumento do fluxo medular. Outro (Cowley, 1997) sugeriu que o aumento do volume e/ou da pressão intersticial, devido a um gradiente hidrostático transitório de pressão através dos capilares peritubulares, impede a reabsorção tubular realçando a excreção tubular renal de sódio. Além do que, o acréscimo da pressão de perfusão e do fluxo renal de sangue aumenta a excreção de sódio, pois se o aumento fosse da resistência vascular renal o efeito seria oposto.

Entretanto, a interpretação de dados de pesquisas relacionados à excreção urinária de sódio em ratos adultos hipertensos é, inúmeras vezes, confundida pela interdependência da excreção renal de sódio e da pressão arterial aumentada. Diversos relatórios indicam que os rins de SHR requerem uma pressão arterial mais elevada que os rins de ratos normotensos para excretarem a mesma quantidade de sódio sob circunstâncias basais (Boer et al., 2005; Hall et al., 1996; Roman e Cowley, 1985). Existe outra sugestão de que sendo a pressão de perfusão glomerular reduzida à escala perto da observada em ratos normotensos a excreção urinária de sódio em SHR poderia ser muito mais afetada e reduzida (Roman e Cowley, 1985). Os resultados atuais sugerem que o *clearance* de creatinina e as respostas fracionárias de excreção de sódio resultam da interação de uma variedade de mecanismos, tais como o vasoconstrição arteriolar renal (Sofola et al., 2002), a hiperatividade do sistema nervoso simpático (Strazzullo et al., 2001) e por efeitos diretos sobre os túbulos. Deste modo, após o estímulo com 400pmol de angiotensina II, a menor excitabilidade

adrenérgica renal eferente em SHR promove a excreção urinária de sódio atenuada por conta de a constrição arteriolar e/ou o aumento da reabsorção tubular. Também, a insensibilidade central seguida à resposta natriurética não afetada indica que a ascensão na pressão de perfusão renal não ocorreu, ou mesmo não pôde exercer um papel dominante sobre a excreção do eletrólito na linhagem hipertensa.

Proposta por outros autores (Antunes-Rodrigues et al., 2004), a hipótese humoral induzida centralmente pela atividade do sistema renina-angiotensina pode mediar a natriurese, embora os dados apresentados aqui não ofereçam nenhuma sustentação para esta afirmação, mas a qual indubitavelmente deve ser mencionada. Relatos de algumas pesquisas (Antunes-Rodrigues et al., 2004; DiBona, 2000b) indicam que o distúrbio da função neurohipofisária em ratos geneticamente hipertensos contribui para o desenvolvimento hipertensivo, e sê associado aos nossos resultados, sugere-se a diminuição da regulação de órgãos alvo e/ou de resposta inapropriada, possivelmente relacionada ao aumento da atividade nervosa simpática durante a injeção intracerebroventricular. Cita-se que a administração de angiotensina II em SHR induz a natriurese alterando a concentração de hormônios circulantes, tais como a vasopressina (estimulando) (Ferguson e Bains, 1997; Coghlan et al., 1981) e a aldosterona (suprimindo) (Seltzer et al., 2004; DiBona, 2000). No entanto, as doses de angiotensina II i.c.v. necessárias para liberar a vasopressina são em escala de nmol, e a natriurese neste caso ocorreu muito rapidamente para se considerar a supressão da aldosterona. Adiante, deve ser salientada a possibilidade de atuação de mais alguns agentes natriuréticos como as prostaglandinas e o NO, além do peptídeo atrial natriurético (ANP). A resposta renal excretória ao ANP é modulada pela ação tubular resultando em baixa freqüência de estimulação, que poderia regular a absorção de fluido no túbulo proximal após a estimulação com angiotensina II (Harris et al., 1987).

Finalizando, no estudo atual, a origem exata da resposta natriurética centralmente mediada pela angiotensina II, e diferenciada entre WKy e em SHR, não pôde ser determinada com adequação somente pela injeção i.c.v de

angiotensina II. Deste modo, o mais importante está em salientar que a resposta renal a angiotensina II centralmente mediada pode ser o resultado da redução da atividade do nervo renal e de alguma mudança de efeito neuroendócrino atenuada significativamente em SHR. Ainda, mediante todas as possibilidades supracitadas, os dados aqui apresentados possibilitam, talvez, a proposta da indução de um controlador intracelular de transdução do sinal da angiotensina II, com resultados que podem implicar em mudanças de expressão da via de sinalização JAK-2/SOCS-3 em tecidos hipotalâmicos, em natriurese anormal, e na alteração da pressão sanguínea e, além disso, estar igualmente associado à diminuição da resposta dipsogênica em SHR, quando comparados aos ratos WKy.

6- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para SHR confirmam alguns relatos referentes aos efeitos natriuréticos promovidos pela estimulação central do receptor de angiotensina em ratos normotensos. A natriurese induzida pela angiotensina II é inicialmente rápida, receptor-específico e ocorre em doses abaixo do necessário para desencadear os efeitos pressóricos, de liberação humoral e de estimulação da sede.

A administração i.c.v de angiotensina II diminuiu o *clearance* de creatinina e, reciprocamente, aumentou as taxas absolutas e fracionárias de excreção tubular renal de sódio e de potássio nas duas linhagens, porém acentuadamente em WKy.

Por outro lado, se comparada à diferença de expressão de JACK-2/SOCS-3 idade-dependente, a alteração da resposta funcional renal pós-estímulo intracerebroventricular com angiotensina II sugere a disfunção das vias neurais existentes em animais SHR.

As evidências supracitadas acrescentam à idéia existente na literatura que, a angiotensina II atuando no sistema nervoso central é um instrumento para regulação da homeostase do fluido corporal. Possivelmente, a resposta neural inapropriada resulte na inabilidade do manuseio hidrossalino e, conseqüentemente, colabore com o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akine A, Montanaro M, Allen AM. Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats. *Autonomic Neuroscience* 2003; 108: 17-21.

Allen AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* 2002; 39(2):275-80.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors *Am J Hypertens* 2000; 13(1 Pt 2):31S-38S.

Allen AM, Dampney RA, Mendelsohn FA. Angiotensin receptor binding and pressor effects in cat subretrofacial nucleus. *Am J Physiol* 1988; 255 (5 Pt 2):H1011-7.

Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones. *Regul Pept* 1992;38 (2):111-20.

Andersson B, Eriksson L, Fernandez O, Kolmodin C-G, Oltner R. Centrally mediated effects of sodium and angiotensin II on arterial pressure and fluid balance. *Acta Physiol Scand* 1972; 85: 398-407.

Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004; 84(1):169-208.

Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34 (5):1112-6.

Bernstein KE, Ali MS, Sayeski PP, Semeniuk D, Marrero MB. New insights into the cellular signaling of seven transmembrane receptors: the role of tyrosine phosphorylation. *Lab Invest* 1998; 78:3-7.

Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signalling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-31.

Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 32686-95.

Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): Role of renal nerves. *Life Sci* 2005; 76(16): 1805-1815.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 ;72:248-54.

Brody MJ, Johnson AK. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balances, arterial pressure regulation and hypertension. In: Martini L, Ganong WF (Eds.), *Frontiers in Neuroendocrinology* 1980. New York: Raven Press, p 249-268.

Bunnemann B, Iwai N, Metzger R, Fuxe K, Inagami T, Ganten D. The distribution of angiotensin II AT1 receptor subtype mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 1992; 142(2):155-8.

Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Ferrario CM. Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitari. *Hypertension* 1998; 11(2 Pt 2):167-71.

Campese VM, Kogosov E. Renal afferente denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. *Hypertension* 1995; 25: 878-82.
18- Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001; 500(3):119-24.

Casto R, Phillips MI. Angiotensin II attenuates baroreflexes at nucleus tractus solitarius of rats. *Am J Physiol* 1986;250(2 Pt 2):R193-8.

Cavalcante-Lima HR, Lima HR, Costa-e-Sousa RH, Olivares EL, Cedraz-Mercez PL, Reis RO, Badaue-Passos D Jr, De-Lucca W Jr, de Medeiros MA, Cortes W da S, Reis LC. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. *Neurosci Lett* 2005; 374(1):5-10.

Coghlan JP, Considine PJ, Denton DA, Fei DTW, Leksell LG, McKinley MJ, Muller AF, Tarjan E, Weisinger RS, Bradshaw R. Sodium appetite in sheep induced by cerebral ventricular infusion of angiotensin: comparison with sodium deficiency. *Science* 198; 214: 195-197.

Cowley AW Jr. Role of the renal medulla in volume and arterial pressure regulation. *Am J Physiol* 1997; 273: R1-15.

Dampney RA, Hirooka Y, Potts PD, Head GA. Functions of angiotensin peptides in the rostral ventrolateral medulla. (review). *Clin Exp Pharmacol. Physiol* 1996; Suppl.3:S105-11.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. (review). *Physiol Rev* 1994;74(2):323-64.

DiBona GF. Nervous Kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000a;36:1083- 1088.

DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol* 2000b; 279: R1517- R1524.

DiBona GF. Central sympathoexcitatory actions of angiotensin II: role of type 1 angiotensin II receptors. (review). *J Am Soc Nephrol* 1999;10 Suppl 11:S90-4.

DiBona G.F., Kopp U.C., Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997; 77(1):75-197.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 2001; 276:47944-9.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275:15985-91.

Evert, J., Dorhout, M. History of the "lithium concept". *Kidney International* 1990; 37 (suppl 28): S2-3.

Fleegal MA, Sumners C. Angiotensin II induction of AP-1 in neurons requires stimulation of PI3-K and JNK. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310 (2):470-7.

Ferguson AV, Washburn DL, Latchford KJ. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001; 226: 85-96.

Ferguson AV, Bains JS. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. (review). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24 (1): 96-101.

Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998; 78 (3):583-686.

Fitzsimons JT, Moore-Gillon MJ. Drinking and antidiuresis in response to reductions in venous return in the dog: neural and endocrine mechanisms. *J Physiol* 1980; 308: 403-16.

Floharty SJ, Manaker S. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: I. Relation to urinary sodium excretion. *Behav Neurosci* 1983; 97: 738-745.

Garcia, EW. ; Gontijo, JAR. ; Figueiredo, JF. *Clearance* de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados, estudos em gaiolas metabólicas. *J Bras Nefrol* 1991; 13: 89-94.

Gontijo JAR, Garcia EW, Figueiredo JF, Silva-Netto CR, Furtado MRF. Renal sodium handling after noradrenergic stimulation of the lateral hypothalamus area in rats. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25: 937-942.

Gouldsbrough I, Lindop GB, Ashton N. Renal renin-angiotensin system activity in naturally reared and cross-fostered spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2003; 16(10):864-9.

Granger JP, Alexander BT, Llinas M. Mechanisms of pressure natriuresis. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4: 152-159.

Greger R. Possible sites of lithium transport in the nephron. *Kidney Int* 1990; 37 (suppl.28); 26-30.

Hagiwara Y, Ohi M, Kubo T. Cholinergic stimulation in the posterior hypothalamic nucleus activates angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area of rats. *Brain Res Bull* 2005; 15; 67 (3):203-9.

Hallback M, Isaksson O, Noresson E. Consequences of myocardial structural adaptation on left ventricular compliance and the Frank-Starling relationship in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand* 1975; 94: 259-70.

Hall JE, Guyton AC, Brands MW. Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney Int* 1996; 55: S35-S41.

Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987; 16-22; 326(6114): 697-8.

Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol* 1987; 11 (9):1266-77.

Hernandez-Vargas P, Lopez-Franco O, Sanjuan G, Ruperez M, Ortiz-Munoz G, Suzuki Y, Aguado-Roncero P, Perez-Tejerizo G, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling regulate angiotensin II-activated Janus kinase-signal transducers and activators of transcription pathway in renal cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (6):1673-83.

Holstein-Rathlou NH. - Lithium transport across biological membranes. *Kidney International* 1990; 37 (suppl.28): S4-9.

Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13 (2): 211-7.

Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26 (7):544-9.

Iwata T, Hashimoto H, Hiwada K, Kokubu T. Changes of plasma renin activity by intracerebroventricular administration of biological active peptides in conscious rats. *Clin Exp Hypertens A* 1984; 6 (5): 1055-1066.

Jackiewicz E, Szczepanska-Sadowska E, Dobruch J. Altered expression of angiotensin AT1a and vasopressin V1a receptors and nitric oxide synthase mRNA in the brain of rats with renovascular hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55(4):725-37.

Johnson AK, Epstein AN. The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 1975; 86 (3):399-418.

Judy, WV.; Farrel, SK. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1979; 1: 605-614.

Kang J, Posner P, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 1):C1389-97.

Kannan H, Nakamura T, Jin XJ, Hayashida Y, Yamashita H. Effects of centrally administered angiotensin on sympathetic nerve activity and blood flow to the kidney in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 1991; 34: 201-210.

Katahira K, Mikami H, Otsuka A, Moriguchi A, Kohara K, Higashimori K, Okuda N, Nagano M, Morishita R, Ogihara T. Differential control of vascular tone and heart rate by different amino acid neurotransmitters in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994; 21 (7): 545-56.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 15-21; 365 (9455): 217-23.

Kirchner, KA. - Effect of antidiuretic hormone on lithium as a marker for proximal tubule delivery. *Am J Physiol* 1989; 257: 899-906.

Kopp U, Bradley T, Hjemdahl P. Renal venous outflow and urinary excretion of norepinephrine, epinephrine, and dopamine during graded renal nerve stimulation. *Am J Physiol* 1983; 244 (1):E52-60.

LaGrange LP, Toney GM, Bishop VS. Effect of intravenous angiotensin II infusion on responses to hypothalamic PVN injection of biculline. *Hypertension* 2003; 42 (6):1124-9.

Lais LT, Shaffer RA, Brody MJ. Neurogenic and humoral factors controlling vascular resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 1974; 35: 764-74.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 680–685.

Latchford KJ, Ferguson AV. Angiotensin depolarizes parvocellular neurons in paraventricular nucleus through modulation of putative nonselective cationic and potassium conductances. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289 (1):R52-8.

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical (review). *Front Neuroendocrinol* 1997; 18 (4): 383-439.

Ledigham JM, Cohen RD. The role of the heart in the pathogenesis of renal hypertension. *Lancet* 1963; 2:979-985.

Lo M, Liu KL, Lantelme P, Sassard J. Subtype 2 of angiotensin II receptors controls pressure-natriuresis in rats. *J Clin Invest* 1995; 95 (3):1394-7.

Louis WJ, Tabei R, Spector S. Effects of sodium intake on inherited hypertension in the rat. *Lancet* 1971; 2: 1283-6.

Lovenberg W. Techniques for the measurement of blood pressure. *Hypertension* 1987; 9 (suppl. I): I5-I6.

Mangiapane ML, Thrasher TN, Keil LC, Simpson JB, Ganong WF. Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res Bull* 1984; 13 (1):43-7.

Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol* 1980a; 239(5):R382-9.

Marrero MB, Schieffer B, Bernstein KE, Ling BN. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation in mesangial and vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23(1):83-8.

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995; 18; 375(6528):247-50.

Matsusaka T, Nishimura H, Utsunomiya H, Kakuchi J, Niimura F, Inagami T, Fogo A, Ichikawa I. Chimeric mice carrying 'regional' targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene. Evidence against the role for local angiotensin in the in vivo feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 1996; 15; 98(8):1867-77.

May CN, McAllen RM, McKinley MJ. Renal nerve inhibition by central NaCl and ANG II is abolished by lesions of the lamina terminalis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279 (5):R1827-33.

McLean D, Kingsbury K, Costello JA, Cloutier L, Matheson S. Canadian Hypertension Education Program. Hypertension Education Program (CHEP) recommendations: management of hypertension by nurses. *Can J Cardiovasc Nurs* 2007; 17(2):10-6.

Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ, Gontijo JA. Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull.* 2002; 15;57(5):613-8.

Miyakubo H, Yamamoto K, Hatakenaka S, Hayashi Y, Tanaka J. Drinking decreases the noradrenaline release in the median preoptic area caused by hypovolemia in the rat. *Behav Brain Res* 2003; 17; 145 (1-2):1-5.

Moriguchi A, Mikami H, Otsuka A, Katahira K, Kohara K, Ogihara T. Amino acids in the medulla oblongata contribute to baroreflex modulation by angiotensin II. *Brain Res Bull* 1994; 36 (1):85-9.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282-93.

Osborn JW, Collister JP, Carlson SH. Angiotensin and osmoreceptor inputs to the area postrema: role in long-term control of fluid homeostasis and arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(5-6):443-9.

Ozaki Y, Soya A, Nakamura J, Matsumoto T, Ueta Y. Potentiation by angiotensin II of spontaneous excitatory postsynaptic currents in rat supraoptic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol* 2004; 16(11):871-9.

Patzak A, Bontscho J, Lai E, Kupsch E, Skalweit A, Richter CM, Zimmermann M, Thone-Reineke C, Joehren O, Godes M, Steege A, Hoher B. Angiotensin II sensitivity of afferent glomerular arterioles in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(12):2681-9.

Peng N, Chambless BD, Oparil S, Wyss JM. Alpha2A-adrenergic receptors mediate sympathoinhibitory responses to atrial natriuretic peptide in the mouse anterior hypothalamic nucleus. *Hypertension* 2003; 41(3):571-5.

Persson PB. Renal blood flow autoregulation in blood pressure control. *Curr Op Nephrol Hypertens* 2002; 11: 67-72.

Phillips JK. Pathogenesis of hypertension in renal failure: role of the sympathetic nervous system and renal afferents. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32(5-6):415-8.

Reid IA. Interactions between ANGII, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. (review) *Am J Physiol* 1992; 262 (6 Pt 1):E763-78.

Roman RJ, Cowley AW Jr. Abnormal pressure-diuresis-natriuresis response in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1985;248(2 Pt 2):F199-205.

Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002; 277:42394-8.

Sadoshima J. Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 1998; 82:1352-5.

Sakai K, Agassandian K, Morimoto S, Sinnayah P, Cassell MD, Davisson RL, Sigmund CD. Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. *J Clin Invest* 2007; 117 (4):1088-95.

Sayeski PP, Ali MS, Frank SJ, Bernstein KE. The angiotensin II-dependent nuclear translocation of Stat1 is mediated by the JAK-2 protein motif 231YRFRR. *J Biol Chem* 2001; 276(13):10556-63.

Schelling P, Muller S, Clauser E. Regulation of angiotensinogen in cerebrospinal fluid and plasma of rats. *Am J Physiol* 1983; 244: R466-R471.

Scheuer DA, Perrone MH. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol* 1993; 264 (5 Pt 2):R917-23.

Schor N, Ichikawa I, Brenner BM. Mechanisms of action of various hormones and vasoactive substances on glomerular ultrafiltration in the rat. *Kidney Int* 1981; 20 (4):442-5.

Schreihofe AM, Stricker EM, Sved AF. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279(1):R239-47.

Selkurt EE, Womack I, Dailey WN. Mechanism of natriuresis and diuresis during elevated renal arterial pressure. *Am J Physiol* 1965; 209: 95-99.

Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM. Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 2004; 1028: 9-18.

Shoji M, Kimura T, Ota K. Responses of atrial natriuretic peptide, vasopressin, aldosterone and renal function to intracerebroventricular infusion of angiotensin II in dogs. *Tohoku J Exp Med* 1991; 163: 187-97.

Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J.Physiol* 2002; 543(Pt 1): 255-260.

Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol* 1992; 22; 316(4):467-84.

Strazzullo P, Barbato A, Vuotto P, Galletti F. Relationships between salt sensitivity of blood pressure and sympathetic nervous system activity: a short review of evidence. *Clin Exp Hypertens.* 2001; 23(1-2):25-33.

Sunn N, McKinley MJ, Oldfield BJ. Circulating angiotensin II activates neurones in circumventricular organs of the lamina terminalis that project to the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neuroendocrinol* 2003; 15(8):725-3.

Szczepanska-Sadowska E. Neuropeptides in neurogenic disorders of the cardiovascular control. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 11:31-53.

Tanaka J, Fujisawa S, Nomura M. GABAergic modulation of the ANG II-induced drinking response in the rat medial preoptic nucleus. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76(1):43-51.

Thomsen K. Lithium *clearance*: a new method for determining proximal and distal reabsorption of sodium and water. *Nephron* 1984; 37: 217.

Thomsen, K. Lithium *clearance* as measure of sodium and water delivery from the proximal tubules. *Kidney International* 1990; 37 (suppl 28):s10 -s16.

Thomsen K, Shirley DG. The validity of lithium clearance as index of sodium and water delivery from the proximal tubules. *Nephron* 1997; 77: 125-138, 1997.

Torsoni MA, Carvalheira JB, Calegari VC, Bezerra RM, Saad MJ, Gontijo JA, Velloso LA. Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus - a mechanism for desensitization of AngII signaling. *J Endocrinol* 2004; 181:117-28.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76 (9):4350-4.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. *Circ Res* 1981; 48: 309-19.

Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization of AT2 angiotensin II receptors in rat anterior cerebral arteries. *Am J Physiol* 1991; 261(3 Pt 2):H667-70.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004; 24:5434-46.

Udenfreind S, Spector S. Spontaneously hypertensive rat. *Science* 1972; 176: 1155-6.

Unger T, Horst PJ, Bauer M, Demmert G, Rettig R, Rohmeiss P. Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats. *Brain Res* 1989; 1 486(1):33-8.

Veerasingham SJ, Raizada MK. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol* 2003; 39(2):191-202.

Venema RC, Venema VJ, Eaton DC, Marrero MB. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem* 1998; 273: 30795-800.

Xu Z, Xinghong J. Drinking and Fos-immunoreactivity in rat brain induced by local injection of angiotensin I into the subfornical organ. *Brain Res* 1999; 817: 67-74.

Yamori Y, Matsumoto M, Yamabe H, Okamoto K. Augmentation of spontaneous hypertension by chronic stress in rats. *Jpn Circ J* 1969; 33: 399-409.

Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J Jr, Chien KR. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest* 2001; 108 (10):1459-67.

Zhang J, Pratt RE. The AT2 receptor selectively associates with Gi alpha2 and Gi/alpha3 in the rat fetus. *J Biol Chem* 1996; 271(25):15026-33.

Zhuang H, Patel SV, He TC, Sonstebly SK, Niu Z, Wojchowski DM. Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of Jak2. *J Biol Chem* 1994; 269(34):21411-4.

Zhu F, Liao YH, Li LD, Cheng M, Wei F, Wei YM, Wang M. Target organ protection from a novel angiotensin II receptor (AT1) vaccine ATR12181 in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 107-114.

Zhuo JL, Li XC. Novel roles of intracrine angiotensin II and signalling mechanisms in kidney cells. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2007; 8(1):23-33.

Zicha J, Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 1999; 79: 1227-8.

8- ANEXOS

8.1- Tabelas

A- Expressão protéica de JAK-2

% JAK-2			
(n=5)	4 semanas	8 semanas	12 semanas
<i>WKy</i>	100±0,0	100± 0,0	100±0,0
<i>SHR</i>	118,0±1,24*	103,5±2,12*	99,5±2,12

B- Expressão protéica de SOCS-3

% SOCS-3			
(n=5)	4 semanas	8 semanas	12 semanas
<i>WKy</i>	100±0,0	100±0,0	100±0,0
<i>SHR</i>	103,5±2,12*	109,0±1,41*	115,0±4,24*

C- Associação protéica entre SOCS-3 e JAK-2

% SOCS-3/ JAK-2			
(n=5)	4 semanas	8 semanas	12 semanas
<i>WKy</i>	100±0,0	100±0,0	100±0,0
<i>SHR</i>	112,5±3,53*	122,5±3,54*	143,5±4,95*

D - Medida indireta de pressão arterial em WKy e SHR pré e pós-desenvolvimento hipertensivo

	Pressão Arterial (mmHg)		
(n=5)	4 semanas	8 semanas	12 semanas
<i>WKy</i>	112,2±3,7*	112,2±4,4*,a	112,0±5,9*,a
<i>SHR</i>	120,8±1,7	152,6±4,0	178,4±3,5

E- Curva dose-resposta ingestão hídrica (ml) pós-estímulo com angiotensina II i.c.v

(n=10)	<i>015MNaCL</i>	40pmol	400pmol	4nmol	40nmol
WKy	1,20±0,15	5,50±0,28*	10,0±0,45*	13,10±0,82*	10,50±0,65*
SHR	0,45±0,28	2,30±0,61*	6,33±0,43*	8,93±0,59*	11,82±0,71*

F- 30 minutos de ingestão hídrica (ml/100g p.c.) pós-estímulo com 400pmol de angiotensina II i.c.v. em animais WKy e SHR de 12 semanas

(n=5)	WKy	SHR
	3,92±0,30*	2,90±0,20*

G- Clearance de creatinina (CCr)

CCR	WKy	SHR
(n=10)		
basal	137,84±24,86	135,39±16,33
30	37,47±5,28*,a	83,03±26,99a
60	63,04±7,75*,a	104,08±2,13a
90	90,67±18,20a	90,55±6,87a
120 min	89,15±27,32a	111,47±19,83a

H- Fração de excreção renal de sódio (FENa)

FENA	WKy	SHR
(n=10)		
basal	0,10±0,06*	0,25±0,07
30	1,51±0,49a	1,31±0,49a
60	1,38±0,45*,a	0,44±0,26a
90	0,94±0,26*,a	0,30±0,05 a
120 min	0,23±0,08a	0,34±0,26

I- Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa)

FEPNa	WKy	SHR
(n=10)		
basal	8,48±3,20	7,96±1,11
30	31,67±6,96a	27,25±4,15a
60	39,63±6,30a	34,34±6,30a
90	27,02±6,92a	15,90±5,96a
120 min	5,76±1,50	10,11±3,10

J- Fração de excreção renal de potássio (FEK)

FEK	WKy	SHR
(n=10)		
basal	2,29±0,42*	8,46±2,64
30	28,48±12,61*,a	66,36±17,79a
60	20,51±11,50a	19,54±5,92a
90	8,89±4,71*,a	16,99±5,31a
120 min	6,94±1,63*,a	18,34±6,19a

K- Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa)

FEPPNa	WKy	SHR
(n=10)		
basal	1,07±0,29	2,26±0,35*
30	7,91±1,45a	4,76±1,97a
60	5,35±1,07*,a	2,84±1,45
90	4,61±1,05*,a	2,39±0,36
120 min	3,29±0,75a	2,07±1,23

8.2- Artigo

Expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in Spontaneously Hypertensive Rat hypothalamus: effect on renal sodium excretion induced by Angiotensin II

Running Title: SOCS-3 Expression and Natriuresis Induced by Angiotensin II in
SHR

Adriana Zapparoli, Vivian C Calegari, Lício A Velloso and José A R Gontijo

Disciplina de Medicina Interna, Laboratório de Metabolismo Hidro-Salino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamentos de Clínica Médica e Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-592 Campinas, SP, Brazil.

Correspondence:

J.A.R. Gontijo, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-592 Campinas, SP, Brazil.

Phone: 55-19-3521 8924; FAX: 55-19-3521 8925

E-mail: gontijo@fcm.unicamp.br

Abstract

There is a surprising lack of experimental data on the renal sodium handle mechanisms induced by i.c.v. injection of AngII in hypertensive animals. Thus, we hypothesized that a presumable blunted response to centrally-injected AngII may contribute to sodium metabolism disturbances observed in SHR. The study was performed after acute i.c.v. AngII administration on tubular sodium handling, evaluated by lithium clearance, in conscious, unrestrained rats and their sham-operated appropriate WKy controls. The present series of experiments was also designed to investigate the possible involvement of SOCS-3 expression in AngII-induced control of water ingestion in SHR hypothalamus. Our results confirm earlier reports on the potent natriuretic effects of central AngII receptor stimulation. The i.c.v. application of AngII significantly decreased C_{Cr} and reciprocally promotes increased absolute and fractional excretion rates of sodium and potassium in both WKy and SHR animals. The magnitude of the renal response to AngII was significantly greater in WKy rats than in SHR. The enhancement of renal function following the centrally-applied AngII in WKy rats, as compared with SHR associated with age-related difference in JACK-2/SOCS-3 expression, suggests that a dysfunction in the angiotensin neural pathways exists in SHR. Our findings lend further support to the idea that AngII in CNS is instrumental in the regulation of body fluid homeostasis. Speculatively, it may be suggested that one of the inappropriate CNS AngII pathway response defects may result in the inability of renal tubules to handle the hydrosaline balance, consequently contributing to the development of arterial hypertension in genetically-hypertensive rats from Kyoto.

Keywords: Arterial hypertension; central nervous system; angiotensin II; SOCS-3, SHR, kidney function; natriuresis; lithium clearance

Introduction

The role of the central nervous system (CNS) in the control of blood pressure and hydrosaline homeostasis has been remarkably demonstrated by several studies [1-3]. Angiotensin II (AngII) an octapeptide product of the cleavage of angiotensin I by angiotensin converting enzyme, plays an important role in the control of water, salt balance and blood pressure. It acts by specifically binding and activating at least two well characterized transmembrane G-protein-coupled receptors belonging to the seven spanning transmembrane receptor family, angiotensin receptor 1 (AT1) and angiotensin receptor 2 (AT2) [4]. Several areas of the central nervous system (CNS) express receptors for AngII, and most of the actions of AngII, such as increase in blood pressure, drinking, release of vasopressin from the pituitary gland or suppression of renin release from the kidney, occur through the induction of a brain response. Cell bodies at the subfornical organ (SFO), hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), medial preoptic lateral nucleus (MPO), anterodorsal preoptic nucleus (ADP) and organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) express high concentrations of AT1, which respond rapidly to an AngII stimulus [5]. Neurons from supra optic nucleus (SON) also express AT1, but at lower concentrations than SFO, PVN, MPO and OVLT. Most studies conclude that centrally-administered AngII induces thirst by activating AT1 receptors in neurons of the preoptic (MPO and ADP) and OVLT areas [6]. In addition, the central AngII receptors, mainly AT2, are localized in the brain tissues outside and within the blood-brain barrier, thus allowing the brain to monitor and respond to both circulating and cerebrospinal fluid levels of AngII [7]. While circulating AngII tends to retain sodium by a direct renal action [8] as well as through aldosterone release from the adrenal gland, stimulation of brain AngII receptors has been reported to induce natriuresis [9-11].

Different central intracellular pathways participate in the transduction of the AngII signal in target cells. We have previously demonstrated the participation of JAK-2 activation [18], an intracellular kinase commonly engaged by receptors belonging to class I and class II cytokine receptor families, which rapidly direct the

signal towards the nucleus through the signal-transducer-and-activator of-transcription (STAT) proteins [19,20]. A family of proteins named SOCS (suppressor of cytokine signaling) have been characterized and shown to participate in the medium- and long-term control of ligand-induced receptor activation [21,22]. SOCS proteins are under the transcriptional control of members of the STAT family [23]. In a recent study, it was demonstrated that AngII is capable of inducing SOCS-3 expression in heart and brain, which in turn, modulate AngII-induced c-jun expression and, block further activation of the pathway, consequently leading to desensitization to AngII stimuli with regard to its dipsogenic effect [18,24].

In the dog and normotensive rats, this acute central natriuretic action of AngII appears to be independent of the hemodynamic effects of the peptide [12], whereas in the genetically hypertensive models this relationship has not yet been investigated. The spontaneously hypertensive rat (SHR) has been widely used as an animal model of essential hypertension. It has been demonstrated that SHR possess a hyperactive brain system renin-angiotensin (RAS), as compared to their normotensive counterpart, Wistar-Kyoto rats (WKy) [13,14]. Although the precise mechanism by which blood pressure rises in the SHR strain remains to be elucidated, renal control of the fluid and electrolyte balance is thought to play a dominant role in long-term control of arterial blood pressure. Sodium metabolism disturbances appear to be important in the pathogenic process in the Okamoto-Aoki strain of spontaneously hypertensive rats (SHR), since chronic consumption of excess sodium increases, whereas sodium restriction generally attenuates hypertension in this species [15]. Previous balance studies [16] examining urinary sodium excretion during 3 to 7-week periods provide evidence of renal dysfunction in genetically hypertensive young. We have confirmed previous data showing pronounced natriuretic response to central-hypertonic saline stimuli but also demonstrated that the fractional sodium excretion responses diminished as graded NaCl concentrations were increased in WKy rats, but not in SHR [17].

Thus, we hypothesized that a presumable attenuated natriuretic response to centrally-injected AngII may contribute to sodium metabolism disturbances observed in SHR. To test this hypothesis, the present study evaluates the influence of central AngII injection, in increasing concentrations, on water intake and a single dose of AngII on urinary sodium handling in SHR; these data were compared with those of age-matched normotensive WKy rats. The study was performed after acute i.c.v. AngII administration on tubular sodium handling, evaluated by lithium clearance, in conscious, unrestrained rats and their sham-operated appropriate WKy controls. The present series of experiments was also designed to investigate the possible involvement of SOCS-3 expression in AngII-induced control of water ingestion in SHR hypothalamus.

Materials and Methods

Animals and surgical procedures

The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. The renal tests were conducted on age-matched, male offspring of sibling-mated SHR and randomly outbred WKy (aged 12 weeks after weaning). Our local colonies originated from breeding stock supplied by the University of Campinas Animal Breeding Center, Campinas, SP, Brazil. Male Wistar-Kyoto (WKy) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) (250-320 g) from the University of Campinas Animal Breeding Center were chronically instrumented with an i.c.v. guide cannula, and kept under controlled temperature (25°C), lighting conditions (07:00h to 19:00h) in individual metabolic cages, with free access to tap water and standard laboratory rodent chow (Purina rat chow: Na content: $135 \pm 3 \mu\text{Eq/g}$; K content: $293 \pm 5 \mu\text{Eq/g}$) seven days before the experiments. Briefly, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body wt, i.p.) and, after loss of corneal and pedal reflexes, were positioned on a Stoelting stereotaxic apparatus. A 23-gauge guide stainless steel cannula with indwelling 30-gauge

obturator was stereotaxically implanted into the lateral cerebral ventricle (LCV) using previously-reported techniques and pre-established coordinates: anteroposterior, 0.2 mm from bregma, lateral 1.5 mm and vertical -2.8 mm [25]. Rats were allowed a one-week recovery before testing for cannula patency and position. Cannulas were considered patent and correctly positioned if a dipsogenic response was elicited after AngII injection [26]. Tail arterial pressure was estimated one day before the renal test, in conscious restrained rats by the tail-cuff method, using an electrospphygmomanometer (Narco Bio-System, Austin, TX, USA). This indirect approach permits repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975) compared to direct intra-arterial recording [27]. The renal function tests were performed at 12-14 weeks of age in conscious, unrestrained SHR and WKy rats. In order to evaluate the influence of intracerebroventricular (i.c.v.) administration of angiotensin II (AngII) on tubular sodium handling, the rats were randomly assigned to one of two separate groups (SHR, WKy). Fourteen hours before the renal test, 60 $\mu\text{mol LiCl} / 100\text{g}^{-1}$ body weight was given by gavage. After an overnight fast, each animal received a load of tap water by gavage (5% of the body weight), followed by a second load of the same volume 1-hour later. Thirty minutes after the second load (control period), 0.15M NaCl or 400 pmol AngII was i.c.v. microinjected in the volume of 3 μl with a 10- μl Hamilton microsyringe and spontaneously voided urine was collected over four periods of 30 min into a graduated centrifuge tube. At the end of the experiment, blood samples were drawn through the cardiac puncture in anesthetized rats and urine and plasma samples were collected for analysis.

Protocols for AngII-thirst induction evaluation

Before experiments, the animals' (WKy and SHR animals) water supply was removed from the home cage. The indwelling obturator was replaced by a 30-gauge stainless steel injector at the end of a PE-10 tubing connected to a 10 μl Hamilton syringe entirely loaded with test solution. Immediately thereafter,

AngII (at the doses stated in Fig.1 for dose–response evaluation, in 3 µl saline for the remaining experiments) or a similar volume of saline (vehicle) was injected into the lateral ventricle. To examine the thirst-induced effect after i.c.v. AngII administration, rats were randomly assigned to one of the following protocol groups: (a) single-dose saline injection: rats received 3 µl saline and the volume of water consumed was measured during the next 30 min; (b) single-dose AngII (at 40 pmol to 40 nmol) injection: rats received 3 µl AngII and the volume of water consumed was measured during the next 30 min.

Western blot

Tissue extraction, immunoprecipitation and immunoblotting were performed as previously described (24). Briefly, WKy and SHR rats of 4, 8 and 12-weeks old that were not chronically instrumented with an i.c.v. guide cannula or treated with saline or AngII, were anesthetized and subjected to craniotomy. Hypothalami were obtained and homogenized in freshly prepared ice-cold buffer (1% Triton X-100, 100mM Tris, pH 7.4, 100mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM PMSF and 0.01mg aprotinin/ml). Insoluble material was removed by centrifugation (10000g) for 25min at 4°C. Aliquots of the resulting supernatants containing 2.0mg total protein (protein determination by the Bradford method) [28] were used for immunoprecipitation with specific antibodies at 4°C overnight, followed by addition of Protein A Sepharose 6MB for 2h. The pellets were washed three times in ice-cold buffer (0.5% Triton X-100), 100mM Tris, pH 7.4, 10mM EDTA and 2mM sodium vanadate), and then resuspended in Laemmli sample buffer [29] and boiled for 5min prior to SDS-PAGE in a miniature slab gel apparatus (Bio Rad). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90min at 120V (constant). The nitrocellulose transfers were probed with specific antibodies. The blots were subsequently incubated with [¹²⁵I] protein A. Results were visualized by autoradiography using pre-flashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed

autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD, USA). For immunoblotting of total protein extracts, 0.2mg total protein were suspended in Laemmli sample buffer, boiled for 5min and loaded onto the electrophoresis gel. SDS-PAGE, electrotransfer and blot followed the same steps as described above for immunoprecipitation. To ensure equal loading, membranes were stained with the Coomassie Brilliant Blue dye before blotting. Only homogeneously-stained membranes were employed in the study.

Antibodies and chemicals

SDS/PAGE and immunoblotting reagents were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Hepes, PMSF, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, AngII and BSA (fraction V) were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), 125I-Protein A and nitrocellulose membranes were from Amersham Corp. (Aylesbury, Bucks, UK). Antibodies against JAK-2 (rabbit polyclonal, sc-7229, for immunoprecipitation), and SOCS-3 (rabbit polyclonal, sc-9023, for immunoprecipitation and immunohistochemistry) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Secondary antibodies and conjugated complexes utilized in immunohistochemistry were from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA). Pentobarbital Sodium was from Cristália (São Paulo, Brazil).

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean \pm S.D. of the indicated number of experiments. Plasma and urine sodium, potassium and lithium concentration were measured by flame photometry (Micronal, B262, São Paulo, Brazil), while creatinine concentrations were determined spectrophotometrically (Instruments Laboratory, Genesys V, USA). Creatinine clearance was used to

estimate glomerular filtration rate (GFR) and lithium clearance (C_{Li}) was used to assess proximal tubule output [16,17,25]. Fractional sodium excretion (FE_{Na}) was calculated as $C_{Na}/C_{Cr} \times 100$, where C_{Na} is sodium clearance and C_{Cr} is creatinine clearance. The fractional proximal (FEP_{Na}) and post-proximal ($FEPP_{Na}$) sodium excretion were calculated as $C_{Li}/C_{Cr} \times 100$ and $C_{Na}/C_{Li} \times 100$, respectively. Data obtained over time were analyzed using appropriate ANOVA. *Post hoc* comparisons between selected means were performed with Bonferroni's contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two means within or between groups were carried out using a Student's *t* test. A *P* value < 0.05 was considered significant. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (ScionCorp). The Tukey-Kramer test (ANOVA) was used for statistical analysis. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Dose-response curve to AngII-induced water intake response

To evaluate the participation of AngII signaling pathways in the hypothalamic control of water intake response, a protocol of thirst induction to the AngII stimuli was developed. Intracerebroventricular AngII injections (40 and 400 pmol and 4 and 40 nmol) dose-dependently increase water consumption over 30 minutes in WKy and SHR rats (see Fig. 1). The effects of AngII increasing water consumption were significantly higher in WKy rats when compared to SHR animals ($P < 0.001$) (see Fig. 1). After dose-response experiments, a dose of 400 pmol AngII was elected as optimal for the rest of the study. A single dose of saline injected i.c.v. (protocol in Materials and Methods, Protocols for AngII-thirst induction evaluation) led to a mean volume of 0.35 ± 0.18 and $0.16 \pm 0.10 \text{ ml} \cdot 100^{-1} \text{ b.w.}$ ($n = 5$ for each group) of water consumption over 30 minutes, respectively, to WKy and SHR, while a single dose of AngII

(400pmol) promoted the consumption of 3.92 ± 0.3 and 2.9 ± 0.2 ml.100⁻¹b.w. of water in 30 min, respectively, to WKy and SHR ($n= 5$, $P \leq 0.05$ for each group).

Age-dependent JAK-2 and SOCS-3 hypothalamic expression in WKy rats and SHR

The experiments studying the capacity of WKy and SHR hypothalamus to express the JAK-2 and SOCS-3 proteins were followed-up and performed on the last day of 4, 8 and 12 weeks of age in unanesthetized, unrestrained rats. The hypothalami of SHR and WKy rats were obtained and homogenized in protein extraction buffer. Protein extracts containing 2.0mg total protein were employed in immunoprecipitation experiments utilizing anti-JAK-2 antibodies. Immunocomplexes were captured by Protein A-Sepharose and resolved in SDS-PAGE. Nitrocellulose transfers were blotted with anti-SOCS-3 antibodies. The evaluation of age-dependent JAK-2 and SOCS-3 expressions in hypothalami extracts by immunoblot of total extracts resulted, respectively, in a significant time-dependent decrease in JAK-2 protein, accompanied by an enhance in detectable SOCS-3 bands in SHR with no appreciable difference, for both proteins, for the WKy strain during the same time period (Fig. 2A and 2B). Additionally, as shown in Fig. 2C, the SOCS-3/JAK-2 association increased significantly from 4 to 12 weeks of age only in the SHR strain ($P \leq 0.05$).

I.C.V. AngII-induced changes on renal function in WKy rats and SHR

Figures 3 and Table 1 show the effects of i.c.v. 400pmol AngII or 0.15M NaCl microinjection on renal Na⁺ and K⁺ handling, tail blood pressure levels and water intake per 100-g b.w in SHR and WKy rats, expressed as means \pm SD. All rats survived and were clinically healthy up to the sixth day after a cannula was positioned in the LCV. The tail arterial pressure in SHR appeared to reach a plateau after 12 weeks of age. As shown in Figure 3E and Table 1, in 12-week old

rats tail arterial pressure averaged 180.6 ± 8 mmHg in SHR and 117 ± 10 mmHg in WKy ($p < 0.01$). The water intake after saline or 400 pmol AngII was similar in the SHR compared to age-matched normotensive strain. There were no significant differences between the serum sodium, potassium, and lithium levels (Table 1) in the groups.

The data for renal function and renal sodium handling are summarized in Fig. 3. The urinary flow rates (data not shown) and the glomerular filtration rate estimated by C_{Cr} immediately after AngII injection decrease significantly in both animals. These decreases were significantly greater among the SHR group, when compared with the studies of renal tubule sodium handling in normotensive rats (Fig. 3A).

The i.c.v. microinjection of 400 pmol AngII time-dependently increased the FE_{Na} from the 30th to 90th experimental minute in WKy rats, but just transiently at thirty minutes in the genetic hypertensive strain (Fig 3B). Conversely, this increased urinary sodium excretion was followed by a pronounced and maintained enhance of the FE_K in SHR over the entire experimental period, compared with a smaller increase in WKy rats. The increased AngII-induced FE_{Na} in WKy rats was accompanied by a significant fall in post-proximal sodium reabsorption compared with the SHR-injected rats (Fig. 3d). This decrease occurred in direct association with a parallel fall in C_{Cr} , despite an unchanged FEP_{Na} (Fig. 1A, C). Likewise, the C_{Cr} , higher natriuresis and kaliuresis responses to i.c.v. 400 pmol AngII injection in WKy rats were blunted in SHR ($P < 0.025$) (see Fig 3). This blunted urinary ion excretion response to AngII in SHR compared to normotensive rats, was associated with a significant changed tubule proximal and post-proximal sodium handling (Fig. 3D). This is further highlighted by the significant differences in fractional sodium excretion during the same concentration-response stimuli (Fig. 3B). The consistently small FE_{Na} response produced by i.c.v. AngII injection in SHR, surprisingly, was not followed by a similar fall in kaliuresis responses for hypertensive strain (Fig. 3F).

Discussion

Many investigators, studying mammalian species, have demonstrated that administration of angiotensin into the cerebral ventricles elicit a large increase in renal sodium excretion [9,10]. Intracerebroventricular injection of AngII also results in increased water intake, vasopressin secretion, and higher arterial blood pressure [11]. The present study was designed to evaluate the age-related JAK-2/SOCS-3 protein expression and transduction in hypothalamus, and to observe the influence of central AngII administration on spontaneous water consumption in a concentration-dependent fashion. The effect of AngII administration, at a single-dose, on urinary sodium handling was also monitored, as determined by lithium clearance in Okamoto-Aoki rats compared with appropriate age-matched WKy control subjects. In the present experimental model, a sustained age-related increase in the level of SOCS-3 expression was observed, as well as in the JAK-2/SOCS-3 association; this was accompanied by decreased JAK-2 activity in the hypothalamus area of SHR with no significant changes in WKy proteins expression.

It has been demonstrated that SHR possess a hyperactive brain renin-angiotensin system (RAS), as compared to their normotensive counterpart, Wistar-Kyoto rats [30]. For instance, SHR has an increased turnover of brain angiotensin, an enhanced pressor and drinking responsiveness to i.c.v. applied AngII and a greater hypotensive response to central, but not peripheral administration of AngII competitive antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitor [31-33]. The dysfunction of the brain RAS in SHR has been suggested to contribute to the pathogenesis of hypertension in this strain [30,34]. In the present report, the sustained hypothalamus age-related increase in SOCS-3 expression and JAK2/SOCS-3 association may reflect the central hyperactivity of RAS in SHR. While circulating AngII tends to retain sodium by a direct renal action [8], as well as through aldosterone release from the adrenal gland, stimulation of brain AngII receptors has been reported to induce natriuresis [9,10]. In the present study, the hypothalamic time-dependent reduction in the JAK-2 expression may suggest

AngII pathway desensitization in response to AngII hyperactive brain stimulus, a well-known physiological phenomenon triggered by AngII [6,18]. In this case, we may suggest that cellular regulation of signalling inputs must be coordinated in such a way that over exposure of a given tissue to an extra-cellular signal does not lead to a progressive and uncontrolled response. Several systems participate in the control of signal transduction. Serine and threonine kinases or phosphatases may act to enhance and suppress signal transduction [35], whilst phosphoinositide phosphatases such as SHIP1 and SHIP2 modulate the signaling cascades that depend on phosphorylated membrane phosphoinositide [36,37]. In contrast to enzymatic interference, some systems may be regulated by physical blockade of the signal transducers' functional sites. This seems to be the case for members of the SOCS family. The SOCS protein family is composed of eight members (CIS and SOCS-1 to SOCS-7) [38,39], all of them possessing a common structure that displays a variable N-terminal region, a central SH2 domain, and a C-terminal tail, named the SOCS box motif [40] that assures protection for SOCS proteins against ubiquitination and proteasomic driven degradation, thus extending the half life of the protein complex and allowing for longer blockade. SOCS proteins act by targeting members of the JAK family and interfering with downstream steps of their signaling cascade. Although the precise mechanism by which blood pressure rises in the SHR strain remains to be elucidated, renal control of the fluid and electrolyte balance is thought to play a dominant role in long-term control of arterial blood pressure. The present data may suggest that induction of an intracellular signal transduction controller, providing findings that may imply change in central JAK-2/SOCS-3 expression with the abnormal natriuresis and blood pressure in SHR and also associated with the decreased dipsogenic response, compared to WKy rats.

The present study confirmed that AngII, when microinjected into the lateral brain ventricle of conscious rats produced a marked natriuretic response in normotensive and hypertensive rats (Fig. 3) associated with a rise in post-proximal sodium excretion in both strains. There are three main features of our study which extend previous observations with regard to the 400 pmol AngII-induced

natriuresis. First, the attenuated natriuretic response in the hypertensive strain, secondly, the associated renal and consumption water AngII-induced effects and, thirdly, the independency of the glomerular filtration effect and natriuresis. Previous studies in normotensive rats have demonstrated that the urinary sodium excretion was already increased in the first 5-min urine fraction collected after the centrally-administered AngII [12,41]. In addition, the data collected at sixty minutes after AngII injection showed that urinary sodium excretion was still considerably increased, confirming our observations. In these studies, AngII was observed to induce first water drinking and, later, a preferential sodium appetite. The latter was reported to occur also in anephretic animals [41]. In the present study, the natriuretic response was already induced by i.c.v. injections of peptide in *pmol* amounts, i.e. well below the doses required to elicit drinking, blood pressure increases or release of hypophyseal hormones under the same experimental conditions. In a study by Schelling et al. (1983), AngII concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) of rats were reported as 29.5 ± 5.9 fmol/ml. Assuming a distribution volume close to 200 μ l, the AngII concentrations in the CSF, produced by natriuretic i.c.v. dose of peptide in our study, approached the physiological range. Our results clearly demonstrate that i.c.v. injections of 400 pmol of AngII resulted in a marked decrease in creatinine clearance, associated with lasting and pronounced urinary sodium excretion in WKy rats when compared to SHR. Similarly, the dipsogenic effect of AngII was small in the hypertensive strain. These observations are consistent with previous studies showing that AngII is a potent dipsogenic agent in normotensive animals and an active component of the central renin-angiotensin system controlling body fluid and sodium homeostasis in WKy rats as well in SHR.

The mechanism by which central AngII induces its natriuretic effects remains to be elucidated. Several possibilities may be considered. First, the central nervous system may directly influence renal sodium excretion through neural routes. Secondly, hemodynamic factors may be responsible for the alterations in electrolyte excretion. Thirdly, the natriuresis may result from fluctuations in the level of neural-borne factors which influence sodium tubule handling.

There is considerable evidence supporting a role of the sympathetic nervous system in the control of urinary sodium excretion [3]. A reduction in sympathetic nerve traffic to the kidney could be involved, since tubule sodium reabsorption can be increased by stimulation of renal nerves. A previous study reported that, in conscious rats, i.c.v. injections of AngII at doses between 1 to 100nmol induce an immediate reduction in efferent renal nerve and plasma renin activity [43]. The influence of the sympathetic nervous system on renal function in hypertensive animals, is a relatively unexplored field of research. Results of several investigations suggest that the involvement of the sympathetic nervous system in the pathogenesis of genetic hypertension may be mediated, at least in part, by its influence on renal function [16]. It is assumed that the neurons reacting to the AngII are situated in the vicinity of the third ventricle, possibly in the hypothalamus. Authors have demonstrated that adrenergic hypothalamic activity elicited an increased urinary sodium and water excretion [2,3]. Thus, AngII might stimulate adrenergic centers in the periventricular areas and increase blood pressure.

The exact origin of the centrally-mediated different natriuretic response in WKy and SHR cannot be adequately determined by intraventricular injection. It is known that arterial pressure, as an independent factor, may affect renal sodium handling. Other physical factors such as renal vascular resistance and renal blood flow can also influence renal handling of sodium [44]. Selkurt *et al.* (1965) and other researchers [44,45] proposed that elevated arterial pressure might impair sodium reabsorption through a washout of medullary solutes by increased medullary blood flow. On the other hand, some authors [46] have suggested that an increase in interstitial volume and/or pressure due to a transient hydrostatic pressure gradient across the peritubular capillaries could impede tubular reabsorption and enhance sodium excretion. Thus, increased perfusion pressure and renal blood flow may enhance sodium excretion, whereas increased renal vascular resistance may have the opposite effect. Interpretation of research on urinary sodium excretion in adult hypertensive rats is puzzling due to the interdependency of renal salt excretion and increased arterial pressure. Several reports indicate that SHR kidneys require higher arterial pressure than kidneys of

normotensive rats to excrete the same amount of salt under basal conditions [16,47]. The present findings are consistent with the view that the reciprocal creatinine clearance and fractional sodium excretion responses may result from the interactions of a variety of mechanisms, such as renal arteriolar vasoconstriction [48], hyperactivity of the sympathetic nervous system [49] and by direct tubule effects. Thus, an efferent renal adrenergic overexcitability in SHR could be less depressed after intraventricular AngII stimuli, promoting an attenuated urinary excretion of salt by eliciting arteriolar constriction and/or enhancing tubular reabsorption. In addition, the observed central attenuated natriuretic responses to 400pmol AngII injection in SHR may imply that the rise in renal perfusion pressure did not occur through (or may not exert a predominant role in) electrolyte excretion in hypertensive rats. Although the data presented here do not offer any support for the humoral hypothesis, we cannot rule out the possibility that several humoral factors, induced by centrally RAS activity, may be involved in mediating the natriuresis observed in the present study. Taking these data together with the present results, we may interpret them as the down regulation of target organs and/or inappropriate decrease in responsiveness, possibly related to increased sympathetic nerve activity during i.c.v. AngII administration in SHR. AngII could also induce natriuresis by altering the concentration of circulating hormones, such as vasopressin, oxytocin and aldosterone [9,11], since the former can be stimulated and the latter suppressed by central AngII. Vasopressin, however, may not be involved in this phenomenon since the i.c.v. doses of AngII required to release this hormone are in the *nmol* range, similarly, with aldosterone, AngII-induced natriuresis occurs too rapidly to be accounted for by aldosterone suppression. A forth hormone which needs to be considered in this regard is atrial natriuretic peptide (ANP), although there are no reports, as yet, that central AngII releases ANP from the heart. Finally, according to studies in dogs by Buckley et al. [50], central AngII may release a natriuretic Na-K ATPase inhibition factor. These observations suggested that the renal response to central AngII may result from reductions in renal nerve activity and associated changes in neuroendocrine effect, which in turn, were significantly attenuated in SHR.

In summary, our results confirm earlier reports on the potent natriuretic and dipsogenic effects of central AngII receptor stimulation. Our findings lend further support to the idea that AngII in CNS is instrumental in the regulation of body fluid homeostasis. The i.c.v. application of AngII significantly decreased C_{Cr} and reciprocally promoted increased absolute and fractional excretion rates of sodium and potassium in both WKy and SHR animals. The magnitude of the renal response to AngII was significantly greater in WKy rats than in SHR. The diverse renal response following the centrally-applied AngII in WKy rats, as compared with SHR when associated with age-related decrease in JACK-2/SOCS-3 expression, may suggest that a dysfunction in the angiotensin neural pathways exists in SHR. Speculatively, it seems that CNS inappropriate AngII pathway expression defects may result in the inability of renal tubules to handle the hydrosaline balance, consequently contributing to the development of hypertension in genetically-hypertensive rats from Kyoto.

Acknowledgments:

Grants from CNPq (No.500868/91-3), CAPES and FAPESP (06/52431-1) supported this work. The authors wish to thank Ms. Elizabeth C. Cambiucci for expert technical assistance.

Conflict of interest

We may affirm that there is no conflict of interest.

References

1. Gontijo JAR, Garcia WE, Figueiredo JF, Silva-Netto CR, Furtado MRF. Renal sodium handling after noradrenergic stimulation of the lateral hypothalamus area in rats. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25:937-942.
2. McCann SM, Franci CR, Favaretto ALV, Gutkovska J, Antunes-Rodrigues J. Neuroendocrine regulation of salt and water metabolism. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30:427-441.
3. DiBona GF. Nervous Kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000; 36:1083-1088.
4. Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999; 26:544-549.
5. Bunnemann B, Iwai N, Metzger R, Fuxe K, Inagami T, Ganten D. The distribution of angiotensin II AT1 receptor subtype mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 1992; 142:155-158.
6. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998; 78:583-686.
7. Kakar SS, Riel KK, Neill JD. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 688–692.
8. Hall JE, Brands MW. The renin-angiotensin-aldosterone systems. In: Seldin DW, Giebisch G, eds. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, Chapter 40.

9. Coghlan JP, Considine PJ, Denton DA, Fei DTW, Leksell LG, McKinley MJ, Muller AF, Tarjan E, Weisinger RS, Bradshaw R. Sodium appetite in sheep induced by cerebral ventricular infusion of angiotensin: comparison with sodium deficiency. *Science* 1981; 214: 195-197.
10. Unger T, Horst PJ, Bauer M, Demmert G, and Rettig R. Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats. *Brain Res* 1989; 486: 33-38.
11. Ferguson AV, Washburn DL, Latchford KJ. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med* 2001; 226: 85-96.
12. Shoji M, Kimura T, Ota K et al. Responses of atrial natriuretic peptide, vasopressin, aldosterone and renal function to intracerebroventricular infusion of angiotensin II in dogs. *Tohoku J. Exp. Med* 1991;163:187-97.
13. Saavedra JM. Emerging features of brain angiotensin receptors. *Regul Pept.* 1999; 85: 31-45.
14. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 1992; 13: 329-80.
15. Aoki K, Yamori Y, Ooshima A, Okamoto K. Effects of high or low sodium intake in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circ J* 1972; 36:539-545.
16. Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): Role of renal nerves. *Life Sci* 2005; 76: 1805-1815.
17. Guadagnini D, Gontijo JA. Altered renal sodium handling in spontaneously hypertensive rats (SHR) after hypertonic saline intracerebroventricular injection: role of renal nerves. *Life Sci.* 2006; 79:1666-1673.
18. Torsoni MA, Carvalheira JB, Calegari VC, Bezerra RM, Saad MJ, Gontijo JA, Velloso LA. Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus - a mechanism for desensitization of AngII signaling. *J Endocrinol.* 2004; 181:117-28.

19. Darnell JE Jr, Kerr IM & Stark GR. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264: 1415-1421.
20. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995; 375: 247-250.
21. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *PNAS* 1998; 95: 114-119.
22. Yasukawa H, Sasaki A & Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Ann Rev Immunol* 2000; 18:143-164.
23. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001; 19: 378-387.
24. Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, Torsoni AS, Franchini KG, Saad MJ, Velloso LA. Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology* 2003; 144: 4586-4596.
25. Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ & Gontijo JA. Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull* 2002; 57: 613-618.
26. Johnson AK, Epstein AN. The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 1975; 86: 399-418.
27. Lovenberg, W. Techniques for measurements of blood pressure. *Hypertension* 1987; 9: 15-16.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
30. Zhu F, Liao YH, Li LD, Cheng M, Wei F, Wei YM, Wang M. Target organ protection from a novel angiotensin II receptor (AT1) vaccine ATR12181 in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Immunol.* 2006; 3: 107-114.
31. Ganten D, Hermann K, Bayer C, Unger T, Lang RE. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science* 1983; 221: 869-871.
32. Hu L, Zhu DN, Yu Z, Wang JQ, Sun ZJ, Yao T. Expression of angiotensin II type 1 AT(1) receptor in the rostral ventrolateral medulla in rats. *J. Appl. Physiol* 2002; 92: 2153-2161.
33. Tamura K, Umemura S, Nyui N, Yamakawa T, Yamaguchi S, Ishigami T, Tanaka S, Tanimoto K, Takagi N, Sekihara H, Murakami K, Ishii M. Tissue specific regulation of angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 27: 1216-1223.
34. Veerasingham SJ, Raizada MK. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol.* 2003; 139(2):191-202.
35. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256: 34-41.
36. Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 2001; 409: 92-97.

37. Bertelli DF, Ueno M, Amaral ME, Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA, Boschero AC. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *Am J Physiol* 2003; 284: E679-E687.
38. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 1995; 14: 2816-2826.
39. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387: 924-929.
40. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *PNAS* 1998; 95: 114-119.
41. Unger T, Horst PJ, Bauer M, Demmert G, Rettig R, Rohmeiss P. Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats. *Brain Res.* 1989 May 1; 486(1):33-8.
42. Schelling P, Muller S, Clauser E. Regulation of angiotensinogen in cerebrospinal fluid and plasma of rats. *Am J Physiol.* 1983; 244: R466-R471.
43. Kannan H, Nakamura T, Jin XJ, Hayashida Y, Yamashita H. Effects of centrally administered angiotensin on sympathetic nerve activity and blood flow to the kidney in conscious rats. *J Auton Nerv Syst.* 1991; 34: 201-210.
44. Granger JP, Alexander BT, Llinas M. Mechanisms of pressure natriuresis. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4: 152-159.
45. Selkurt EE, Womack I, Dailey WN. Mechanism of natriuresis and diuresis during elevated renal arterial pressure. *Am J Physiol* 1965; 209: 95-99.

46. Cowley AW Jr. Role of the renal medulla in volume and arterial pressure regulation. *Am J Physiol* 1997; 273: R1-15.
47. Hall JE, Guyton AC, Brands MW. Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney Int* 1996; 55: S35-S41.
48. Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol* 2002; 543(Pt 1): 255-260.
49. Strazzullo P, Barbato A, Vuotto P, Galletti F. Relationships between salt sensitivity of blood pressure and sympathetic nervous system activity: a short review of evidence. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23: 25-33.
50. Buckley JP, Singh S, Steenberg ML, Jandhyala BS. Intraventricular infusion of angiotensin II on the hemodynamics and renal function of alpha-chloralose anesthetized cats. *Circ Res.* 1977; 40: I62-I66.

Figures and Table

Figure 1- Effect of i.c.v. dose-response injection of AngII on drinking behavior in (WKy and SHR) rats. (a) Rats were i.c.v. cannulated and received 3.0 μ l saline or 3.0 μ l of a solution containing AngII (amounts stated in the figure). In both groups, the volume of spontaneous water consumption was measured over the next 30 min. In all experiments, $n = 5$; $*P \leq 0.05$ vs saline-treated (ANOVA).

Figure 2- Age-related (at 4, 8 and 12 wk-old) SOCS-3 expression and the activation of JAK-2 and SOCS-3/JAK-2 association signal transduction in hypothalamus of SHR and WKy rats. After 4, 8 and 12 weeks, hypothalami were obtained and total protein was extracted according to the protocols described in Materials and Methods. Protein extracts were submitted to immunoprecipitation (IP) with anti-JAK-2 antibodies. Immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-SOCS-3 or anti-phosphotyrosine (pY) antibodies. In all experiments, $n=5$; $*P \leq 0.05$ SHR vs WKy rats (ANOVA).

Figure 3- Effect of i.c.v. injection of 400 pmol AngII upon renal function behavior of rats. Rats were i.c.v. cannulated and received 3.0 μ l saline or 3.0 μ l of a solution containing AngII. (A) Creatinine clearance (C_{Cr}), (B) fractional sodium excretion (FE_{Na}), (C) proximal (FEP_{Na}) and (D) post-proximal ($FEPP_{Na}$) fractional sodium excretion, (E) tail arterial pressure and (F) fractional potassium excretion (FE_K) in 12-14 week-old SHR and WKy rats. The data are reported as the means \pm SD. $* P \leq 0.05$ vs WKy (ANOVA and Bonferroni's contrast test, $n=10$). See Results for statistical analysis details.

Table 1- Body weight as related to age, sodium intake, serum sodium, potassium and lithium levels in spontaneously hypertensive (SHR) and strain normotensive (WKy) rats fed a standard diet. The data are reported as the means \pm SD. * $P \leq 0.05$ vs WKy (Student's *t* test).

Groups	Na⁺ (mM)	K⁺ (mM)	Li⁺ (μM)	Body weight (g) 12-wk	Sodium Intake (mmol/wk/100 g)
WKy (n=10)	138 \pm 2.6	4.3 \pm 0,6	85 \pm 19	262 \pm 15	12.7 \pm 2.3
SHR (n=11)	142 \pm 3.1	4.1 \pm 0,4	79 \pm 15	180 \pm 13*	11.8 \pm 1.9

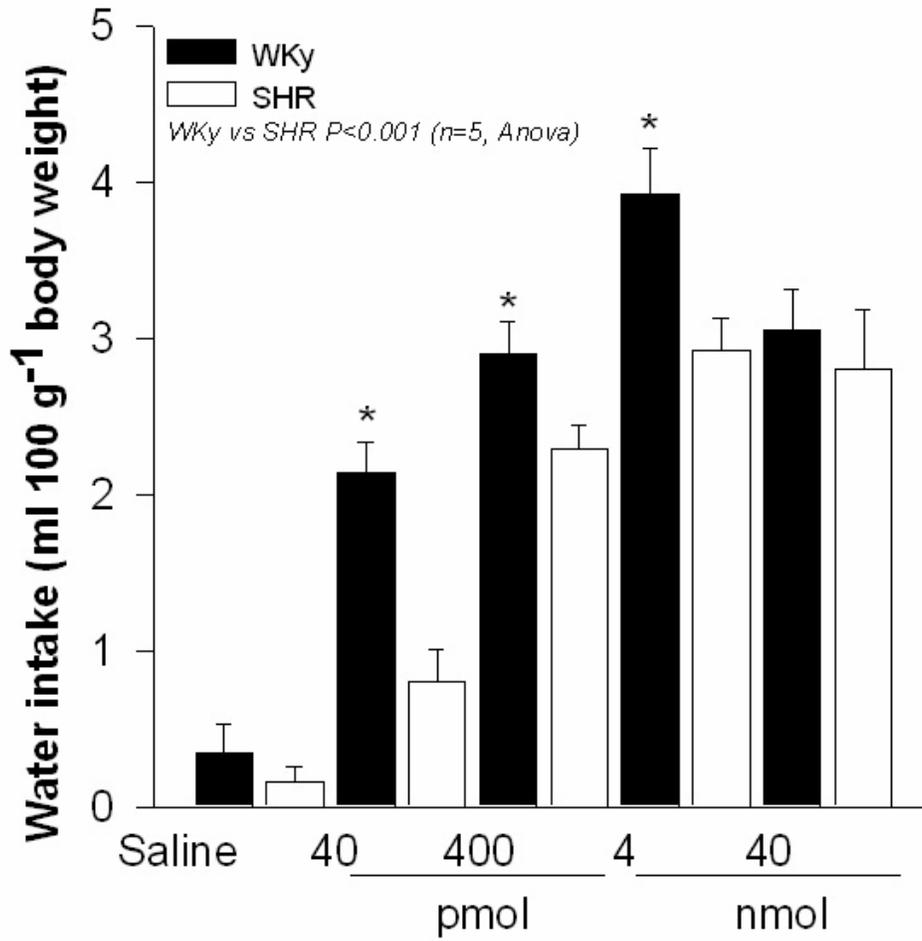


Figure 1

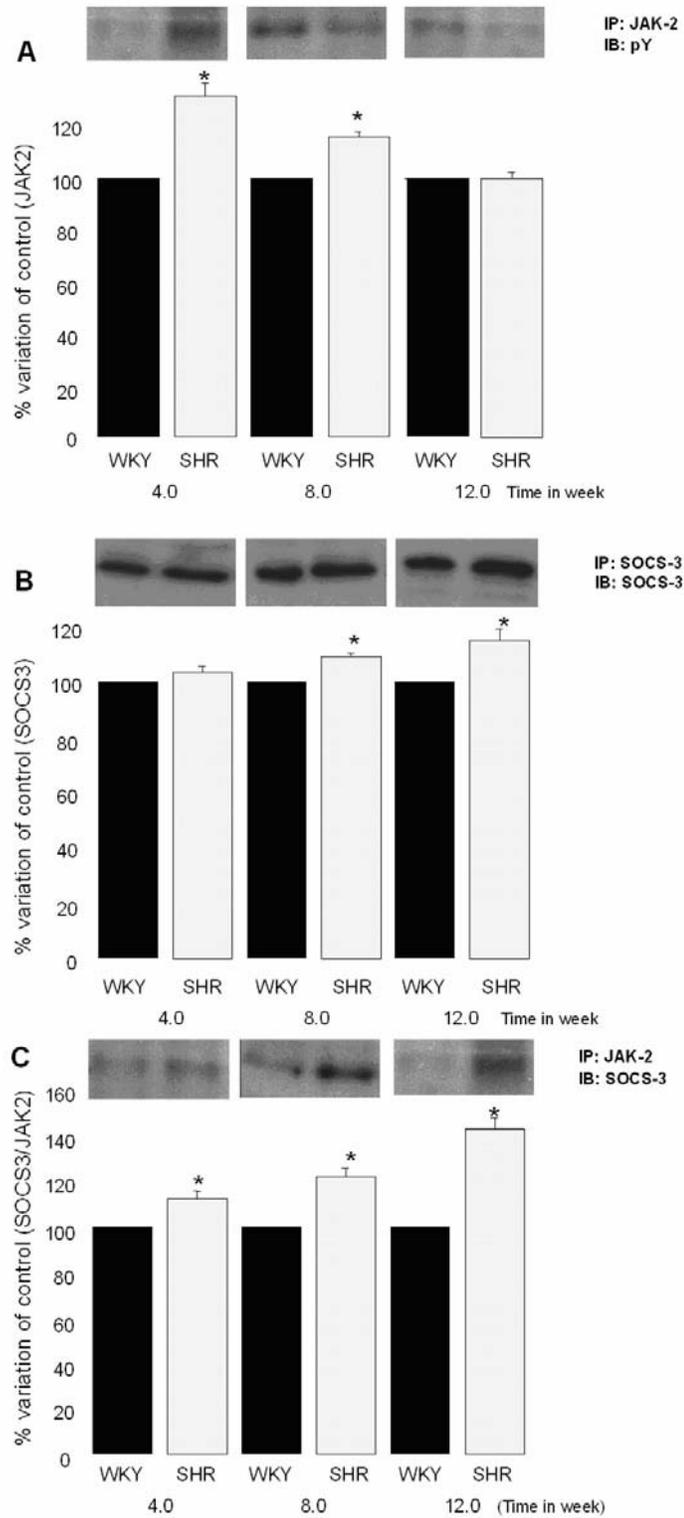


Figure 2

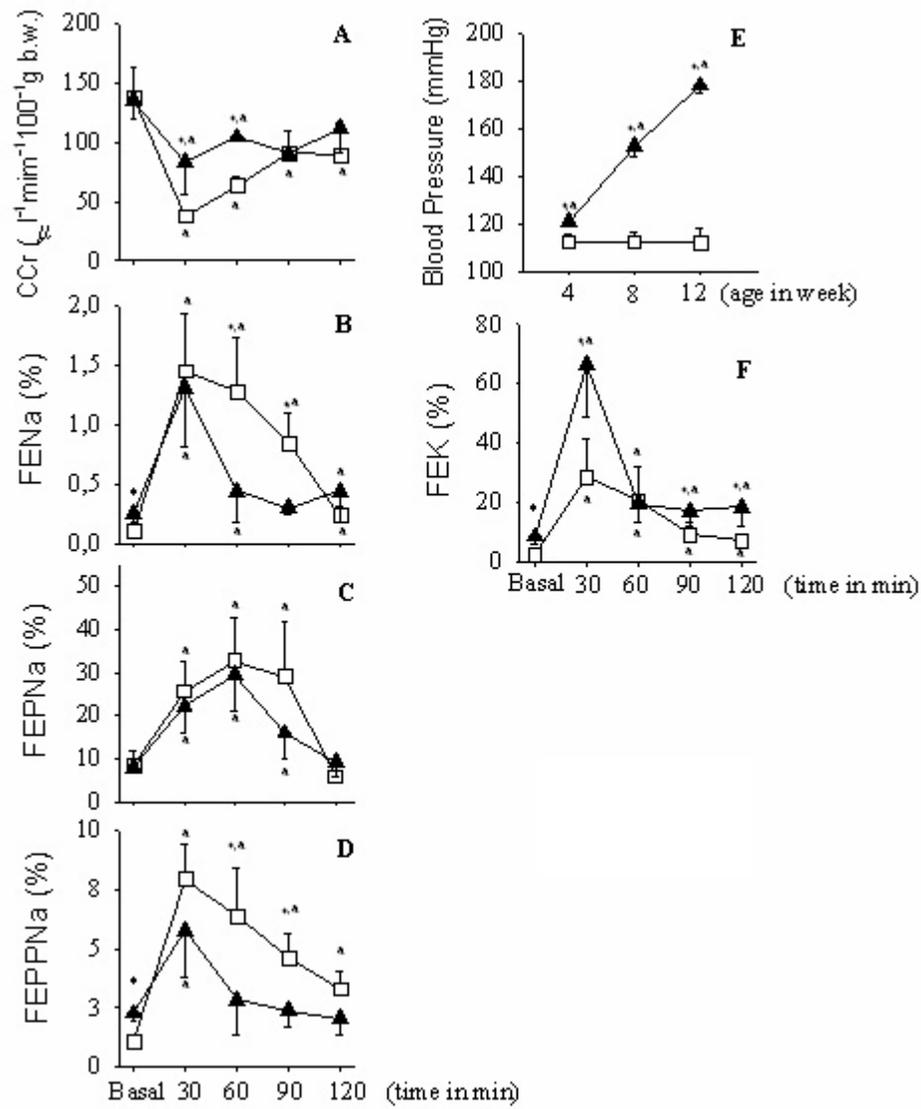


Figure 3