

C707834
R45-0754
65/11/02
R45,00

**Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**Efeito de Concentrações Fisiológicas de Ouabaína sobre
a Excitabilidade de Células Agudamente Dissociadas de
Gânglios Cervicais Superiores de Rato**

Paulo Roberto de Lavor Porto

13/3
11/11/02
2002
11/1

**Fortaleza
2002**

**Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

Efeito de Concentrações Fisiológicas de Ouabaína sobre a Excitabilidade de Células Agudamente Dissociadas de Gânglios Cervicais Superiores de Rato

Paulo Roberto de Porto Lavor

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

Fortaleza
2002

P882 Porto, Paulo Roberto de Lavor

Efeito de concentrações fisiológicas de Ouabaina sobre a excitabilidade de células agudamente dissociadas de gânglios cervi-cais superiores de rato / Paulo Roberto de Lavor Porto – Fortaleza, 2002.

117 f. : il.

Orientador: Prof. José Henrique Leal Cardoso

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-graduação em Farmacologia

1. Hipertensão 2. Sistema Nervoso Autônomo 3. Ouabaina J. Título

CDD 616 132

Efeito de Concentrações Fisiológicas de Ouabaína sobre a Excitabilidade de Células Agudamente Dissociadas de Gânglios Cervicais Superiores de Rato

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Farmacologia, a qual encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

Paulo Roberto de Porto Lavor

DATA DE APROVAÇÃO: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. José Henrique Leal Cardoso
(orientador)

Prof.Dr. Manassés Claudino Fonteles

Prof.Dr. Morahmed Saad Lalhu

Prof.Dr. Carlos Maurício Castro Costa

Profª.Dra. Aline Alice Cavalcante de Albuquerque

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter se feito presente enviando pessoas para que pudéssemos enfrentar e superar os desafios as quais gostaria de agradecer:

À minha esposa Sandra (minha querida Baixinha), e meus filhos Saulo e Pablo, que sempre se colocaram de maneira corajosa e deixaram para trás os seus sonhos e projetos de vida, para queimarmos mais esta etapa nas nossas histórias de vida. Pelo amor, pela resignação e superação o meu mais profundo agradecimento, pois mais uma vez ficou a certeza de que o amor e o sentimento de família nos manteve unidos, mesmo quando a saúde nos quis faltar.

Aos meus pais Juarez e Angelina e aqueles que vêm se posicionando como meus pais, Luciano e Izaídes, uma vez que eles não pediram mais esta missão, o meu mais profundo agradecimento pois vocês, me permitiram caminhar e avançar mesmo quando as condições nos diziam não. Obrigado senhor.

Ao Meu orientador Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, pela confiança em mim depositada, quando tantos insistiam em duvidar, pela paciência durante o processo de aprendizagem e o aprimoramento do meu processo de formação científica, que Deus o preserve assim.

Ao Prof. Dr. Daniel Weinerich do Departamento de Farmacologia Experimental da Escola de Medicina da Universidade de Maryland – USA, pelos ensinamentos, acolhida, e as condições de trabalho, bem como ao amigo que tive pouco tempo para conviver, mas que muito me ensinou Glen Taylor, e aos colegas de laboratório, Erick Lancaster, Kim, Ruth e Enju, que Deus os guarde na palma de sua mão.

Aos amigos Erick Messias e Nidia, Inês e Manoel Penna, Margaret e Bruno, Marcos, Jader e Andreia, Daniel e Vanessa, que não só estiveram conosco, mas nos socorreram quando a saúde nos ia faltar, eles foram o porto seguro em uma terra que aprendemos a coloca-la como nossa segunda pátria.

Ao irmão que não tive Cauby Freire e ao amigo Antônio Carlos pelas as palavras de estímulo e defesa intransigente.

Ao meu amigo Pedro Magalhães que nos deu o suporte e torceu para que tudo se tornasse realidade.

A Universidade de Fortaleza por intermédio da Dra. Fátima Maria Veras, a Prefeitura Municipal de Fortaleza e a Universidade de Maryland que através da Dra Fátima Memória e o Prof. Daniel Weinerich respectivamente, nos forneceram os recursos financeiros permitindo a realização desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Controle Nervoso da Pressão Arterial.....	4
1.2 Os Esteróides e Hipertensão	9
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Drogas e Soluções	18
3.2 Protocolos Experimentais	20
3.2.1 Remoção do gânglio cervical superior	20
3.2.2 Desagregação Enzimática	21
3.2.3 Eletrofisiologia.....	21
3.3 Análises Estatísticas	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Efeito de Concentrações Fisiológicas de Ouabaína sobre a Excitabilidade de Neurônios Simpáticos	24
4.1.1 Neurônios superfundido com Locke contendo $[k^+] = 4,7 \text{ mM}$	24
4.1.1.1 Neurônios cultivados com Leibovitz's sem fenol red, e superfundidos com Locke contendo $[k^+] = 4,7 \text{ mM}$	24
4.1.1.2 Neurônios cultivados com Minimum Essential Medium sem fenol red, e superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 4,7 \text{ mM}$..	32
4.2 Neurônios superfundidos com Locke contendo $[k^+] = 5,6 \text{ mM}$	40

4.2.1	Efeito do potássio 4,7 mM e 5,6 mM sobre neurônios simpáticos.....	40
4.2.2	Neurônios cultivados com MEM e superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 5,6$ mM e $[K^+] = 4,7$ mM expostos a 10nM de ouabaína durante 1 hora	48
4.3	Efeito das concentrações de ouabaína 10 nM /1h e perfundidas com Locke contendo $[K^+] = 5,6$ mM	56
4.4	Neurônios simpáticos tratados com altas doses de ouabaína 1mM e superperfundidos com Locke contendo $[K^+] = 5,6$ mM	64
4.5	Efeito da dihidroouabaína e da raminose sobre a excitabilidade e propriedades passivas de neurônios simpáticos	72
5	DISCUSSÃO	80
5.1	As alterações da excitabilidade neuronal pela ouabaína 10 nM	80
5.2	A concentração de ouabaína utilizada	81
5.3	O deslocamento do funcionamento neuronal para um padrão mais tônico	83
5.4	A localização anatômica dos neurônios afetados	86
5.5	Interação entre os Efeitos da Ouabaína e o $[K^+]$ da solução nutritora	87
5.6	Ouabaína, hipertensão e os dados da presente investigação	88
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fórmula Química da Ouabaína, onde evidenciamos o núcleo ciclopentanofenantreno e a raminose 10
- Figura 2** – Rotas metabólicas de síntese dos hormônios da cortex suprarrenal 16
- Figura 3** – Efeito da concentração fisiológica de ouabaína (10 nM) sobre a excitabilidade neuronal de neurônios agudamente dissociados de GCS, e cultivados em L15, estimulado com uma rampa de corrente despolarizante e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio 26
- Figura 4** – Efeito da ouabaína em concentração de 10 nM sobre a excitabilidade neuronal de neurônios agudamente dissociados de GCS, e cultivados em L15, estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar de corrente e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio 28
- Figura 5** – Efeito, de ouabaína 10 nM sobre as propriedades passivas e excitabilidade em neurônios agudamente dissociadas de gânglios cervicais superiores de ratos adultos, cultivados em L15 e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de potássio 30
- Figura 6** – Aumento da excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS, produzida por concentrações fisiológicas de ouabaína (10 nM), cultivados em MEM, estimulados com uma rampa de corrente, e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio 34
- Figura 7** – Aumento da excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS, produzida por concentrações fisiológicas de ouabaína (10 nM), cultivados em MEM, estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio 36
- Figura 8** – Efeito de ouabaína 10 nM sobre as propriedades passivas e excitabilidade em neurônios agudamente dissociadas de gânglios

cervicais superiores de ratos adultos, cultivados em MEM e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de potássio	38
Figura 9 – Efeito das concentrações de potássio no líquido de superfusão sobre a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS, estimulados com uma rampa de corrente	42
Figura 10 – Efeito das concentrações de potássio no líquido de superfusão sobre a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS quando estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar	44
Figura 11 – Efeito de diferentes concentrações de Potássio extracelular sobre as propriedades passivas e excitabilidade de neurônios agudamente dissociados e cultivados em MEM	46
Figura 12 – Interação entre os efeitos da concentração extracelular de K^+ e da ouabaína em doses fisiológicas, sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, estimulados com uma rampa de corrente despolarizante	50
Figura 13 – Interação entre a concentração extracelular de K^+ e a ouabaína em doses fisiológicas sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar de corrente e duração de 400ms	52
Figura 14 – Efeito de ouabaína em concentrações fisiológicas (10nM), em neurônios agudamente dissociadas de gânglios cervicais superiores de ratos adultos superfundidos com diferentes concentrações de potássio	54
Figura 15 – Efeito da ouabaína em concentrações fisiológicas, sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, cultivados em MEM, e estimulados com uma rampa de corrente despolarizante e superfundidos com Locke contendo 5,6 mM/L de potássio	58
Figura 16 – Efeito da ouabaína em concentrações fisiológicas sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, cultivados em MEM e estimulados com pulso despolarizante de corrente de valor duas	

vezes o limiar e superfundidos com Locke contendo 5,6 mM/L de potássio	60
Figura 17 – Alterações nas propriedades passivas e excitabilidade de neurônios dissociados de GCS de ratos adultos, cultivados em MEM, expostos a concentrações fisiológicas de ouabaína (10 nM) por um período de 1 hora e superfundidos com potássio 5,7 mM	62
Figura 18 – Efeito de 1 mM de ouabaína sobre a excitabilidade de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) estimulados com uma rampa de corrente despolarizante	66
Figura 19 – Efeito de 1 mM de ouabaína sobre a excitabilidade de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) estimulados com pulso despolarizante de corrente de valor duas vezes o limiar	68
Figura 20 – Alterações na excitabilidades e propriedades passivas produzidas por altas doses de ouabaína (1 mM) em neurônios agudamente dissociados de GCS de ratos adultos	70
Figura 21 – Efeito da dihidrouabaina 10 nM, Raminose 10 nM sobre a excitabilidade neuronal de neurônios agudamente dissociados de GCS estimulados com uma rampa de corrente despolarizante	74
Figura 22 – Efeito da dihidrouabaina 10 nM, raminose 10 nM sobre a excitabilidade neuronal de GCS estimulados com pulso despolarizante de corrente de valor duas vezes o limiar	76
Figura 23 – Alterações na excitabilidade e nas propriedades passivas de neurônios agudamente dissociados de GCS expostos a dihidroouabaína 1 nM e raminose 10 nM	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados sumarizados dos efeitos de ouabaína 10 nM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados e cultivados em L15, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos	25
Tabela 2 Efeitos obtidos em gânglios cervicais superiores de ratos adultos de ouabaína 10 nM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados e cultivados em MEM	33
Tabela 3 Efeito das diferentes concentrações de potássio no Locke sobre as propriedades passivas e na excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de gânglios cervicais superiores	41
Tabela 4 Alterações produzidas por ouabaína 10 nM superfundida com potássio 4,7mM e 5,6mM, sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios, agudamente dissociados e cultivados em MEM, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos	49
Tabela 5 Efeitos de ouabaína 10nM em neurônios perfundidos com solução de Locke com concentração de potássio 5,6 mEq/l sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios, agudamente dissociados, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos	57
Tabela 6 Efeitos de ouabaína 1 mM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos, superfundidos com 5,6 mM de K ⁺	65
Tabela 7 Efeitos da dihidrouabaina 10 nM e da raminose 10 nM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados, de gânglio cervicais superiores de ratos adultos	73

LISTA DE ABREVIATURAS

(REH)	Ratos espontaneamente hipertensos
(GCS)	Gânglios Cervicais Superiores
(WKY)	Ratos Wstar-Kyoto
(SNC)	Sistema Nervoso Central
(SNP)	Sistemas nervoso periférico
(TGI)	Trato gastrointestinal
(SNS)	Sistema nervoso simpático
(PA)	Pressão arterial
(I _A)	Correntes A de potássio
(I _M)	Corrente M de potássio
(GMI)	Gânglio mesentérico inferior
(NTS)	Núcleo do Trato Solitário
(RVL)	Raiz dorsal ventrolateral
(NA)	<i>Nucleus ambiguus</i>
(DVN)	Núcleo dorsal motor do vago
T1	Segmento Torácico
L2	Segmento Lombar
(RVL)	Medula rostroventrolateral
A5	Região do hipotálamo
C1	Região do Hipotálamo
(IML)	Coluna intermediolateral.
(TTX)	Tetrodoxina
(I _{Na}) _i	Corrente de sódio
I _{Kca}	Potássio dependentes de cálcio
AHP	Hiperpolarização pós potencial
(TEA)	Tratetiletanilamina
(AP)	Apamina)
(I _H)	Corrente H
(I _{D2})	Corrente D2
(STC)	Esteróides cardiotônicos
[Na ⁺] _i	Concentração de Sódio Citoplasmática
[K ⁺] _i	Concentração de Potássio Citoplasmática
(SDS)	Substâncias digitálicas-símile
(SEDS)	Substâncias endógenas digitálicas similares

RESUMO

O gânglio cervical superior, bem como os outros gânglios paravertebrais, se constituem na etapa simpática mais distal da rota de processamento das informações para o controle simpático das funções orgânicas. Esse fato confere muita importância às alterações do funcionamento dos seus neurônios, que apresentam grande probabilidade de se refletir na função do efetor. Por essa razão investigamos os efeitos da ouabaína, em concentrações próximas àquelas encontradas fisiologicamente, sobre parâmetros eletrofisiológicos relacionados à excitabilidade neuronal do gânglio cervical superior. Células agudamente dissociadas deste gânglio foram, logo após cultivadas 1h em L15 sem (controle) ou com concentração fisiológica (10nM) de ouabaína, superfundidas com solução de Locke contendo 4,7 mM de $[K^+]$ e então determinadas suas propriedades passivas: resistências de entrada de membrana (R_i), potencial transmembrana de repouso em presença de clampeamento contínuo de corrente (E_{mh}), corrente de clampeamento basal (I_h), limiar de corrente (I_{th} (limiar de corrente para desencadeamento de um potencial de ação)). Avaliaram-se também as mudanças na excitabilidade neuronal, através do número de potenciais de ação produzidos pela célula estimulada com rampa de 0,4 nA de amplitude e duração de 800 ms (nAP_{ramp}) e uma onda quadrada de corrente, de duração de 400 ms e de amplitudes, duas vezes o limiar ($nAP_{2xI_{th}}$) e três vezes o limiar ($nAP_{3xI_{th}}$). Nestas células foram observadas diferenças significativas na corrente de clampeamento de voltagem de 30 ± 6 (n=10) para $19 \pm 0,15$ nA (n=11) ($p = 0,007$) e um aumento da excitabilidade, quando estimuladas com pulsos $nAP_{2xI_{th}}$, de $1,7 \pm 0,21$ para $4,6 \pm 0,54$ ($p < 0,0001$) e com $nAP_{3xI_{th}}$, de $2,3 \pm 0,40$ para $6,5 \pm 0,73$ ($p < 0,0001$), em relação ao controle. Ao serem cultivadas em MEM, e submetidas aos mesmos protocolos de estimulação e superfundidas com Locke contendo 4,7 mM de K^+ , observamos que as propriedades passivas se mantiveram inalteradas enquanto que a excitabilidade se apresentou estatisticamente diferente: nAP_{ramp} foi incrementado de $1,75 \pm 0,80$ (controle) (n=12) para $6,77 \pm 2,60$ (n=9) ($p=0,050$), $nAP_{2xI_{th}}$ de $1,4 \pm 0,19$ para $3,9 \pm 1$ ($p = 0,012$), e $nAP_{3xI_{th}}$ e $1,5 \pm 0,194$ para $4,8 \pm 1,5$ ($p = 0,012$). Quando células agudamente dissociadas de gânglio cervical superior (GCS) foram são cultivadas em MEM e estimuladas em diferentes concentrações de Potássio 5,6 mM (n=18) e 4,7 mM (n=12) observamos que essa diferença nas concentrações de potássio (0,90 mM), não provocou alterações significativas na excitabilidade neuronal, nem nas propriedades passivas e na excitabilidade. As células expostas a ouabaína e superfundidas com essas diferentes concentrações de potássio, (5,6 mM e 4,7 mM), contudo não mostraram diferenças nas propriedades passivas, mas demonstraram nas ativas: a excitabilidade. Nas células cultivadas com 5,6mM (n=14) de potássio, $nAP_{2xI_{th}}$ foi $1,86 \pm 0,39$ que se alterou para $3,9 \pm 1$ potenciais em células superfundidas com potássio 4,7mM (n=9) ($p = 0,042$). Células cultivadas em MEM, superfundidas com Locke 5,6mM (n=21), expostas por 1 hora a ouabaína 10nM (n=12), quando comparadas com o seu controle (células não expostas a ouabaína), apresentaram alterações da excitabilidade ao serem estimuladas, com $nAP_{2xI_{th}}$ passando de $1,1 \pm 0,1$ (controle) para $2 \pm 0,4$ ($p=0,044$) e $nAP_{3xI_{th}}$ de $1,19 \pm 0,80$ para $2,5 \pm 0,74$

($p=0,040$). Entretanto, ao expormos estas células cultivadas em MEM, por um período de 1 hora, à concentrações de 1mM de ouabaína observamos uma alterações na resistência de membrana, que passou de $70,7 \pm 6,2 \text{ M}\Omega$ para $119 \pm 10 \text{ M}\Omega$ ($p= 0,002$) e da corrente de clampeamento que sofreu decréscimo de $118 \pm 26\text{nA}$ ($n=27$) para $80 \pm 2\text{nA}$ ($n=29$) ($p= 0,0008$). Houve o aumento na excitabilidade neuronal: nas células estimuladas, nAP_{ramp} , aumentou de $2,8 \pm 0,52$ (controle) ($n=27$) para $9,9 \pm 1,2$ ($p= 0,000001$), $nAP_{2\text{x}l\text{th}}$ de $1,6 \pm 0,74$ para $3,9 \pm 0,4$ ($p= 0,000002$) e $nAP_{3\text{x}l\text{th}}$ de $1,89 \pm 0,187$ para $5,44 \pm 0,53$ ($p= 0,000006$). A exposição dos neurônios agudamente dissociados à dihidroouabaína (10nM) ($n=4$) e à Raminose (10nM) ($n=7$) promoveu no caso da dihidroouabaína um aumento da resistência de $70,7 \pm 6,2$ ($p < 0,05$) enquanto a excitabilidade aumentou, na nAP_{ramp} para $14,8 \pm 3$ (0,0001), $nAP_{2\text{x}l\text{th}}$ para $4 \pm 0,7$ e (0,0001) $nAP_{3\text{x}l\text{th}}$ $7,5 \pm 0,96$ (0,001). Os dados demonstram que a ouabaína em concentrações fisiológicas (10nM) aumenta a excitabilidade de neurônios do GCS agudamente dissociados e que este efeito pode ser modulado por alterações nas concentrações de potássio extracelulares. Os dados demonstram também que este efeito não é produzido pela Raminose na mesma concentração.

1 INTRODUÇÃO

Há na literatura registros de uma gama de órgãos localizados ao longo das vias envolvidas no controle neural da pressão arterial, cujos parâmetros de comportamento fisiológico estão alterados, em relação aos seus controles. Estes fatos estão documentados por vários autores, em modelos de ratos espontaneamente hipertensos (REH) (BUNAG & EFERAKEYA, 1976; YAMORI & OKAMOTO, 1969; EILAM. et al. 1991). Uma estrutura é o hipotálamo de rato espontaneamente hipertenso (REH) (BUNAG, et al. 1975; YAMORI & OKAMOTO, 1969; BUNAG & EFERAKEYA, 1976; SASAKI. et al. 1986;), cuja frequência de disparo se encontra aumentada do valor médio de 2.07 ± 0.18 Hz para 4.09 ± 0.26 Hz, em 52% dos neurônios hipotalâmicos estudados. Outra estrutura, neste percurso são os gânglios cervicais superiores (GCS) de animais espontaneamente hipertensos (REH), cujo neurônios também apresentam alterações, que se caracteriza com a perda de acomodação em relação aos seus controles, normotensos os ratos Wistar-Kyoto (WKY) (JUBELIN & KANNAN, 1990; MAGEE & SCHOFIELD, 1992). Portanto, entender o mecanismo destas alterações e determinar os compostos que a provocam, como o aumento da excitabilidade, evidenciada no aumento da frequência de disparo dos neurônios hipotalâmicos, descritos acima, e a perda da acomodação dos neurônios destes efetores finais, os gânglios paravertebrais, implica em entender como a informação é tratada pelo Sistema Nervoso Central (SNC), e como esta participa dos processos fisiológicos e patológicos desde a sua instalação até a manutenção (JUBELIN & KANNAN, 1990; MAGEE & SCHOFIELD, 1992).

Nesta busca para estudar o mecanismo destes fenômenos, bem como as alterações apresentadas por estas estruturas, encontramos na abordagem eletrofisiológica uma ferramenta poderosa, uma vez que a perda de acomodação

de gânglios cervicais superiores (GCS) isolados de animais espontaneamente hipertensos (REH), é um achado característicos nestes animais (YAROWSKY & WEINREICH, 1985), e que acredita-se estar relacionado com a hiperexcitabilidade simpática, também evidenciada nestes animais.

Os gânglios autonômicos podem ser divididos, nos mamíferos, em gânglios paravertebrais e a pré-vertebrais. Os neurônios destes gânglios se originam de um progenitor comum (LANDIS & PATTERSON, 1981), e que com o desenvolvimento, eles assumem funções diferentes e exercem propriedades diferentes. Uma fração significativa de neurônios nos gânglios pré-vertebrais recebem projeções sinápticas originadas dos sistemas nervoso periférico (SNP) e central (SNC) (McLCHLAN & MECKLER, 1989; CROWCROFT, HOLMAN & SZURSZEWSKI, 1971). Estes neurônios agem como centros integrados que controlam o tônus simpático para a vascularização e sistema nervoso entérico do trato gastrointestinal (TGI) (SZURSZEWSKI, 1981; SIMMONS, 1985), além de mediar diretamente alguns reflexos gastrointestinais. Esta capacidade é mantida quando isolados dos estímulos do sistema nervoso simpático (SNS), permitindo assim o estudo dos mesmos em preparações isoladas (KUNTZ & SACCOMANNO, 1944; SEMBA, 1954). Ao contrário, a maioria dos gânglios paravertebrais, que transmitem informações da medula espinhal para os órgãos alvos, sem integração com outras fontes de informações, muito embora haja uma considerável convergência de "inputs" (SKOK, 1973). A natureza dos inputs sinápticos nos gânglios pré e paravertebrais são importantes para o estudo dos seus papéis funcionais no sistema nervoso periférico simpático.

Embora existam varias maneiras para se classificar estas populações de neurônios simpáticos, ao nível celular, a sistemática mais utilizada, (CLARK & MCLACHLAN, 1987; KING & SZURSZEWSKI, 1988), se baseia em dividi-los em tónicos, que respondem com uma saraivada de potenciais de ação, e os fásicos, os quais foram inicialmente descrito por Pitts & Bronk em 1942, que respondem com um periodo de acomodação, após serem estimulados com um pulso despolarizante de duas e três vezes o seu limiar de excitação. Os fásicos recebem estímulos subliminares dos neurónios motores preganglionares localizado na

medula espinhal (SKOK & IVANOV, 1983; HIRST & MCLACHLAN, 1986), assumindo uma função primária de filtrar e retransmitir o sinal, conectando o Sistema Nervoso Central (SNC) aos órgãos periféricos. Os neurônios tônicos recebem numerosos e pequenos estímulos subliminares, originados de neurônios espinhais pregangliônicos e neurônios sensoriais localizados na periferia. (CROWCROFT et al., 1971; SZURSZEWSKI, 1981). Esses estímulos devem ser somados para disparar a célula (CROWCROFT et al., 1971; MCLACHLAN & MECKER, 1989) Um aspecto importante a salientar, é que este comportamento frente a um estímulo despolarizante, têm sido conservados filogeneticamente entre as espécies de mamíferos (WEEMS & SZURSZEWSKI, 1978; GRIFFITH, GALLAGHER & SHINNICK, 1980; DECKTOR & WEEMS, 1983; JULE & SZURSZEWSKI, 1983; CASSEL, CLARK & MCLACHLAN, 1986; KING & SZURSZEWSKI, 1988). É possível inclusive identificar diferentes porcentagens destas populações de neurônios nos gânglios paravertebrais, como o gânglio cervical superior (GCS), gânglios caudais e lombares, são quase exclusivamente fásicos (95%), enquanto que os gânglios pré-vertebrais são uma mistura de neurônios fásicos e tônicos (WEEMS & SZURSZEWSKI, 1978; GALVAN & SEDLMEIR, 1984; CASSELL et al., 1986). Estudos recentes sugerem que a frequência de disparos de potenciais de ação (ABELES & PRUT, 1996; BAIR & KOCH, 1996) e a correlação entre os padrões de disparos entre diferentes tipos de neurônios (GRAY et al., 1989; ROELFSEMA et al., 1997) estão envolvidos no processo de transmissão e processamento das informações (GRAY et al., 1989; ABELES & PRUT, 1996; BAIR & KOCH, 1996; ROELFSEMA et al., 1997).

Entretanto, muito ainda necessita ser desvendado para o entendimento da relação entre as características dos disparos com o comportamento dos neurônios dentro da rede neuronal (SHADLEN & NEWSOME, 1994), existe um consenso de que a elucidação deste código é importante para entender o relacionamento entre os neurônios dentro do sistema nervoso (SN) (VAADIA et al., 1995; RIEHLE et al., 1997).

Alguns estudos procuram relacionar este comportamento com as correntes expressada por estas estruturas como o gânglio mesentérico inferior (GMI) de cobaio onde as diferentes expressões das correntes A (I_A) de potássio

(CASSELL et al., 1986) e $M(I_M)$ estão relacionadas com as diferentes propriedades de disparo (BROWN & ADAMS, 1980; BROWN, 1988; YAMADA, KOCH & ADAMS, 1989), reforçando assim a importância do estudo eletrofisiológico como ferramenta para a elucidação deste processo de elaboração de informações.

1.1 Controle Nervoso da Pressão Arterial

O sistema nervoso central (SNC) controla a função cardiovascular via mecanismos neurais e humorais, como a secreção de catecolaminas, de vasopressina, e do sistema renina-angiotensina (ARITA, KOGO & ICHIKAWA, 1988; CZYZEWSKA-SZAFRAN; et al., 1988; HAMBLEY; et al., 1984). Os reflexos cardiovasculares por sua vez, são críticos para o controle da pressão arterial (PA) (COWLEY, Jr., 1992., ABOUD & THAMES, 1983; SHEPHERD & MANCIA, 1986), e assumem um papel importante a curto prazo enquanto, que a regulação renal do volume sanguíneo o faz a longo prazo (COWLEY, Jr., 1992).

O controle neural começa com informações originadas nos diversos transdutores fisiológicos entre eles, os barorreceptores, (SHEPHERD & MANCIA, 1986; SPYER, 1981; ECKBERG & FRITSCH, 1993; KUMADA, et al., 1990), considerados por vários autores um dos mecanismos mais importante para o controle da frequência cardíaca (ABOUD, 1986; SHEPHERD & MANCIA, 1986; ECKBERG & FRITSCH, 1993; WALLIN & ELAM, 1994). Os Aumentos dos níveis pressóricos levam a um estiramento da parede do *seio carotídeo* e do *arco aórtico* que é transformado em informações, originadas pela ativação de canais de cátions não seletivos, produzindo uma despolarização. Este processo produz uma frequência de disparo que se comporta como função linear do estiramento da parede vascular. (SHEPHERD & MANCIA, 1986). As informações originadas pelo processo de estimulação dos barorreceptores chega ao SNC, produzindo a inibição do ramo vasomotor simpático, aumentando a atividade cardiovagal, permitindo, inclusive, o controle da descarga vasoconstritora simpática para os nervos esplânicos dos músculos lisos destes vasos, evitando também oscilações

na PA. Em muitos modelos de hipertensão observamos que os barorreceptores estão readaptados a novos valores pressóricos elevados, levando a um estado de hipertensão crônica. Este processo pode permanecer por um longo período de tempo, ou apenas minutos. (DI BONA et al., 1996; DI BONA & JONES, 1992; ECKBERG & FRITSCH, 1993, e JOYNER & SHEPHERD, 1993).

Outros sinais originados nos mecanorreceptores inervados por aferentes vagais transformam a distensão atrial, em informações que via reflexos medulares, ativam o coração e os rins. No coração através do aumento da descarga simpática, produzem taquicardia, regulam o volume dos líquidos extracelulares, pois produzem uma inibição da descarga simpática para os rins, resultando em diurese e natriurese (SHEPHERD, 1986; LINDEN, 1987), aumentando o fluxo urinário e o clearance de água livre. Estes achados se encontram implicados na fisiopatologia da isquemia cardíaca mas seus papéis no controle fisiológico ainda é indeterminado, necessitando de maiores investigações (HAINSWORTH, 1991).

Todos estes sinais são levados pelos nervos craniais Glossofaríngeo (IX) e Vago (X), e convergem para o Núcleo do Trato Solitário (NTS) (SPYER, 1981; SELLER & ILLERT, 1969; KUMADA et al., 1990, e KALIA, & MESULAM, 1980). Em seguida, estas informações são levadas por vias que projetam-se para os neurônios simpatoexcitatórios localizados na raiz dorsal ventrolateral (RVL) localizados no bulbo (DAMPNEY, 1994). Ao mesmo tempo estas mesmas informações são levadas também para os neurônios simpatoexcitatórios cardiomotores do *Nucleus ambiguus* (NA), daí para os neurônios do Núcleo dorsal motor do vago (DVN) (HOPKINS, 1987; STANDISH et al., 1994). O NTS também mandam informações colhidas pelas aferentes para os neurônios magnocelulares produtores de vasopressina localizados nos núcleos supraóxicos e paraventriculares do hipotálamo, além dos neurônios simpáticos pré-ganglionares, localizados no segmentos T1 a L2 da coluna intermediolateral (IML) (CABOT, 1990; SCHOENEN & FAULL, 1990; STRACK et al., 1989; STRACK et al., 1989; DAMPNEY, 1994). Os neurônios localizados em T1 e L2 apresentam propriedades eletrofisiológicas que determinam a descarga autonômica (CABOT, 1990; COOTE, 1988; LASKEY & POLOSA, 1988; POLOSA et al., 1988; JANIG, 1988), que

geralmente estão em frequências menores que 1 a 4 Hz (YOSHIMURA, et al., 1987). Estes neurônios simpatoexcitatórios podem receber sinais seletivamente supraespinhais e aferentes primárias originadas dos neurônios localizados na Medula rostroventrolateral (RVL) (AMENDT et al., 1979; ROSS et al., 1984), que por sua vez receberam sinais de núcleos do hipotálamo da região A5, da região C1 (LESKE & MCKENNA, 1992), da medula ventrolateral e do núcleo caudal da raphe. Estas fibras pré-ganglionares, inervam populações neuronais específicas dos gânglios paravertebrais que fornecem a estimulação para a excitação tônica dos neurônios pós-ganglionares (JUBELIN & KANNAN, 1990). Os neurônios da medula rostroventrolateral (RVL) têm uma importância crítica no comportamento tônico da atividade simpática sobre os vasos e na descarga cardiomotora, pois estes neurônios simpatoexcitatórios do RVL recebem projeções dos barorreceptores e quimiorreceptores e de vias somatosimpáticas e do reflexo vestibulossimpático, respondendo inclusive à hipóxia e ao stress. Os neurônios RVL controlam também a descarga simpática para o coração, vasos sanguíneos, e adrenais via neurônios intermediolaterais (IML) (SUNDARAM & SAPRU, 1991).

Os neurônios pregangliônicos estão na coluna intermediolateral (IML). são distribuídos através de toda a zona intermediária da coluna espinal toracolumbar desde a substância branca até o canal central, lamina X, com a maior concentração na coluna de células intermediolaterais (JANIG, 1990). As terminações axônicas pré-ganglionares são mielinizadas (CABOT, 1990), e saem pela raiz ventral e passam via ramo comunicante branco para o respectivo nervo espinal para alcançar a cadeia simpática de gânglios paravertebrais. As fibras pré-ganglionares podem fazer sinapses em neurônios pós-ganglionares no mesmo nível do ramo branco e correr rostralmente e caudalmente na cadeia simpática para fazer sinapse com um grande número de neurônios pós-ganglionares para formarem os nervos esplanícos, e inervarem os gânglios pré-vertebrais e a medula adrenal. Os segmentos T1 a T2 inervam a cabeça e o pescoço, T2 a T6, a extremidade superior e vísceras torácicas e T12 a L2, as extremidades pélvicas e órgãos do períneo (SHONDORF, 1993). Os neurônios paravertebrais agem primariamente como estação de disparo, eles recebem fortes estímulos pré-ganglionares e mostram padrões fásicos de comportamento de descarga.

Finalmente a informação a chega ao Gânglio cervical superior (GCS), que é um gânglio largo e fusiformes localizado na porção final rostral da cadeia paravertebral na bifurcação da carótida. Os seus tecidos alvos incluem a vascularização da cabeça e pescoço, as glândulas submandibulares e a íris do olho sendo portanto, o componente distal da via dos estímulos de controle da pressão arterial (PA) dos órgão do toráx, se tornando um processador final das informações elaboradas pelo sistema nervoso central (SNC) e um local estratégico para o controle e modulação de processos patológicos como a hipertensão (GIBBINS, 1990).

No que concerne a corrente iônica moduladora da excitabilidade neuronal BELLUZZI et al, tem demonstrado que, em GSC, essas correntes estão localizadas em potenciais de membrana que variam de 0 a -75 mV (BELLUZZI, et al., 1991 e 1986). Nestes gânglios, o potencial de repouso, que varia de -50 a -70 mV, apresentam uma resistência de membrana e uma impedâncias de entradas de 180 ± 11 M Ω e 132 ± 6 respectivamente. O gânglio cervical superior (GCS) apresenta pelo menos cinco condutâncias iônicas, duas para dentro, sendo uma de Na^+ (I_{Na}), que se caracteriza como sendo resistente a tetrodoxina (TTX) (DOGE & COOLEY, 1973; TRAUB & LLINAS, 1977; TRAUB, 1982) com limiar em -30 mV e condutância máxima em 0 mV e a outra de Cálcio (I_{Ca}), originalmente descrita por MCAFEE & YAROWSKY em 1979, e também ativada por despolarizações a -30 mV e que atinge sua amplitude máxima entre 0 e $+10$ mV, sendo totalmente desativada em -60 mV, e três condutâncias de potássio, para fora: I_{kv} , I_{A} , I_{m} .e a I_{KV} que é homologa aos retificadores retardados, e a mais lenta de menor amplitude das três condutâncias de potássio, contribuindo para o desenvolvimento do potencial de ação em neurônios simpáticos e farmacologicamente sensível a $3\mu\text{M}$ de TEA.

A corrente A (I_{A}) que foi inicialmente descrita por HAGIWARA et al., 1961 em moluscos, se caracteriza por ser uma corrente de potássio transitória para fora. Subsequentemente foi esta corrente foi caracterizada por CONNOR & STEVENGNS, 1971a; e NEHER, 1971. A corrente A é uma corrente estável nas células excitáveis (ROGAWSKI, 1985; RUDY, 1988), é e completamente inativada

próximo do potencial de repouso. Estudos utilizando a técnica de clampeamento de voltagem (KOSTYUK, et al., 1981; FRESCHI, 1983; GALVAN & SEDLMEIR, 1984; SEGAL et al., 1984; BELLUZZI et al., 1985a; NERBONNE & GURNEY, 1989; GREENE et al., 1990) e patchclamp (COOPER & SHRIER, 1989; KASAI et al., 1986) têm demonstrado ser I_A uma corrente importante para a modulação do potencial de ação (DAUT, 1973; SHIMAHARA, 1981; CASSEL & MCLACHLAN, 1986) e para a construção das propriedades de código do funcionamento neuronal (CONNOR & STEVENS, 1971b; GALVAN, 1982; SAXON & SAFRONOVA, 1982; CASSEL & MCLACHLAN, 1986).

As correntes de potássio dependentes de cálcio (I_{KCa}) estão envolvidas em uma série de eventos tais como a repolarização do potencial de ação (PA), hiperpolarização pós potencial (AHP), no potencial de repouso e na atividade espontânea de marcapasso. Correntes de potássio dependentes de cálcio (GARDOS, 1958; MEECH & STANDEN, 1975) são uma constante nas células excitáveis (BLATZ & MAGLEBY, 1987) levando vários autores a estudar e atribuir muita importância ao sistema de condutância $I_{Ca} - I_{KCa}$, em neurônios simpáticos de mamíferos (FRESCHI, 1983; GALVAN e SEDLMEIR, 1984; BELLUZZI et al., 1985b; HIRST et al., 1985). As correntes de potássio ativadas por cálcio têm sido analisadas usando patchclamp (SIMONNEUA et al., 1987; SMART, 1987; MAUE & DIONNE, 1987; FRANCIOLINI, 1988; LATORRE et al., 1989). E por último dois tipos de canais de potássio o BK (I_c) (MARTY, 1981) que é estimulado por despolarização e cálcio intracitoplasmático, sendo farmacologicamente bloqueadas por tratetiletanilamina (TEA) extracelular, e mas não por apamina (AP) extracelular e o SK (BLATZ & MAGLEBY, 1986). Em neurônios mantidos em -50 mV as correntes de cálcio são encontradas na faixa de -30 a $+20$ mV. Vários autores tem hipotetizado que as correntes de potássio M (I_M), a corrente A (I_A), a corrente H (I_H) e a corrente D2 (I_{D2}) são responsáveis pela perda da acomodação, pois se situam na faixa de corrente abaixo do limiar, uma vez que as células tônicas não alteram as suas propriedades passivas.

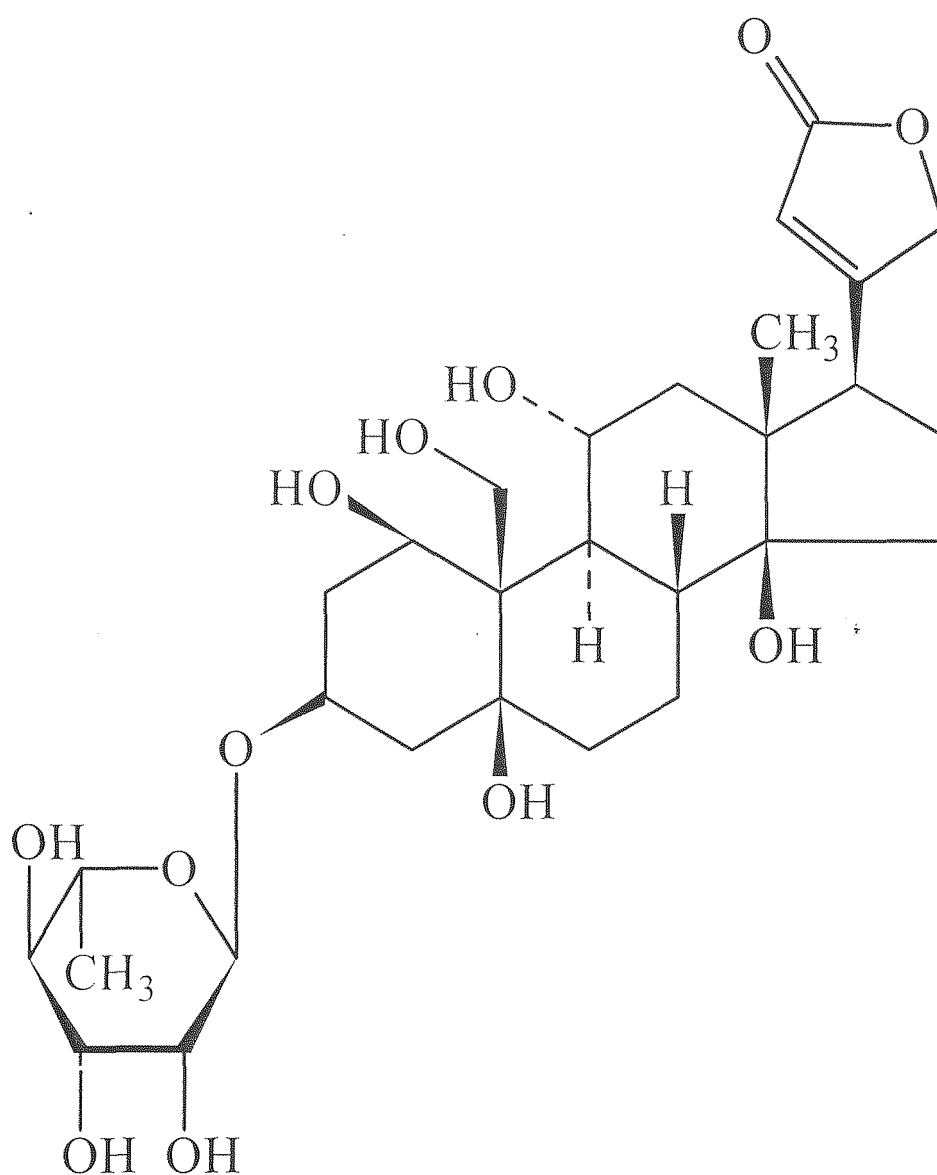
Em animais hipertensos tem-se observado que este gânglio modifica o seu padrão de disparo de fásico para tônico, perdendo a sua capacidade de

acomodação, sem entretanto alterar as suas propriedades passivas ou as características do potencial de ação (YAROWSKY & WEINREICH, 1985).

1.2 Os Esteróides e Hipertenssão

Com o advento dos neuroesteróides tem se observado que o sistema nervoso é referido na literatura como um dos tecidos alvos dos esteróides (MCEWEN, et al., 1995; PRIEST & PFAFF, 1995) podendo influenciar vários processos celulares como a sobrevivência e a diferenciação do cérebro e da medula (DE VRIES, et al., 1984), e a regeneração de nervos (JONES, 1993; YU., 1989). Estes compostos regulam também a transmissão sináptica, (MCEWEN, 1991) interagindo com receptores na membrana dos neurônios (SCHUMACHER, 1990; MAJEWSKA, 1992; BAULIEU, & ROBEL, 1995) e modulando a função das células da glia (JUNG-TESTAS, I., et al., 1991). Ao mesmo tempo tem crescido na literatura as evidências da participação de substâncias com características esteroidais, em particular a ouabaína, no processo de estabelecimento da hipertensão essencial sistêmica (HAMLYN et al., 1991). Varias células como as células da glia e as células de Schwann sintetizam esteróides, hoje chamados de neuroesteróides, devido ao fato de serem produzidos por células do sistema nervoso, não apresentando entretanto diferenças estruturais e químicas dos compostos desta classe (BAULIEU, 1991; ROBEL & BAULIEU, 1994) (Figura 1). Os esteróides cardiotônicos são utilizados na prática laboratorial como bloqueadores seletivos da bomba sódio e potássio, podendo ser em altas concentrações, ($>10^{-6}$ M) letais (FIESER & FIESER, 1959). Estes estão presente em plantas e em animais (HAMLYN et al., 1991). Desde a sua inclusão no arsenal terapêutico por William Withering em 1785, indicada para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (WITHERING, 1785), até os dias de hoje, foi a participação da ouabaína no processo de manutenção da hipertensão essencial sistêmica, através da sua produção endógena, o achado mais desafiador relacionado a estes compostos.

Figura 1 - Fórmula Química da Ouabaína, onde evidenciamos o núcleo ciclopentanofenantreno e a raminose



O termo digitálico foi incorporado em 1542 por Leonhart ("dedaleiras") (GREEFF & SCHADEWALDT, 1981; JUNG, 1986; SCHADEWALDT, 1986; SKOU, 1986) e em 1650 foi incluído na Farmacopéia Britânica (GREEFF, & SCHADEWALDT, 1981). Foi entretanto Withering que desenvolveu o primeiro ensaio clínico cuidadoso do extrato da *Digitalis purpúrea* (WITHERING, 1785; SKOU, 1986), estabelecendo assim os parâmetros para a sua utilização na insuficiência cardíaca congestiva. Entretanto, haviam registros do uso da *D. purpúria* no Papiro de Erbes e no Corpus Hippocraticum (400 B. C.) recomendando-os (1500 B. C.) para induzir diurese (GREEFF & SCHADEWALDT, 1981; MOVITT, 1949) sendo assim do conhecimento dos romanos, egípcios e gregos (FIESER & FIESER, 1959; GREEFF & SCHADEWALDT, 1981). Os Chineses e Japoneses usam a pele dos sapos em preparações para o tratamento de edema (FIESER & FIESER, 1959). Porém a ouabaína extraída da raiz e caule da planta Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*) no leste da África (Somali) e de sementes de *Strophanthus gratus*, descrita pelo botânico francês Descandolle (MOVITT, 1949), não é usada via oral por ser altamente hidrossolúvel (GREEFF & WIRTH, 1981) afastando assim a possibilidade de que os níveis séricos de ouabaína encontrados em pacientes hipertensos, se devam a absorção por esta via e originados de vegetais. O botânico John Kirk na expedição de Livingstone's Zambesi no leste da África (1858 -1864), se auto administrou o veneno das pontas de lanças ("*kombi*" or "*strophanthin k*") extraído das sementes do *S. kombe*; e registrou uma desaceleração no seu pulso (LIVINGSTONE & LIVINGSTONE, 1865). Coube a Fagge e Stevenson (FAGGE & STEVENSON, 1865) mostrarem que esta substância causava uma parada cardíaca em sapos e pelicanos (PELIKAN, 1865) e estabelecerem as similaridades com o extrato da *Digitalis Purpurea*. Em 1888, Arnaud (FAGGE & STEVENSON, 1865) descobriu e denominou de ouabaína o veneno da ponta de lanças isolada da raiz e casca da árvore da Ouabaio e estabeleceu a semelhança entre a árvore Ouabaio com o um princípio isolado, o Strophanthus do *Strophanthus gratus*, obtido de um povo indígena do Gabão situado no oeste da África (JACOBS & BIGELOW, 1932). Foram entretanto Arnaud, Jacobs e Bigelow que descreveram a fórmula para a ouabaína (JACOBS & BIGELOW, 1932; FAGGE & STEVENSON, 1865), permitindo assim que os efeitos dos esteroídes cardiotônicos sobre o coração

fossem bem determinados, (CATTELL & GOLD, 1938). O mecanismo entretanto só foi estabelecido entre as décadas de 50 e 60, quando Wood e Moe (WOOD & MOE, 1942) demonstraram que este efeito se devia a diminuição de potássio intracelular, e subsequentemente em 1953, Schatzmann (SCHATZMANN, 1953), estabeleceu que estes compostos eram potentes bloqueadores da bomba de sódio. Este fato foi posteriormente confirmado por Skou (SKOU, 1957).

Os receptores para a bomba de sódio estão amplamente distribuídos por toda a escala filogenética chegando até aos níveis filogeneticamente mais simples os, celenteratos (CAURLELD et al., 1992; MILANICK, 1992; PARKER, 1989). Estruturalmente, a bomba de sódio é composta de unidades Alfa (α), Beta (β) e Gama (γ), sendo a subunidade catalítica α o sítio de ligação entre a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase e os esteróides cardiotônicos (STC) como a ouabaína (SVEADNER, 1989). Quatro subtipos da unidade alfa (α) tem sido identificadas em mamíferos (PRESSLEY, 1992; SHAMRAJ & LINGREL, 1994; SHULL et al., 1986; TAKEYASU, et al., 1990), porém três são expressos em tecidos nervosos (BLANCO et al., 1990; JEWICIL, & LINGREL, 1991, e THENEN, et al., 1996), sendo a sua afinidade aos esteróides cardiotônicos uma característica que as difere entre si (SVEADNER, 1989). As unidades α_2 e especialmente a α_3 têm alta afinidade para a ouabaína em todos os vertebrados, com uma IC_{50} localizada na faixa de 10 a 500 nM. As unidades α_1 , particularmente em ratos, tem uma baixa afinidade para ouabaína com IC_{50} maiores que 100 000 nM (BLANCO et al., 1990). O padrão de expressão se diversifica entre os tipos celulares, porém todas as células incluindo os neurônios e a glia expressam α_1 . A glia, além de expressar α_1 , também expressa α_2 , porém, não observamos a presença da subunidade α_3 nestes tipos celulares (BLANCO et al., 1990; MCGRAIL, et al., 1991). Os neurônios expressam α_1 e α_2 e também a α_3 (BLANCO et al., 1990; PIETNNI, et al., 1992). Esta distribuição confere as células uma especialização e uma capacidade de responder diferenciadamente a presença de STC sejam eles endógenos ou exógenos (BLAUSTEIN & HAMLYN, 1991). A unidade α_1 é responsável pela manutenção de $[\text{Na}^+]_i$ baixo no interior da célula e o alto $[\text{K}^+]_i$ no citoplasma (BLAUSTEIN & HAMLYN, 1991), e as α_2 em astrocitos e α_3 em

neurônios estão localizadas na borda que margeia o retículo endoplasmático e em estreita associação com a troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (BLANCO et al., 1990; JUHASZOVA & BLAUSTEIN, 1997). Esta distribuição promove alterações importantes sobre o comportamento da $\text{Na}^+ -\text{K}^+$ ATPase em situações fisiológicas e em patológicas, permitindo a célula estabelecer a homeostase (BLAUSTEIN, 1993; JUHASZOVA & BLAUSTEIN, 1997). Portanto utilizando-se da afinidade da ouabaína pelas unidades alfa (α) é possível estabelecer que alterações fisiológicas produzem estes compostos em neurônios (LEVENSON, 1994). Esta distribuição, inclusive, explicar a sua participação no processo de excitação neuronal, demonstrado nos trabalhos de McCaren e Alger (MCCARREN & ALGER, 1987), em fatias de hipocampo cuja exposição de ouabaína resulta em hiperexcitabilidade destas células, sem alterar as características do potencial de ação. Estes fatos estão indicando que estas alterações não se processam em correntes acima do limiar. Alguns autores estabelecem uma estreita relação entre a ouabaína e os hormônios da cortex suprarenal (HAMLYN, et al., 1991; LUDENS et al., 1992), além de apresentarem evidências de que uma série de compostos similares à ouabaína, podem ser produzidos endógenamente, chamados de substâncias digitálicas-símile (SDS) (SZENT-GYORGYI, 1953; THORP & COBBIN, 1967). Porém, foi a descoberta do cotransporte de Na^+ e Ca^{+2} em 1960, em axônios de invertebrados marinhos (BAKER & BLAUSTEIN, 1968; BAKER et al., 1969; BLAUSTEIN & HODGKIN, 1969), em músculo cardíaco de mamíferos (REUTER & SEITZ, 1968), e em músculo liso vascular (REUTER et al., 1973), que permitiu a associação entre a inibição da bomba de sódio e o efeito inotrópico dos agentes glicosídeos cardiotônicos (BAKER et al., 1969; EISNER & SMITH, 1992; WRAY, et al., 1985), permitindo que Haddy & Overbeck (HADDY & OVERBECK, 1976) sugerissem que as substâncias endógenas digitálicas similares (SEDS) tinham um papel importante no aumento da pressão arterial por ingestão excessiva de sal (BLAUSTEIN, 1977; BLAUSTEIN, 1977), levando ao processo de hiperreatividade do simpático (NAGATSU et al., 1976; NAKAMURA & NAKAMURA, 1977; MATSUMOTO, 1967; LAIS et al., 1977; LAIS et al., 1974).

A presença de um fator purificado de rins com atividade inibidora de ATPase renal (HAMLYN et al., 1982) foi a primeira evidência da existência dos

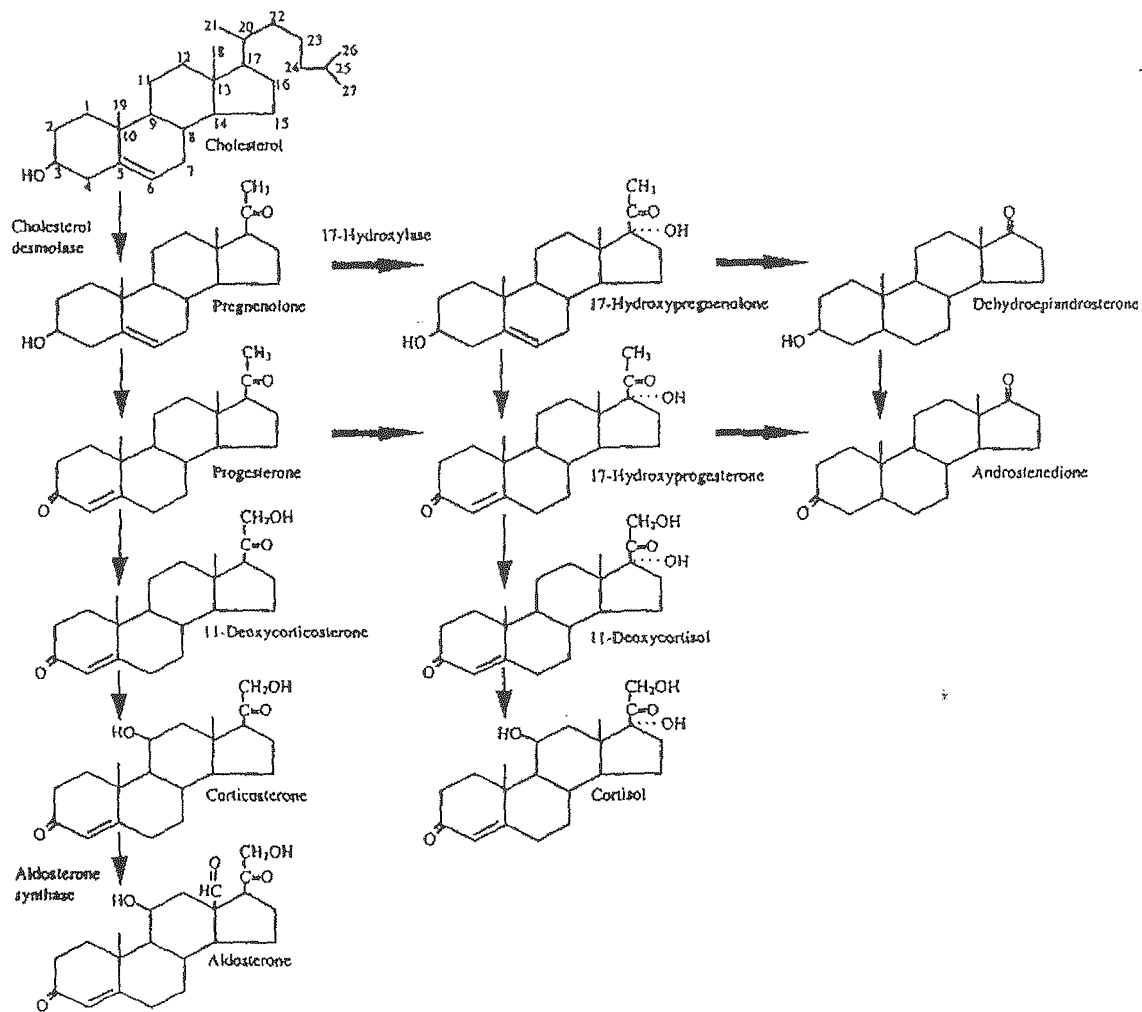
SEDS e de hipertensão, reforçada mais tarde pela purificação de ouabaína de plasma humano (HAMLYN et al., 1991). Altas concentrações de ouabaína em adrenais humanas, de ratos e de vacas (HAMLYN, et al., 1991; GOTO et al., 1992; SCHONER, 1992) e estruturas ouabaína similares que aparecem em perfis cromatográficos, associado ao fato destas substâncias apresentam a mesma reatividade imunológica com os esteróides originados de planta (GOTO et al., 1988; TAMURA et al., 1988), descritas por vários autores (GOTO et al., 1988; HAMLYN, et al., 1985; SCHONER, 1992) (Figura 2) confirmam que estes compostos endógenos apresentam semelhanças estruturais marcantes. Aliada estes fatos, a sua origem na suprarenal e a existência de compostos ouabaína-símile é reforça ainda mais (TAMURA, et al., 1988) quando analisamos os níveis arteriovenosos de ouabaína (BOULANGER et al., 1993), em animais adrenalectomizados (LUDENS et al., 1992). Foi, entretanto, a existência de uma caso de hipertensão associado a um adenoma cortical de adrenal (MANUNTA et al., 1992), produtor de ouabaína, causador de hipertensão, que tornou irrefutável a existência dos compostos ouabaína-símile. Entretanto a ouabaína endógena pode ser detectada em outros sítios como o cérebro (hipotálamo), hipófise, coração e rins (HAMLYN, et al., 1991).

O processo de estímulo da sua secreção não esta ainda consolidado mas uma dieta rica em sal é um fator estimulador (MANUNTA et al., 1992) e o processo de regulação das concentrações séricas estão sujeitas a um feedback mediado por receptores diferentes da bomba de sódio existente na suprarenal (WARD et al., 2002). O cérebro (hipotálamo) também, pode estimular a secreção de ouabaína, sempre que lhe for infundido soluções com altas concentrações de sódio (JANDHYALA & ANSARI, 1986; MANUNTA, et al., 1992), ou angiotensina II, como observado em cachorros (BUCKLEY et al., 1986) e ratos (BALDA et al., 1986). A secreção de ouabaína pode ser bloqueada por inibidores de angiotensina II, como a saralasin (BALDA et al., 1986). Portanto alguns autores são levados a dizer que é a expansão de volume que estimula a liberação de ouabaína, via resposta do cérebro (hipotálamo) liberando hormônio antidiurético (ADH) (ROBERTSON, 1976) e hormônio atrial natriurético, ou através da via nervosa que estimularia as adrenais (SONGU-MIZE, et al., 1990). Entretanto, a secreção de

ouabaína pela células corticais é inibida por meios ricos em potássio extracelular (HAMLYN, et al., 1991; BAKER & WILLIS, 1972). Recentemente, a literatura científica demonstrou que em duas faixas extracelulares de potássio que variavam de 0 até 10 mMol/L (primeira faixa) e acima de 40 mMol/L (segunda faixa), estimulava-se a ligação da ouabaína à bomba sódio-potássio ATPase de células adrenocorticais bovinas.

Já em concentrações entre 20 mMol/L a 40 mMol/L estimulando a ligação da ouabaína ao receptor localizado no cortex das adrenais. (WARD, HAMILTON & HAMLYN, 2002). Ao contrário, os glucocorticoides e mineralocorticoides, que tem a sua liberação estimulada nas células adrenais corticais (HANING et al., 1970) por meios ricos em potássio despolarizam estas células levando ao aumento de cálcio no citoplasma (QUINN et al., 1988; SPAT et al., 1991). Pequenas doses de ouabaína levam ao aumento da liberação de glucocorticoides e mineralocorticoides (BRALEY & WILLIAMS, 1978). Concentrações de ouabaína ($<10^{-7}$ M) (BAKER & WILLIS, 1972; FORBUSH, 1983; SCHATZMANN, 1953; SKOU, 1960) próximas as encontradas endógenamente (0.2-0.7 nM) (HOFFMAN & BIGGER, Jr., 1990; BROWN, & ERDMANN, 1984) causam um ganho de sódio e uma perda de potássio. Alguns autores afirmam que a partir de estudos em músculo liso arterial as alterações de transporte iônico através da membrana celular se restringem a promover uma corrente de Ca^{+2} para dentro (BELARDINELLI et al., 1979). Outros têm lançado à hipótese de que a bomba de sódio possa ser estimulada (BAKER & WILLIS, 1972; ELLIS, 1977; HAMLYN et al., 1985; LEE & DAGONTINO, 1982; SHEU & BLAUSTEIN, 1992), como é observado quando reduzimos a concentração extracelular de K^{+} ou Na^{+} , em gânglio nodoso. Entretanto o aumento de Na^{+} é condição inicial para que se tenha um aumento secundário de Cálcio.

Figura 2 – Rotas metabólicas de síntese dos hormônios da cortex suprarrenal



2 OBJETIVO

Este trabalho pretende estudar o efeito das concentrações nanomolares de ouabaína sobre a excitabilidade do GCS que é a estrutura com funcionamento simpático mais distal na rota eferente do simpático para o controle do coração e da musculatura lisa dos vasos, uma vez que a ouabaína está presente no plasma de pacientes hipertensos.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Drogas e Soluções

A solução nutritora de Locke tinha a seguinte composição em mM: NaCl 140, KCl 5,6, NaHCO₃ 16,3 , NaH₂PO₄ 1,3 , CaCl₂ 2 MgCl₂ 1,2 e glicose 1,4 g por litro, e o pH ajustado para 7,4 com HCl 1M ou NaOH a 1M.

A solução de Hanks (Hank' balance Salt Solution (HBSS)) com seguinte composição em g/L: KCl 0,40; KH₂PO₄ 0.06; NaCl 8.0; NaHCO₃ 0,35; Na₂HPO₄. 7 H₂O 0,09; d-Glucose 1 e vermelho de fenol 0,01 e o pH ajustado para 7,3, era preparada e estocadas em garrafas a 4 °C. Esta solução se destinava a receber os gânglios, para a retirada da cápsula que os revestia após a retirada desses por cirurgia.

A solução "Earl's Balance Salt Solution" ((EBSS) 10 X concentrada, com seguinte composição em g/L: CaCl₂ 2,0, KCl 4,00, MgSO₄ .7 H₂O 2,00, NaCl 68,0 NaH₂PO₄. H₂O 1,40 e Glicose 10,00, era preparada através da diluição de uma solução concentrada 10 vezes de EBSS em um becker com capacidade para 100 ml e, logo em seguida, da adição de 70 ml de água destilada e 1 ml de HEPES 1 M (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo, USA) e 0,36 gramas de glicose. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH e, em seguida, eram adicionados 0,22g de NaOH, ajustam a osmolaridade para 308 mMol/kg, e, finalmente completado o volume para 100ml de água destilada. Para garantir a esterilidade, esta solução era então filtrada em um filtro estéril, com membrana 0,22 µM e capacidade de 115 ml (Corning) e estocada em tubos tipos falcons de 15 ml (Falcon). Esta solução se

destinava a dissolução das enzimas a serem utilizadas na dissociação enzimática dos neurônios gânglionares

A Solução enzimática era composta de 10mg de Colagenase Tipo 1A (Sigma), tripsina 5 mg (Sigma) e 10 mg de Dispase (grade II Boering Mannheim) dissolvidas em 10ml de EBSS, previamente descrito, em tubos falcons de 15 ml. Em seguida ela era filtrada em filtros de seringas 0,2 μ m (Milipore) antes do uso.

O meio de cultivo das células foi adicionados a um tubo falcon com capacidade para 50 ml 10 ml de Soro bovino fetal a 90 ml de Minimum Essential Medium (MEM - (Gibco)) com seguinte composição em mg/L: CaCl₂ 200, KCL 400 MgSO₄ 98.00, NaCl 6800, NaHCO₃ 2200, NaH₂PO₄ H₂O 140, D-Glucose 1000, L-Arginina HCl 126, L-Cistina 2 HCl 31, L-Histidina HCl H₂O 42, L-Isoleucina 52, L-Leucina 52, L-Lisina HCl 73, L-Metionina 15, L-Fenilalanina 32, L-Treonina 40, L Triptofano 10, L-Tirosina • 2Na 2H₂O 52, L Valina 46, D-Ca Pantotenato 1.0, Cloreto de colina 1.0, Ácido fólico 1.0, inositol 2.0. Niacinamida 1.0, Piridoxina HCl 1.0, Riboflavina 0.10 e Tiamina HCl 1.0, ou Leibovitz's (L15 - (Gibco)) com seguinte composição em mg/L: CaCl₂ 140.0, KCL 400.00, KH₂PO₄ 60, MgCl₂ 94 MgSO₄ 98.00, NaCl 800.00, NaH₂PO₄ 190, D-galactose 900, Piruvato de Sódio 550, L-Arginina 225, L- Arginina 500, L-Asparagina 250, L-Cisteína 120, L-Glutamina 300, Glicina 200, L-Histidina 250, L-Isoleucina 250, L-Leucina 125, L-Lisina 75, L-Metionina 75, L-Fenilalanina 125, L-serina 200, L-Treonina 300, L Triptophano 20, L-Tirosina 302, L-Valina 100, D-Ca Pantotenato 1.0 Cloreto de colina 1.0, Ácido fólico 1.0, inositol 2.0, Niacinamida 1.0, Piridoxina HCl 1.0, Riboflavina -5'-fosfato 2 H₂O 0.10 e Tiamina monofosfato 1.0. Estes meios eram usados, conforme o protocolo, e filtrado em filtro com capacidade para 115 ml e membrana de 0,2 μ m (Corning).

As lamínulas utilizadas pelas células na adesão eram tratadas com 10 mg de poly-l-lisina (Sigma), que eram dissolvidas em 100 ml de um tampão de borato de sódio 0,1 M, pH de 8,0 ajustado com HCl 1M e filtrado em filtros com capacidade para 115 ml (Corning) e estocado em tubos falcons com capacidade para 14 ml (Falcon).

A ouabaína (Sigma) era dissolvida diluída para 10nM ou 1mM, a partir de uma solução estoque de 10 mM.

A dihidroouabaina (Sigma) era dissolvida diluída para 10nM, a partir de um estoque de 1 mM.

A Raminose (Sigma) era dissolvida diluída para 10 nM ou 1 mM, a partir de um estoque de 10 mM.

3.2 Protocolos Experimentais

3.2.1 Remoção do gânglio cervical superior

Foram utilizados ratos *wistar* de peso entre 250 a 300 g, do biotério da escola de medicina da universidade de MARYLAND, que eram sacrificados através da inalação de CO₂. Após o sacrifício, o animal era fixado dorsalmente, em uma mesa cirúrgica, através das suas quatro patas e cabeça por fixação com agulhas 40 x 12. Logo em seguida iniciava-se uma incisão na linha mediana, na altura do diafragma, até o queixo, e assim rebatendo-se pele para a lateral e, fixando-a na mesa de dissecação, expunha-se a musculatura até o pescoço. Utilizando um microscópio de dissecação, a artéria carótida era identificada bilateralmente e, seguindo em direção ao crânio, localizava-se a sua bifurcação. O gânglio cervical superior se encontra entre a carótida interna e externa. O gânglio era dissecado e destacado do tecido que o rodeava e colocado em uma placa de petri contendo HBSS gelado (previamente descrito) 4 °C, e fixado com alfinetes para entomologia (100 µm) para se retirar a cápsula que o reveste. O gânglio, agora desencapsulado, era transferido para um tubo falcon de 15 ml, com auxílio de uma pipeta pasteur de ponta polida, contendo 10 ml da solução enzimática de dissociação (anteriormente descrita).

3.2.2 Desagregação Enzimática

A solução enzimática descrita anteriormente (vide drogas e soluções) era aerada com mistura carbogênica 95% O₂ e 5% CO₂ por 1 minuto e fechado. Em seguida este frasco era colocado para agitar em um banho com agitação a 340 agitações por minutos a uma temperatura de 35 °C, por um período de 1 hora. Após este tempo o gânglio era agitado vigorosamente por 10 segundos. Para inativação da solução de dissociação enzimática, se adicionou 5 ml de meio completo, previamente aquecido a 37°C. Os 15 ml originados nos processos técnicos anteriores, eram agora colocados em uma centrífuga a uma velocidade de 50 g por 5 minutos à temperatura ambiente, para em seguida se desprezar o sobrenadante e se adicionar 10 ml de meio completo pré-aquecido a 37°C. Este processo era repetido mais uma vez. O precipitado obtido era agora resuspenso em 1,8 ml de meio completo. Em seguida os neurônios eram plaquados em 150 µl em lamínulas circulares de 35 mm, tratadas com poli-L-lisina (Sigma) e colocadas em placas de 24 poços. Em seguida a lamínula era colocada para aderir por duas horas em estufa a 37 °C e em atmosfera a 5% de CO₂. Transcorrido o processo de adesão, se completa com meio o volume para 500 µl, estando as células prontas para o empalamento.

3.2.3 Eletrofisiologia

Os registros intracelulares foram realizados com microeletrodos de vidro fabricados com capilares de alumíniosilicato (1.0 mm od , 0,75 mm (WPI, Comp New Haven CT) utilizando um puxador horizontal de eletrodo modelo P-97 (Sutter Instrument, San Francisco, C.A). Os eletrodos apresentavam uma resistência de ponta que variavam de 40 a 100 MΩ, quando preenchidos com KCl 4 M, medidos e medidas no modo Bridge (DC). Estes eletrodos eram conectados a um

amplificador axonclamp 2B (Axon Instrument, Burlingane CA). Os sinais de saída eram monitorizados com auxílio de um osciloscópio em paralelo e os protocolos de estimulação eram gerados, os dados estocados e posteriormente analisados com os programas de aquisição (Clampex) e análise (Clampfit) que constituem o conjunto de aplicativos p-clamp6 da Axon Instrument. A câmara era fixada na mesa do microscópio, equipada com o sistema óptico Hoffman (400X).

As lamínulas, contendo células aderidas, eram colocadas em uma câmara de perfusão, com velocidade de fluxo de 2 a 3 ml por minuto de solução nutritora de Locke a temperatura ambiente e equilibrada com 5% de CO₂ e 95% de O₂.

A célula, para ser incluída no estudo, deveria apresentar no mínimo um potencial de ação com 70 mV de amplitude, um "overshoot" de pelo menos 20 mV, uma resistência mínima de membrana de 40 mΩ e um potencial de repouso de pelo menos - 50 mV. As propriedades passivas dos neurônios simpáticos foram determinadas pela injeção de um pequeno pulso hiperpolarizante de corrente de 0,1 nA a partir do potencial de repouso - 60 mV.

Para estimulação da preparação aplicaram-se ondas quadradas ou rampas de corrente através do microeletrodo intracelular. Para a medida da resistências de entrada de membrana (R_i), ondas quadradas tiveram a duração de 400 ms para que a resposta de voltagem atingisse um estado estacionário e amplitude de corrente de 0,1 nA de modo que a voltagem não variasse mais que 10 mV. Em seguida eram medidos o potencial transmembrana de repouso em presença de clampeamento contínuo de corrente ($E_{m,h}$), a corrente de clampeamento basal (I_h) e o limiar de corrente (I_{th} (limiar de corrente para desencadeamento de um potencial de ação)). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos pela célula após ser estimulada por uma rampa de 0,4 nA de amplitude e duração de 800 ms (nAP_{ramp}) com uma inclinação de 1,4 pA, e uma onda quadrada de corrente, de duração de 400 ms e de amplitudes, duas vezes o limiar ($nAP_{2xI_{th}}$) e três vezes o limiar ($nAP_{3xI_{th}}$).

3.3 Análises Estatísticas

Os resultados são representados como média \pm erro padrão da média (n), onde n é o número de experimentos. São considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menos que 5% ($p < 0,05$). Para comparação das médias foram utilizadas teste t, pareado ou não, Anova ou outros testes apropriados, realizados através do programa de computador Sigma Stat versão 1.0 (JANDEL Corporation 1992 a 1994).

3.3 Análises Estatísticas

Os resultados são representados como média \pm erro padrão da média (n), onde n é o número de experimentos. São considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menos que 5% ($p < 0,05$). Para comparação das médias foram utilizadas teste t, pareado ou não, Anova ou outros testes apropriados, realizados através do programa de computador Sigma Stat versão 1.0 (JANDEL Corporation 1992 a 1994).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito de concentrações nanomolares de ouabaína sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos

4.1.1 Neurônios superfundido com Locke contendo $[K^+] = 4,7 \text{ mM}$

4.1.1.1 Neurônios cultivados com Leibovitz's sem fenol red, e superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 4,7 \text{ mM}$

Neurônios agudamente dissociados foram mantidos em $150 \mu\text{l}$ de meio de cultura Leibovitz's (L15) por 120 minutos (2 hs), para que ocorresse o processo de adesão à lamínula tratada com poly-L-lisina colocada em um poço de uma placa com 24 poços e, transcorrido este período, o meio foi completado para $500 \mu\text{l}$. Em seguida os neurônios de um grupo (controle, Tabela - 1 L15047), foram removidos do meio de cultura e superfundidos com solução nutritora de Locke com $[K^+] = 4,7 \text{ mM}$ por um período de 10 minutos, para que estabilizasse, após o qual foram colhidos os seguintes parâmetros eletrofisiológicos: E_{mh} , R_i , I_h , I_{th} (vide eletrofisiologia 2.2.3). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos pela célula após ser estimulada nAP_{ramp} , nAP_{2xIth} , nAP_{3xIth} (vide eletrofisiologia 2.2.3). Em outro grupo de neurônios (grupo experimental), também cultivados com L15, após o processo de adesão de 120 minutos, o seu volume de meio foi completado para $500 \mu\text{l}$ com L15 contendo ouabaína, cuja concentração final atingiu 10 nM , que foi mantida por 60 minutos (1h). Após a exposição à ouabaína, estes neurônios também foram estabilizados por 10 minutos em solução nutritora de Locke com $[K^+] = 4,7 \text{ mM}$ (OUABL15047), para em seguida se realizar a coleta dos parâmetros eletrofisiológicos. Todos os

neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60 mV através do clampeamento de 30 nA (I_h) no grupo controle (L15047), e 19 nA no OUABL15047 (Tabela – 1), valores estes que foram significativamente diferentes. Os parâmetros de R_i e I_{th} que foram obtidos no grupo experimental, (OUABL15047), $53,6$ $M\Omega$ e 132 pA, respectivamente (Tabela – 1) não foram estatisticamente diferentes dos seus respectivos controles. A excitabilidade neuronal foi aumentada, pois se demonstram significativamente alterados os parâmetros (Figura 3 e 4) quando comparamos os valores de potenciais em nAP_{2xlth} e nAP_{3xlth} , enquanto que a nAP_{ramp} não foi estatisticamente significante diferente do controle, (Figura 5).

Tabela 1 – Dados sumarizados dos efeitos de ouabaína 10 nM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados e cultivados em L15, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos

Parâmetros	L15047 ^a	OuabL15047 ^b	P ^c
E_{mh} (mV)	-60 ± 0	-60 ± 0	-
R_i (M Ω)	$54 \pm 6,30$	$54 \pm 4,30$	0,962
I_h (nA)	$30 \pm 6,00$	$19 \pm 0,15$ *	0,007
I_{th} (pA)	$173 \pm 42,40$	$132 \pm 21,90$	0,396
nAP_{ramp}	$4,5 \pm 1,15$	$8 \pm 1,80$	0,161
nAP_{2xlth}	$1,7 \pm 0,21$	$4,6 \pm 0,54$ *	0,0001
nAP_{3xlth}	$2,3 \pm 0,40$	$6,5 \pm 0,73$ *	0,0001
N	10	11	-

a – L15047- Células cultivadas em L-15 sem fenol red e superfundidas com Locke contendo $4,7$ mM de potássio

b – OUABL15047 – Células cultivadas em L-15 sem fenol red e expostas a ouabaína 10 nM durante 1 hora e superfundidas com solução de Locke com $4,7$ mM de $[K^+]$

c- probabilidade de que um dado valor de L15047^a seja igual ao valor correspondente de OuabL15047^b teste t não pareado.

* $p < 0,05$ (significativamente diferente do valor correspondente em L15047^a, teste t não pareado).

Figura 3 Efeito da concentração nanomolar de ouabaína (10 nM) sobre a excitabilidade neuronal de neurônios agudamente dissociados de GCS, e cultivados com L15, estimulados com uma rampa de corrente despolarizante e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio. A e B mostram traçados experimentais de neurônios com potencial de repouso mantido em -60 mV através do clampeamento contínuo de 30 nA (em A) e 19 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em meio L15 sem ouabaína (em A) e com ouabaína 10 nM (em B) e depois transferidos para câmara de superfusão com Locke contendo 4,7 mM de $[K^+]$ para o registro eletrofisiológico. Em A e B: o traço superior representa a resposta de voltagem e, o inferior, a rampa estimulante de corrente intracelular, com 0,4 nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de corrente de 1,4pA/ms e 800 ms de duração.

Figura 3

A)

40 mV

250 ms

0,4 nA

253 ms

B)

40 mV

250 ms

0,4 nA

253 ms

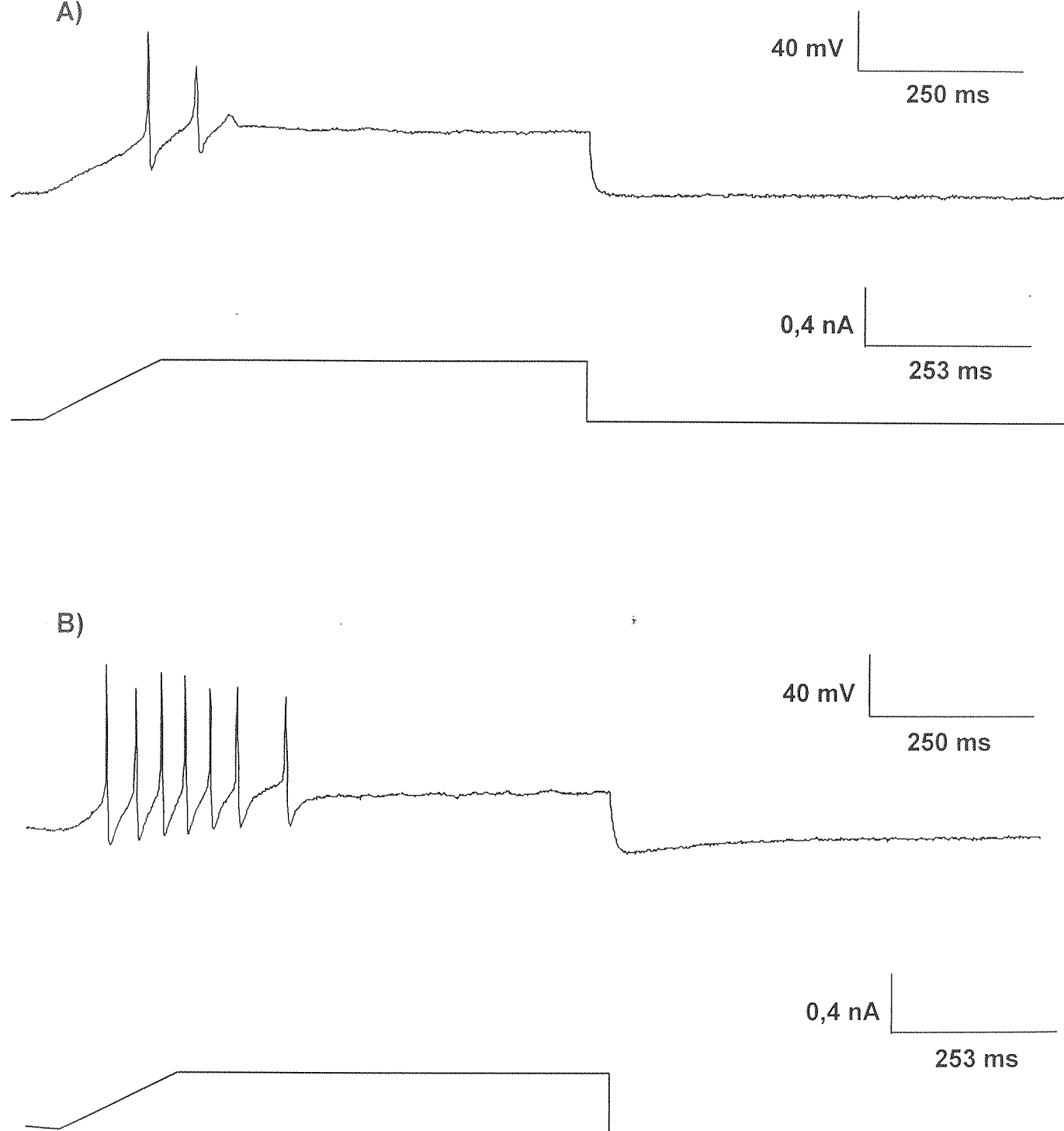
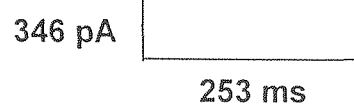
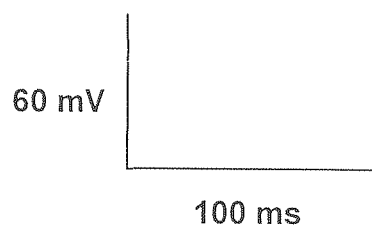


Figura 4 Efeito da ouabaína em concentração de 10 nM sobre a excitabilidade neuronal de neurônios agudamente dissociados de GCS, e cultivados com L15, estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar de corrente e superfundido com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio. A e B mostram traçados experimentais obtidos em neurônios com potencial de repouso mantido em -60 mV através do clampeamento contínuo de 20 nA e de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em L15 com (em A) e sem (em B) ouabaína 10 nM e depois transferidos para câmara de registro e superfundidos com solução de Locke contendo 4,7 mM de $[K^+]$ durante o registro eletrofisiológico. Em A e B: o traço superior representa a resposta de voltagem e, o inferior, o pulso estimulante (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms, injetada a partir do meio intracelular).

Figura 4

A)



B)

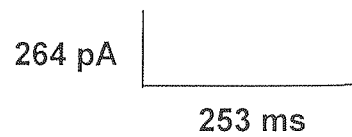
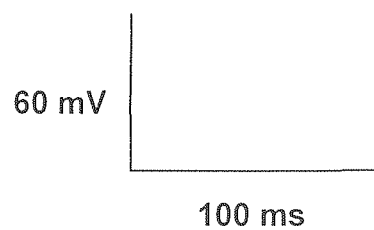
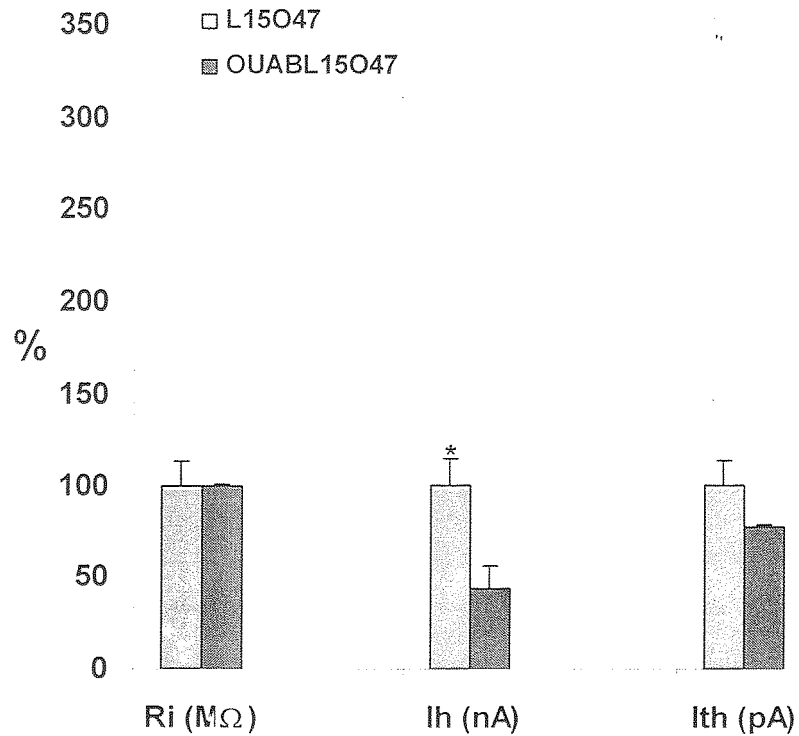
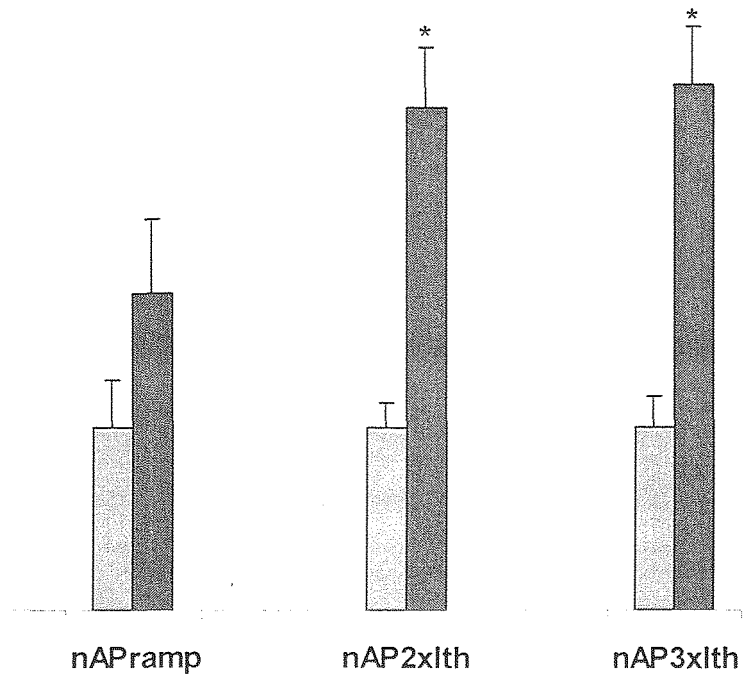


FIGURA 5 EFEITO DE OUABAÍNA 10 nM SOBRE AS PROPRIEDADES PASSIVAS E EXCITABILIDADE EM NEURÔNIOS AGUDAMENTE DISSOCIADAS DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE RATOS ADULTOS, CULTIVADOS EM L15 E SUPERFUNDIDOS COM LOCKE CONTENDO 4,7 mM/L DE POTÁSSIO. R_i ($M\Omega$), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA), CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO EM -60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA; nAP_{2xith} NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO DOBRO DO LIMIAR; nAP_{3xith} , NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE $0,4$ nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE $1,4$ pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA; *, SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE ($p < 0,05$; TESTE t NÃO PAREADO).





4.1.1.2 Neurônios cultivados com Minimum Essential Medium sem fenol red, e superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 4,7$ mM:

Neurônios agudamente dissociados e, após a dissociação cultivados por 120 minutos (2hs) em 150 μ l, de Minimum Essential Medium (MEM), para que ocorresse a adesão, teve o seu volume completado para 500 μ l de MEM, e se constituiu o grupo controle (MEM047 (Tabela 2). Estes foram removido do meio de cultura e superfundidos com solução nutritora de Locke com $[K^+] = 4,7$ mM por 10 minutos para estabilizar, após o qual foram colhidos os seguintes parâmetros eletrofisiológicos: E_{mh} , R_i , I_h , I_{th} (vide eletrofisiologia 2.2.3). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos pela célula após ser estimulada por nAP_{ramp} , nAP_{2xIth} e nAP_{3xIth} (vide eletrofisiologia 2.2.3). Em outro grupo de neurônios, OUAB10nM47 (Tabela - 2), também cultivados com MEM, após o processo de adesão, completou-se o volume do meio dos neurônios para 500 μ l, ao qual, simultaneamente, se adicionou ouabaína em quantidade suficiente para atingir a concentração final de 10nM. Após 60 minutos (1h) de exposição, estes neurônios foram estabilizados por 10 minutos em solução nutritora de Locke com $[K^+] = 4,7$ mM, para em seguida se realizar a determinação dos parâmetros eletrofisiológicos acima especificados. Todos os neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60 mV através do clampeamento de 31 nA no grupo controle e 25 nA no grupo experimental (OUAB10nM47) (Tabela - 2), não sendo esses valores de corrente significativamente diferentes entre si. Os parâmetros de R_i e I_{th} que foram obtidos no grupo OUAB10nM47, que mediram 48,9 M Ω e 196 pA, respectivamente (Tabela - 2), não foram estatisticamente significantes em relação ao controle. Em presença de OUABAINA (10 nM) a excitabilidade neuronal foi aumentada (Figura 6 e 7), em relação ao controle, quando ela foi avaliada através de nAP_{2xIth} , nAP_{3xIth} , e nAP_{ramp} , tendo sido significativamente aumentada (Figura 8).

Tabela 2 – Efeitos obtidos em gânglios cervicais superiores de ratos adultos de ouabaína 10nM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados e cultivados em MEM

PARÂMETROS	MEM047 ^A	OUAB10nM47 ^B	P ^C
E _{mh} (mV)	- 60 ± 0	- 60 ± 0	-
R _i (M Ω)	48,33 ± 2.97	48,9 ± 3,50	0,905
I _h (nA)	31 ± 4,0	25 ± 8,0	0,542
I _{th} (pA)	288 ± 9.4	196 ± 44,0	0,442
nAP _{ramp}	1,75 ± 0.80	6,77 ± 2,60 *	0,050
nAP _{2xIth}	1,4 ± 0.19	3,9 ± 1 *	0,012
nAP _{3xIth}	1,5 ± 0.194	4,8 ± 1.5 *	0,012
N	12	9	-

a – MEM047- Células cultivadas em MEM sem fenol red e superfundidas com potássio 4,7mM.

b – OUAB10nM47 Células cultivadas com MEM sem fenol red e expostas a ouabaína 10nM por 1 hora e superfundidas em Locke com [K⁺] 4,7mM.

C – probabilidade de que um dado valor de MEM047^A seja igual ao valor correspondente de OUAB10nM47^B, teste t não pareado.

* p< 0,05 (significativamente diferente do valor correspondente em MEM047^A, teste t não pareado).

Figura 6

Aumento da excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS, produzida por concentrações nanomolares de ouabaína (10 nM), cultivados em MEM, estimulados com uma rampa de corrente, e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio. A e B mostram traçados experimentais de neurônios com potencial de repouso mantidos em -60 mV através do clampeamento contínuo de 31 nA (em A) e 25 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Os neurônios foram cultivados previamente em MEM sem ouabaína (em A) e com ouabaína 10 nM (em B) e depois transferidos para câmara de superfusão com Locke contendo 4,7 mM de $[K^+]$, para o registro eletrofisiológico. Em A e B: o traço superior representa a resposta de voltagem e, o inferior, a rampa estimulante de corrente intracelular, com 0,4 nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de corrente de 1,4 pA/ms e 800 ms de duração.

Figura 6

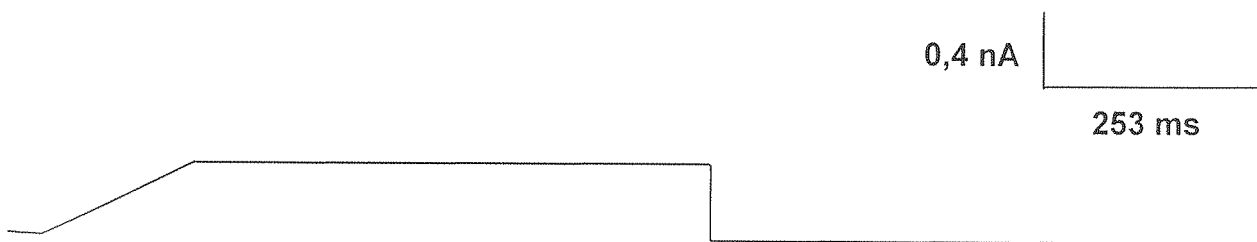
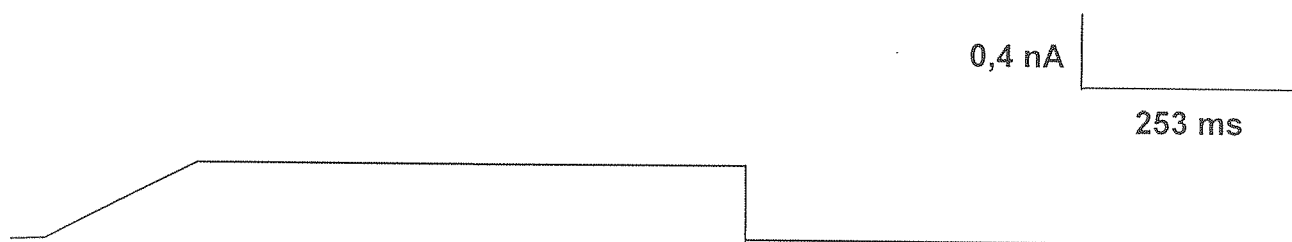
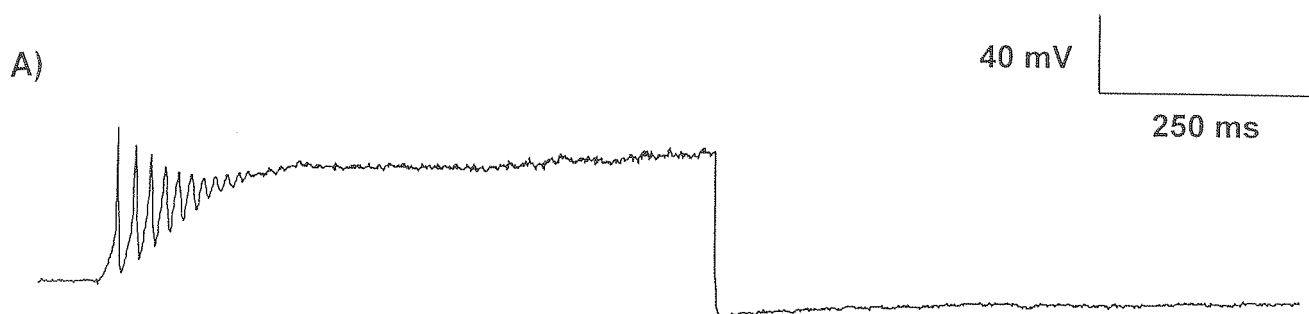


Figura 7 Aumento da excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS, produzida por concentrações nanomolares de ouabaína (10 nM), cultivados em MEM, estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar e superfundidos com Locke contendo 4,7 mM/L de Potássio. A e B mostram traçados experimentais obtidos em neurônios com potencial de repouso mantido em -60 mV através do clampeamento contínuo de 31 nA (em A) e 25 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Os neurônios foram cultivados previamente em MEM sem ouabaína (em A) e com ouabaína 10 nM (em B) e depois transferidos para câmara de supervisão com Locke contendo 4,7 mM $[K^+]$, para o registro eletrofisiológico. Em A e B, o traço superior representa a resposta de voltagem e, o inferior, o pulso estimulante (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms injetada a partir do meio intracelular).

gura 7

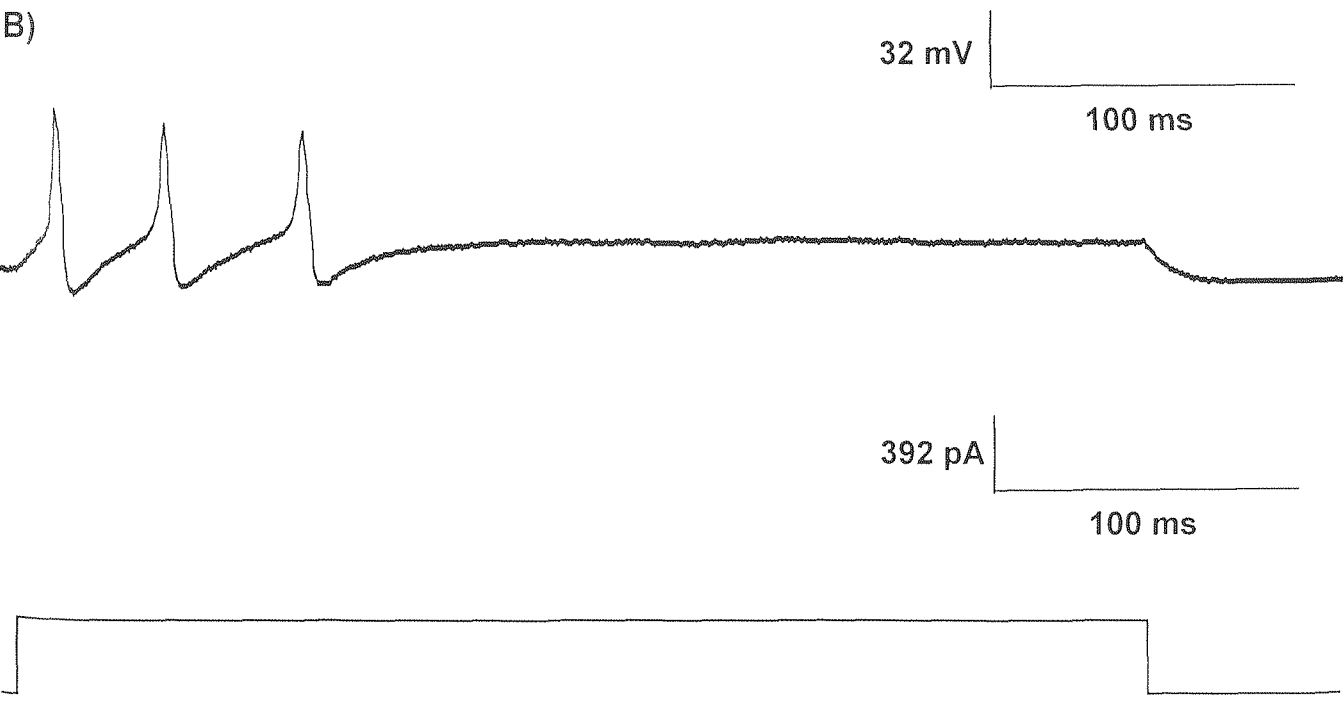
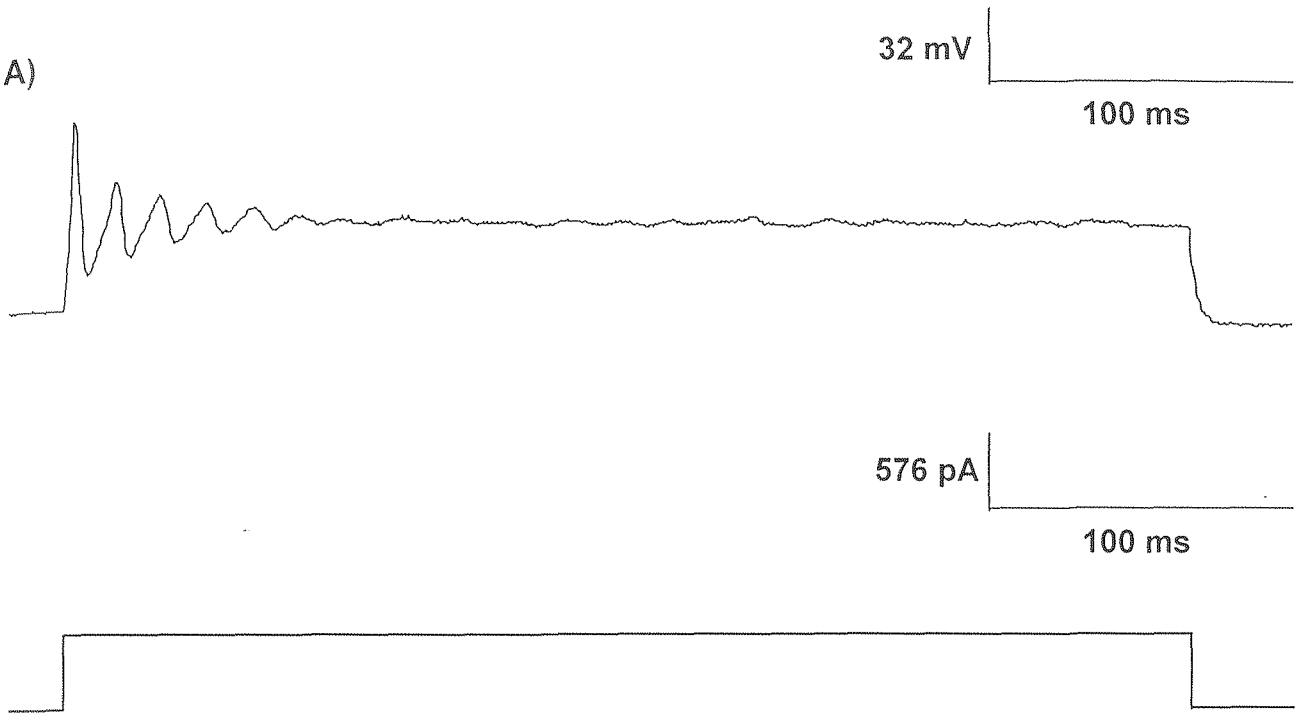


FIGURA 8

EFEITO DE OUABAÍNA 10 nM SOBRE AS PROPRIEDADES PASSIVAS E EXCITABILIDADE EM NEURÔNIOS AGUDAMENTE DISSOCIADAS DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE RATOS ADULTOS, CULTIVADOS EM MEM E SUPERFUNDIDOS COM LOCKE CONTENDO 4,7 mM/L DE POTÁSSIO. R_i ($M\Omega$), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA), CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO EM -60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA; $nAP_{2x_{ith}}$ NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO DOBRO DO LIMIAR; $nAP_{3x_{ith}}$, NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE 0,4 nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE 1,4 pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA; *, SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE ($P < 0,25$; TESTE T NÃO PAREADO).

600

500

400

% 300

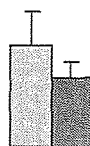
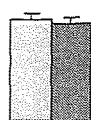
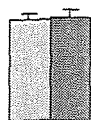
200

100

0

MEMO47

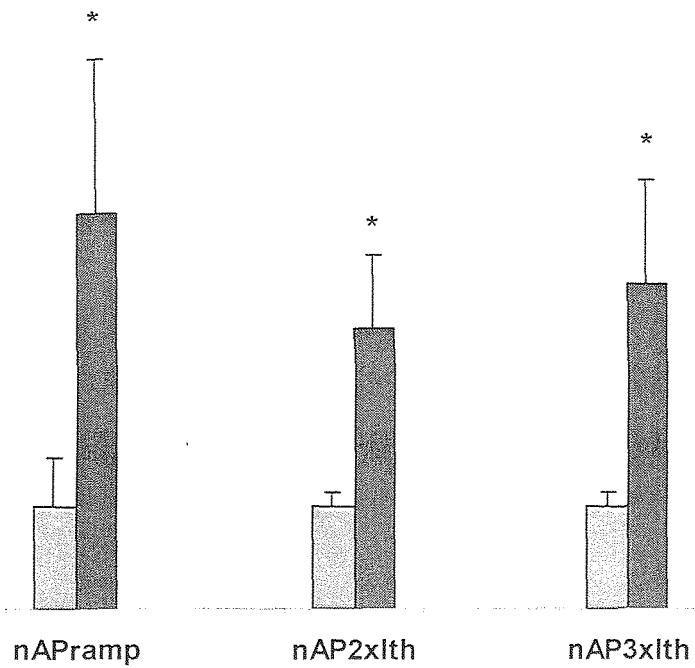
OUAB10nM47



Ri (MΩ)

Ih (nA)

Ith (pA)



4.2 Neurônios superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 5,6$ mM:

4.2.1 Efeito do potássio 4,7 mM e 5,6 mM sobre neurônios simpáticos:

Alguns autores demonstraram que a secreção de ouabaína é inibida por meios ricos em Potássio (HAMLYN et al. 1991; BAKER & WILLIS 1972). Recentemente na literatura científica demonstrou-se que as concentração de potássio extracelulares localizadas entre 0 e 10 mmol/L (primeira faixa) e 40 mmol/L (segunda faixa), estimulam a ligação da ouabaína com a bomba de sódio e potássio de células adrenocorticais bovinas, e valores de potássio entre 20 mmol/ a 40 mmol/L reduzem a ligação da ouabaína ao receptor localizado no cortex das adrenais (WARD et al. 2002). Como uma etapa prévia à investigação dos efeitos da OUABAÍNA em neurônios em diferentes concentrações extracelulares de K^+ , porém dentro de valores fisiológicos, investigou-se se a modificação da concentração de K^+ de 4,7 mM para 5,6 mM promoveria alteração na excitabilidade. Em poços com neurônios agudamente dissociados e cultivados em 150 μ l de MEM por 120 minutos, para aderir à lamínula, completou-se seu volume para 500 μ l e, após este período, um grupo de células foi removido do meio e estabilizado por 10 minutos através da superfusão com solução de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM (Tabela - 3) (MEM056). Outro grupo era superfundido com Locke $[K^+] = 4,7$ mM sendo denominado MEM047. Em seguida determinou-se em cada uma delas os parâmetros eletrofisiológicos: E_{mh} , R_i , I_h , I_{th} (vide eletrofisiologia 2.2.3). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos pela célula após ser estimulada por nAP_{ramp} , $nAP_{2xI_{th}}$, $nAP_{3xI_{th}}$ (vide eletrofisiologia 2.2.3). Todos os neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60 mV através do clampeamento de 41 e 31 nA nos grupos superfundidos com 5,6, MEM056 e 4,7 mM de $[K^+]$, MEM047, respectivamente não sendo esses valores significativamente diferentes (Tabela - 3). Os parâmetros de R_i e I_{th} que foram obtidos nos vários grupo, não diferiram entre si significativamente: seus valores em MEM056 foram 49 M Ω e 273 pA, respectivamente, e MEM047 48,3 M Ω e

288 pA (Tabela 3). A excitabilidade neuronal não foi significativamente aumentada (Figura 9 e 10), quando ela foi avaliada através de $nAP_{2xI_{th}}$, $nAP_{3xI_{th}}$ e nAP_{ramp} (Tabela - 3) e tendo de ocorrência da hipótese nula. (Figura 11)

Tabela 3 – Efeito das diferentes concentrações de potássio no Locke sobre as propriedades passivas e na excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de gânglios cervicais superiores

PARÂMETROS	MEM056 ^a	MEM047 ^b	P ^c
E_{mh} (mV)	- 60 ± 0	- 60 ± 0	-
R_i (M Ω)	49 ± 3,83	48.3 ± 2,97	0,603
I_h (nA)	41 ± 5,4	31 ± 4	0,848
I_{th} (pA)	273 ± 27,7	288 ± 9,4	0,602
NAP_{ramp}	1,7 ± 0,80	1,75 ± 0,80	0,888
$NAP_{2xI_{th}}$	1,1 ± 0,12	1,4 ± 0,19	0,181
$NAP_{3xI_{th}}$	1,2 ± 0,09	1,5 ± 0,194	0,107
N	18	12	-

a – MEM056 - Células cultivadas em MEM sem fenol red e superfundidas com potássio 5,6 mM

b – MEM047- Células cultivadas em MEM sem fenol red e superfundidas com potássio 4,7mM

c- probabilidade de que um dado valor de MEM056^a seja igual ao valor correspondente de MEM047^b teste t não pareado.

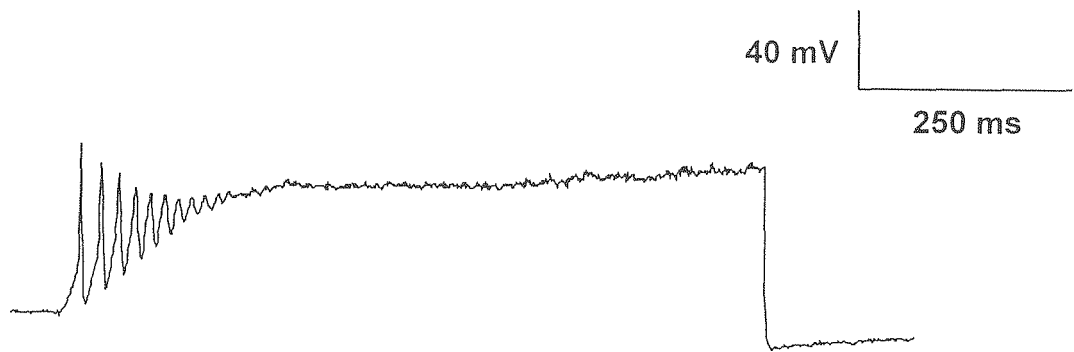
* $p < 0,05$ (significativamente diferente do valor correspondente em MEM056^a teste t não pareado.

Figura 9

Efeito de diferentes concentrações de potássio no líquido de superfusão sobre a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS, estimulados com uma rampa de corrente. A e B mostram traçados experimentais obtidos em neurônios com potenciais de repouso mantidos -60 mV através do clampeamento contínuo de 41 nA (em A) e 31 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Os neurônios foram cultivados previamente em MEM, transferidos para a câmara de superfusão com Locke contendo potássio $5,6$ mM de $[K^+]$ (em A) e $4,7$ mM de $[K^+]$ (em B) durante os registros eletrofisiológicos. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior a rampa estimulante de corrente intracelular de $0,4$ nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de $1,4$ pA/ms e 800 ms de duração.

Figura 9

A)



0,4 nA

250 ms

B)



0,4 nA

250 ms

Figura 10 Efeito de diferentes concentrações de potássio no líquido de superfusão sobre a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados de GCS quando estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar. A e B mostram traçados experimentais obtidos em neurônios com potenciais de repouso mantidos em -60 mV através do clampeamento de voltagem contínuo de 41 nA (em A) e 31 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Os neurônios foram previamente cultivados em MEM transferidos para câmara de superfusão com Locke contendo $[K^+]$ $5,6$ mM (em A) e $4,7$ mM de $[K^+]$ (em B) durante os registros eletrofisiológicos. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior o pulso estimulante (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms, injetada a partir do meio intracelular).

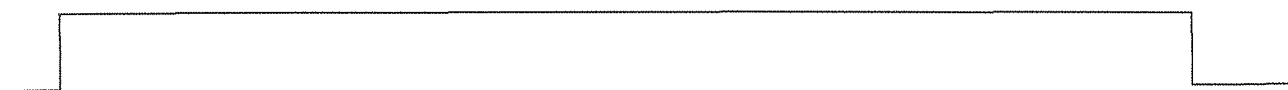
Figura 10

a)

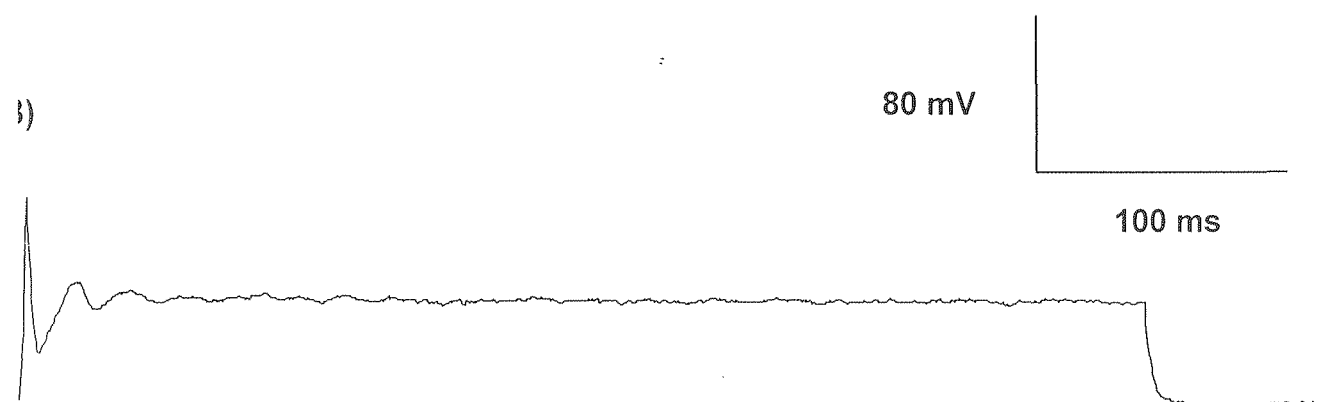


492 pA

100 ms



b)

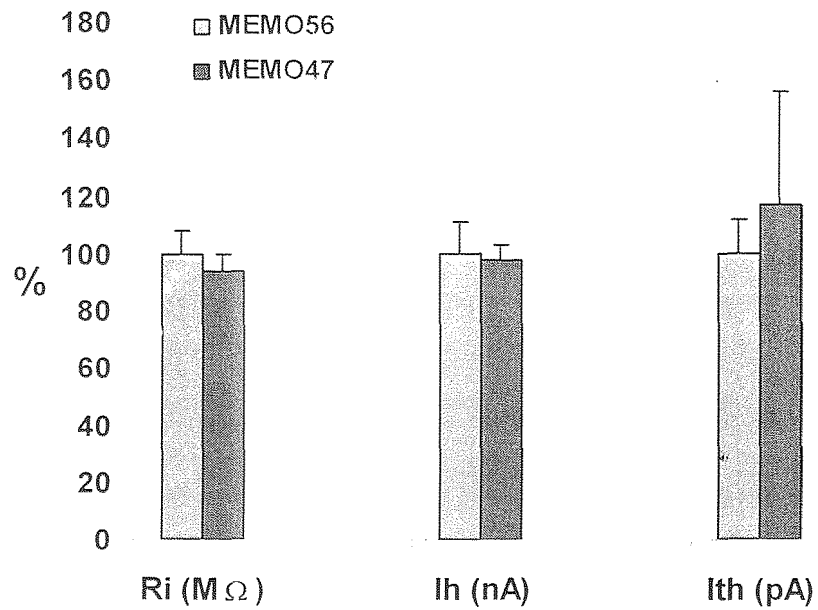


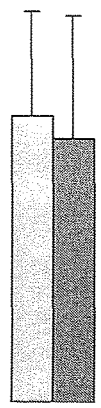
576 pA

100 ms

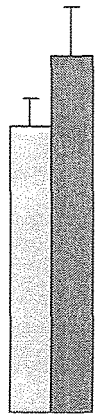


FIGURA 11 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO EXTRACELULAR SOBRE AS PROPRIEDADES PASSIVAS E EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS AGUDAMENTE DISSOCIADOS E CULTIVADOS EM MEM. R_i ($M\Omega$), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA), CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO EM -60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA; nAP_{2xith} NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO DOBRO DO LIMIAR; nAP_{3xith} , NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE $0,4$ nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE $1,4$ pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA.

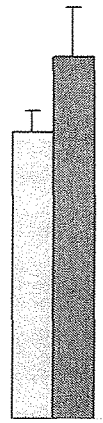




nAPramp



nAP2xlth



nAP3xlth

4.2.2 Neurônios cultivados com MEM e superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 5,6$ mM e $[K^+] = 4,7$ mM expostos a 10nM de ouabaína durante 1 hora:

Sabe-se que a ação da OUABAÍNA é muito sensível à concentração de K^+ do meio extracelular. Devido a esse fato, investigou-se o efeito da OUABAÍNA também em concentrações $[K^+] = 5,6$ mM. Em poços com neurônios agudamente dissociados e cultivados em MEM, após o processo de adesão de 120 minutos, completou-se o volume do meio para 500 μ l e simultaneamente adicionou-se ouabaína, que foi mantida por 60 minutos, a uma concentração final de 10 nM. Estes neurônios foram estabilizados por 10 minutos em solução nutritiva de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM, constituindo-se no grupo OUAB10nM56. Outro grupo de neurônios foi submetido ao mesmo protocolo experimental porém foram estabilizados com solução nutritiva de Locke $[K^+] = 4,7$ mM constituindo-se o grupo OUAB10nM47. Nestes grupos foram determinados E_{mh} , R_i , I_h , I_{th} . A excitabilidade neuronal como no caso anteriores e pré-definidos em 2,2,3 eletrofisiologia, foi avaliada através do número de potenciais de ação promovidos em uma rampa nAP_{ramp} , e em ondas quadradas de corrente $nAP_{2xI_{th}}$ e $nAP_{3xI_{th}}$ (vide 2,2,3 eletrofisiologia). Todos os neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60 mV através do clampeamento de 31 e 25 nA nos grupos OUAB10nM56 e OUAB10nM47 (Tabela - 4), respectivamente, valores que não foram significativamente diferente. Os parâmetros de R_i e I_{th} obtidos nos grupos OUAB10nM47 e OUAB10nM56, que foram 48 e 196 pA (Tabela - 4), não foram estatisticamente significantes. A excitabilidade neuronal promovida pela OUABAÍNA foi parcialmente diminuída por 5,6 mM de $[K^+]$ (Figura 12 e 13). Quando ela foi avaliada através de $nAP_{2xI_{th}}$, $nAP_{3xI_{th}}$ e nAP_{ramp} , não foram observadas diferenças significativas para $nAP_{3xI_{th}}$ e nAP_{ramp} porém apresentou diferença significativa entre os valores de $nAP_{2xI_{th}}$. (Figura 14)

Tabela 4 - Alterações produzidas por ouabaína 10 nM superfundida com potássio 4,7mM e 5,6mM, sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios, agudamente dissociados e cultivados em MEM, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos

Parâmetros	OUAB10nM56a ^a	OUAB10nM47b ^a	P ^c
E _{mh} (mV)	- 60 ± 0	- 60 ± 0	-
R _i (M Ω)	52 ± 6,12	48,9 ± 3.5	0,695
I _h (nA)	31 ± 6	25 ± 8	0,3839
I _{th} (pA)	258,57 ± 71,20	196 ± 44	0,528
nAP _{ramp}	4,36 ± 2,11	6.77 ± 2,6	0,408
nAP _{2xlt h}	1,86 ± 0,39	3,9 ± 1 *	0,042
nAP _{3xlt h}	2,3 ± 0,65	4,8 ± 1,5*	0,109
N	14	9	-

a^a OUAB10nM56a^a – Células cultivadas em MEM sem fenol red e incubadas com ouabaína 10nM durante 1 hora e superfundidas com potássio 5,6mM.

b^a OUAB10nM47b^a- Células cultivadas em MEM sem fenol red e incubadas com ouabaína 10nM durante 1 hora e superfundidas com potássio 4,7mM.

c- probabilidade de que um dado valor de OUAB10nM56a^a seja igual ao valor correspondente de OUAB10nM47b^a teste t não pareado.

* p < 0,05 (significativamente diferente do valor correspondente em OUAB10nM56a^a, teste t não pareado).

Figura 12

Interação entre os efeitos da concentração extracelular de K^+ e da ouabaína em doses nanomolares, sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, estimulados com uma rampa de corrente despolarizante. A e B mostram traçados experimentais de neurônios com potenciais de repouso mantido em -60 mV através do clampeamento contínuo de 31 nA e 25 nA, respectivamente, de amplitude duas vezes o limiar de corrente e duração de 800 ms de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em MEM com 10 nM de ouabaína durante 1 hora e depois transferidos para câmara de superfusão com solução de Locke contendo 5,6 mM (em A) e 4,7 mM (em B) de $[K^+]$. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior a rampa estimulante de corrente intracelular de 0,4 nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de 1,4 pA/ms e 800 ms de duração.

figura 12

A)

47 mV

253 ms



0,4 nA

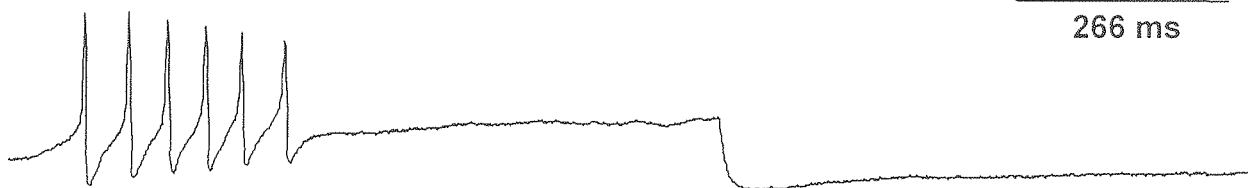
253 ms



B)

40 mV

266 ms



0,4 nA

266 ms



Figura 13

Interação entre a concentração extracelular de K^+ e a ouabaína em doses nanomolares, sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, estimulados com um pulso de corrente despolarizante de amplitude duas vezes o limiar de corrente e duração de 400 ms. A e B mostram traçados experimentais de neurônios com potenciais de repouso mantido em -60 mV através do clampeamento contínuo de 31 e 25 nA de corrente hiperpolarizante, respectivamente. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em MEM com 10 mM de ouabaína durante 1 hora e depois transferidos para câmara de superfusão com solução nutritora de Locke contendo 5,6 mM (em A) e 4,7 mM (em B) de $[K^+]$. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior o pulso estimulante (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms, injetada a partir do meio intracelular).

a 13

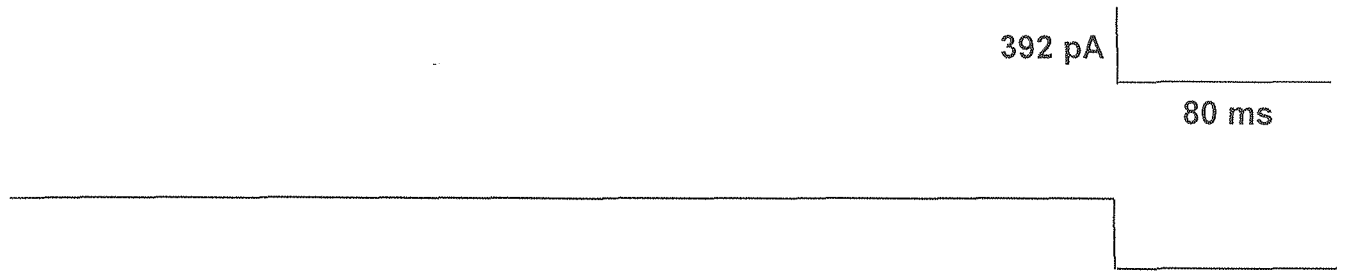
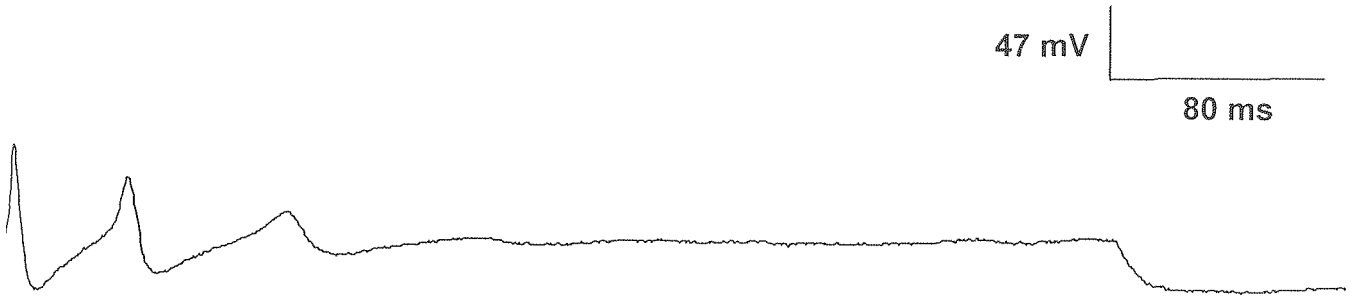


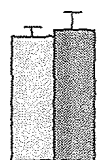
FIGURA 14 EFEITO DE OUABAINA EM CONCENTRAÇÕES FISIOLÓGICAS (10nM) EM NEURÔNIOS AGUDAMENTE DIS-
SOCIADAS DE GÂNGLIOS CERVICAIS SUPERIORES DE RATOS ADULTOS SUPERFUNDIDOS COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO. R_i ($M\Omega$), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA),
CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO
EM -60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA;
 $nAP_{2x_{ith}}$ NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL
AO DOBRO DO LIMIAR; $nAP_{3x_{ith}}$, NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE
CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO
PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE $0,4$ nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE
 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE $1,4$ pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO
CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA; *, SIGNIFICATI-
VAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE ($P < 0,05$; TESTE T NÃO PAREADO).

350
300
250
200
150
100
50
0

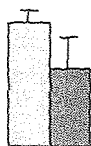
%

MEMO56

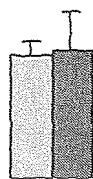
OUAB10nM56



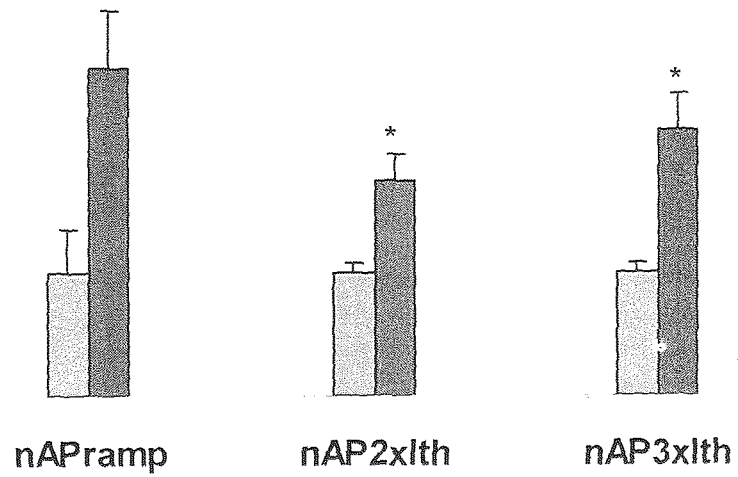
Ri (MΩ)



Ih (nA)



Ith (pA)



4.3 Efeito das concentrações de ouabaína 10nM/1h e perfundidas com Locke contendo $[K^+] = 5,6\text{mM}$:

Neurônios agudamente dissociados, resuspensos em 150 μl e mantidos em MEM por 120 minutos (2 hs) para aderir, tiveram o volume do meio em que estavam imersos completado para 500 μl sendo usados como grupo controle (MEM056). Outro grupo submetido ao mesmo processo de dissociação e adesão, foi exposto por 60 minutos (1 h) a ouabaína 10 nM dissolvidos em MEM, adicionado por ocasião da complementação dos 500 μl se tornando OUAB10nM56. Após este período cada grupo de células foi, removido do meio e estabilizado por 10 minutos através da superfusão com solução de Locke $[K^+] = 5,6\text{mM}$, para em seguida ser determinado de cada uma deles os parâmetros eletrofisiológicos pré-definidos anteriormente, E_{mh} , R_i , I_h , I_{th} (vide eletrofisiologia 2.2.3). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos pela célula após ser estimulada por nAP_{ramp} , $nAP_{2x\text{th}}$ e $nAP_{3x\text{th}}$ (vide eletrofisiologia 2.2.3). Todos os neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60mV através do clampeamento de 45 nA no grupo controle (MEM056) e 29 nA no OUAB10nM56 (Tabela - 5), e essas correntes não foram significativamente diferentes. Os parâmetros de R_i e I_{th} , que foram obtidos no grupo OUAB10nM56, 55 $\text{M}\Omega$ e 256 pA (Tabela 5), também não foram estatisticamente significantes em relação ao controle. A excitabilidade neuronal foi aumentada (Figura 15 e 16). Quando ela foi avaliada através de $nAP_{2x\text{th}}$, $nAP_{2x\text{th}}$ e nAP_{ramp} , ambos $nAP_{2x\text{th}}$ e $nAP_{3x\text{th}}$ apresentaram diferença significativa, enquanto que a rampa não apresentou diferença significativa em relação ao controle. (Figura 17)

Tabela 5 – Efeitos de ouabaina 10nM em neurônios perfundidos com solução de Locke com concentração de potássio 5,6 mEq/l sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios, agudamente dissociados, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos.

PARÂMETROS	MEM056 ^a	OUAB10nM56 ^b	P ^c
E _{mh} (mV)	- 60 ± 0	-60 ± 0	-
R _i (M Ω)	51 ± 4	55 ± 6,79	0,920
I _h (nA)	45 ± 9,8	29 ± 7,5	0,980
I _{th} (pA)	246 ± 27,9	256 ± 82	0,855
nAP _{ramp}	1,9 ± 0,68	5,0 ± 2,40	> 0,05
nAP _{2xlt h}	1,1 ± 0,1	2 ± 0,4 *	0,044
nAP _{3xlt h}	1,19 ± 0,80	2,5 ± 0,74 *	0,040
N	21	12	-

b^a – MEM056 - Células cultivadas com MEM sem fenol red e perfundidas com potássio 5,6 mM

b^b – OUAB10nM56 - Células cultivadas com MEM sem fenol red e perfundidas com potássio 5,6 mM expostas com ouabaina 10 nM/1h.

c- probabilidade de que um dado valor de MEM056 seja igual ao valor correspondente de OUAB10nM56, teste t não pareado.

* p < 0,05 (significativamente diferente do valor correspondente em MEM056, teste t não pareado).

Figura 15 Efeito da ouabaína em concentrações nanomolares, sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, cultivados em MEM, estimulados com uma rampa de corrente despolarizante e superfundidos com Locke contendo 5,6 mM/L de potássio. A e B mostram traçados experimentais em dois neurônios do gânglio cervical superior mantidos em potencial de repouso de -60 mV através do clampeamento contínuo de 45 nA (em A) e 31 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em MEM sem ouabaína (em A) e durante 60 minutos com ouabaína (10nM) (em B) e depois transferidos para câmara de superfusão com solução de Locke contendo 5,6 mM de $[K^+]$. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior a rampa estimulante de corrente intracelular de 0,4 nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de 1,4 pA/ms e 800 ms de duração.

figura 15

A)

47 mV

370 ms



0,4 nA

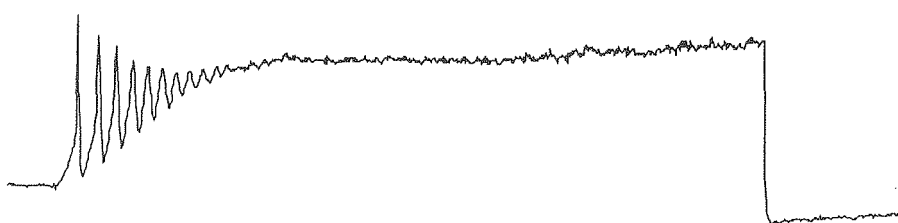
370 ms



B)

36 mV

347 ms



0,4 nA

347 ms

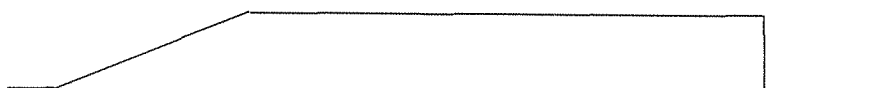


Figura 16

Efeito da ouabaína em concentrações nanomolares sobre a excitabilidade de neurônios simpáticos, cultivados em MEM e estimulados com pulso despolarizante de corrente de valor duas vezes o limiar e superfundidos com Locke contendo 5,6 mM/L de potássio. A e B mostram traçados experimentais em dois neurônios do gânglio cervical superior mantidos em potencial de repouso de -60 mV através do clampeamento contínuo de 45 nA (em A) e 31 nA (em B) de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em MEM sem ouabaína (em A) e durante 60 minutos com ouabaína (10nM) (em B) e depois transferidos para câmara de superfusão com solução de Locke contendo 5,6 mM de $[K^+]$. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior o pulso estimulante (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms, injetada a partir do meio intracelular).

igura 16

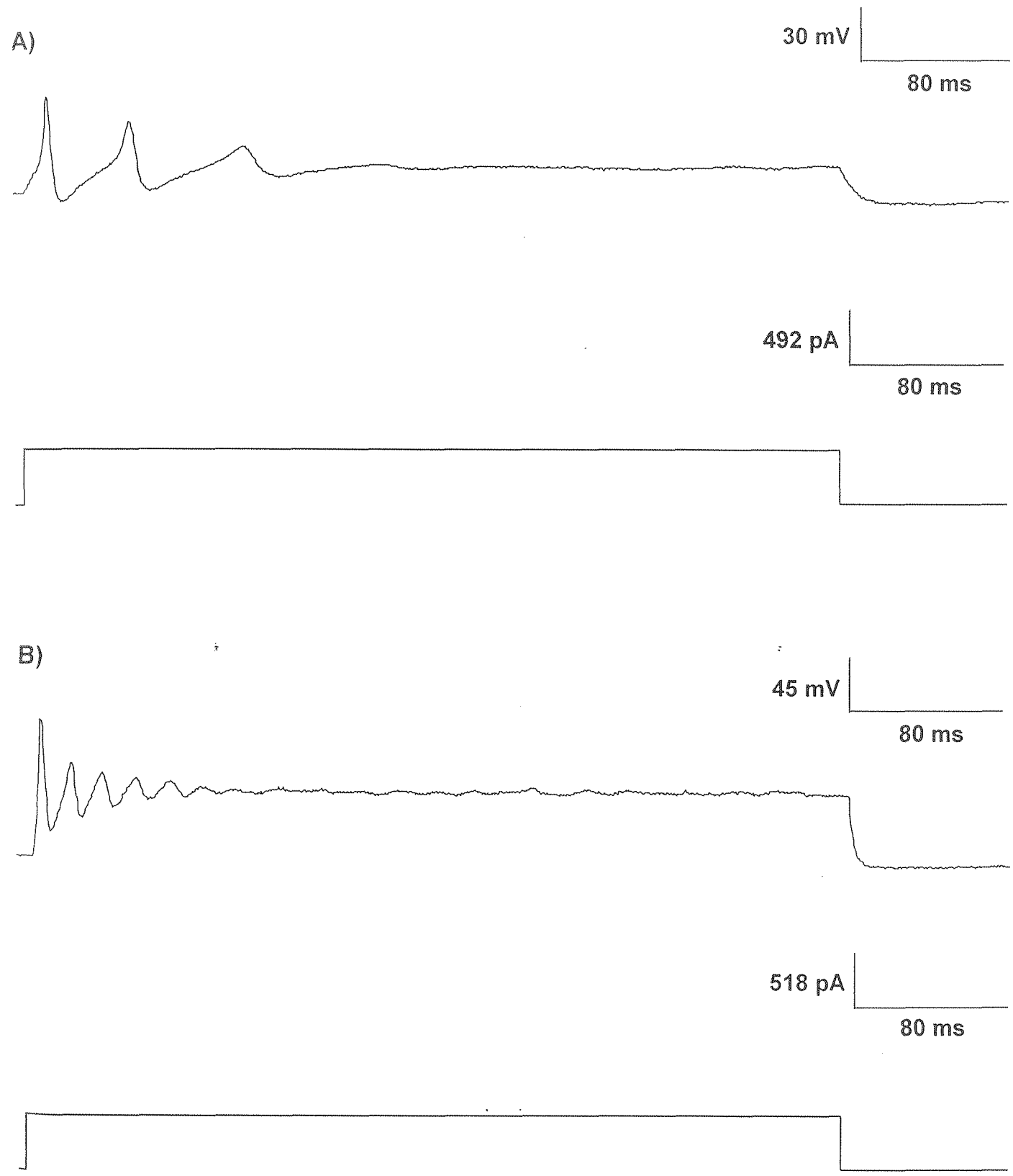
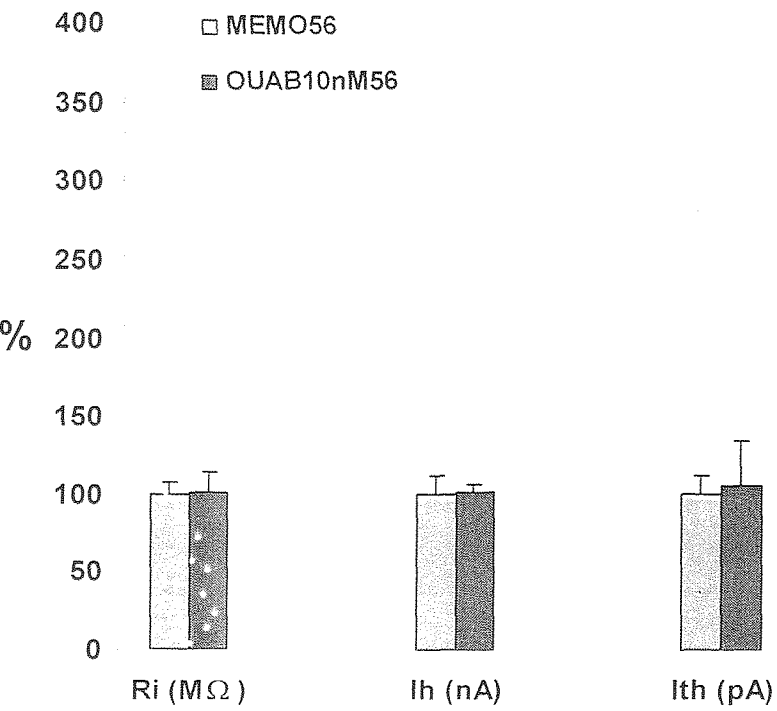
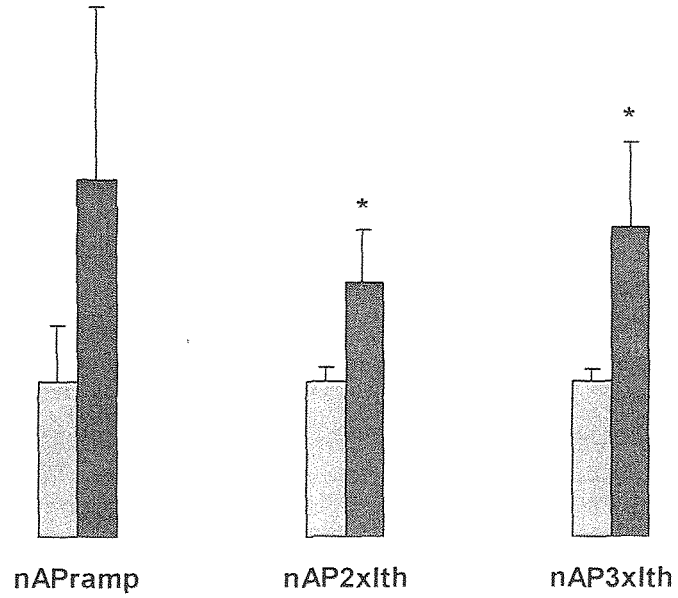


FIGURA 17 ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES PASSIVAS E EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DISSOCIADOS DE GCS DE RATOS ADULTOS, CULTIVADOS EM MEM, EXPOSTOS A CONCENTRAÇÕES NANOMOLARES DE OUABAÍNA (10 nM) POR UM PERÍODO DE 1 HORA E SUPERFUNDIDOS COM POTÁSSIO 5,7 mM. R_i (M Ω), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA), CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO EM - 60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA; $nAP_{2x_{ith}}$ NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO DOBRO DO LIMIAR; $nAP_{3x_{ith}}$, NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE 0,4 nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE 1,4 pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA; *, SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE (P < 0,05; TESTE T NÃO PAREADO).





4.4 Neurônios simpáticos tratados com altas doses de ouabaína 1mM e superfundidos com Locke contendo $[K^+] = 5,6mM$:

Neurônios agudamente dissociados foram mantidos em 150 μ l do meio de cultura MEM por 120 minutos (2hs), para aderir, e transcorrido este período o meio foi completado para 500 μ l. Após mais duas horas estes neurônios foram usados como controle sendo designados de MEM4h. Em seguida foi removido o meio de cultura e superfundidos com solução nutritora de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM por 10 minutos, para que estabilizasse, após o qual foram colhidos os parâmetros eletrofisiológicos pré-definidos anteriormente, E_{mh} , R_i , I_h , I_{th} (vide eletrofisiologia 2.2.3). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos pela célula após ser estimulada por nAP_{ramp} , $nAP_{2xI_{th}}$ e $nAP_{3xI_{th}}$ (vide eletrofisiologia 2.2.3). Em outro grupo de neurônios, OUAB1mM também cultivados com MEM, após o processo de adesão, o meio foi completado para 500 μ l com MEM contendo ouabaína, cuja concentração final atingiu 1mM, por um período de 60 minutos (1h). Estes neurônios também foram estabilizados por 10 minutos, em solução nutritora de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM, para em seguida se realizar a coleta dos parâmetros eletrofisiológicos. Todos os neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60 mV através do clampeamento de 118 nA no grupo MEM4h e 80 nA no OUAB 1mM (Tabela 6), que foram significativamente diferentes entre si. Os parâmetros de R_i e I_{th} que foram obtidos no grupo, OUAB1mM, 119 $M\Omega$ e 84 pA, respectivamente (Tabela - 6), foram estatisticamente significantes em relação ao controle para os valores de resistência de membrana. A excitabilidade neuronal foi aumentada (Figura 18 e 19). Quando ela foi avaliada através de $nAP_{2xI_{th}}$, $nAP_{3xI_{th}}$ e nAP_{ramp} , as diferenças foram todas significantes em relação ao controle (Figura 20).

Tabela 6 – Efeitos de ouabaína 1 mM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos, superfundidos com 5,6 mM de $[K^+]$.

PARÂMETROS	MEM4h ^a	OUAB1mM ^b	P ^c
E_{mh} (mV)	- 60	- 60	-
R_i (M Ω)	70,7 \pm 6,2	119 \pm 10 *	0,002
I_h (nA)	118 \pm 26	80 \pm 2 *	0,0008
I_{th} (pA)	157 \pm 38	84 \pm 9,5*	0,2345
nAP _{ramp}	2,8 \pm 0,52	9,9 \pm 1,2 *	0,000001
nAP _{2xIth}	1,6 \pm 0,74	3,9 \pm 0,4 *	0,000002
nAP _{3xIth}	1,89 \pm 0,187	5,44 \pm 0,53 *	0,000006
N	27	29	-

a – MEM4h – Células cultivadas em MEM com vermelho fenol e empaladas após quatro horas de dissociação.

b – OUAB1Mm – Células cultivadas em MEM com vermelho fenol e após 4 horas, expostas a ouabaína 1mM por um período de exposição de 1 hora

c – probabilidade de que um dado valor de MEM4h seja igual ao valor correspondente de OUAB1Mm, teste t não pareado.

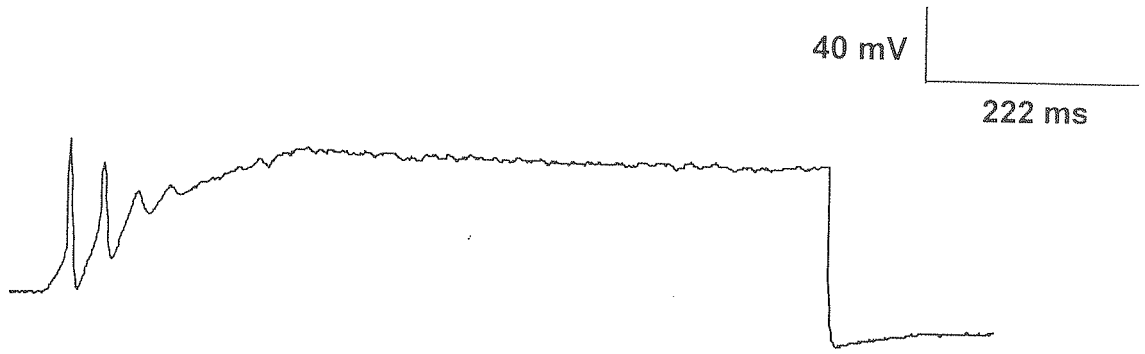
* $p < 0,05$ (significativamente diferente do valor correspondente em MEM4h, teste t não pareado).

Figura 18

Efeito de 1 mM de ouabaína sobre a excitabilidade de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) estimulados com uma rampa de corrente despolarizante. Em A e B, são mostrados traçados experimentais em dois neurônios do GCS de rato em potencial de repouso de -60 mV através do clampeamento contínuo de 118 e 80 nA em A e B, respectivamente, de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em MEM por quatro horas, nas primeiras duas horas sem a presença de ouabaína e nas duas horas finais sem ouabaína (em A) e com ouabaína (em B) 1 mM, e depois transferidos para solução de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM, durante o registro eletrofisiológico. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior a rampa estimulante de corrente intracelular de 0,4 nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de 1,4 pA/ms e 800 ms de duração.

Figura 18

A)



B)

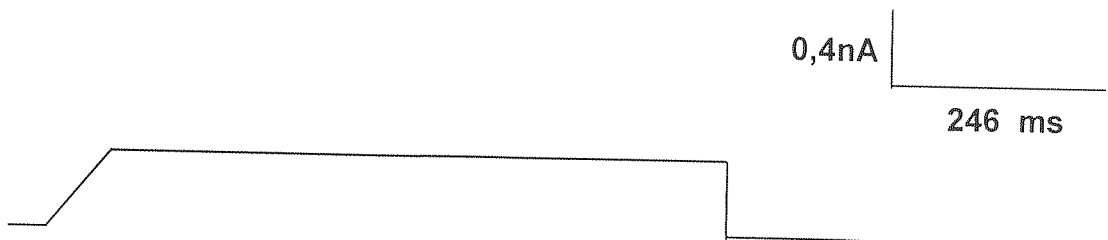
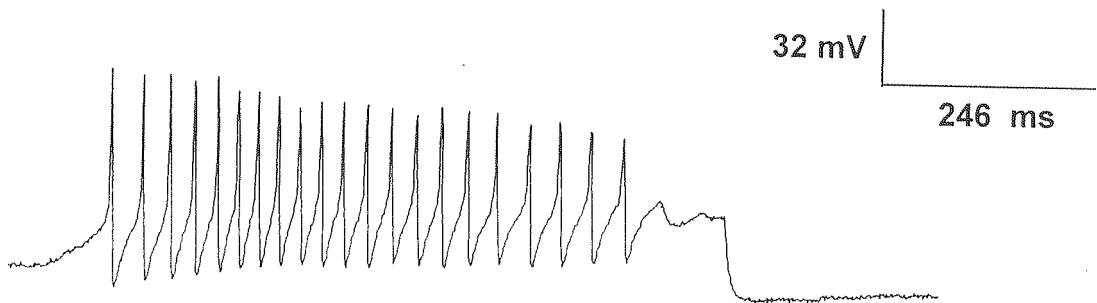


Figura 19

Efeito de 1 mM de ouabaína sobre a excitabilidade de neurônios do gânglio cervical superior (GCS) estimulados com pulso despolarizante de corrente de valor duas vezes o limiar. Em A e B, são mostrados traçados experimentais em dois neurônios do GCS de rato em potencial de repouso de -60 mV através do clampeamento contínuo de 31 e 45 nA em A e B, respectivamente, de corrente hiperpolarizante. Ambos os neurônios foram previamente cultivados em MEM por quatro horas, nas primeiras duas horas sem a presença de ouabaína (em A e B) e nas duas horas finais sem ouabaína (em A) e com ouabaína (em B) 1 mM. E depois transferidos para solução de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM, durante o registro eletrofisiológico. Em A e B o traço superior representa a resposta de voltagem e o inferior o pulso estimulante (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms, injetada a partir do meio intracelular).

Figura 19

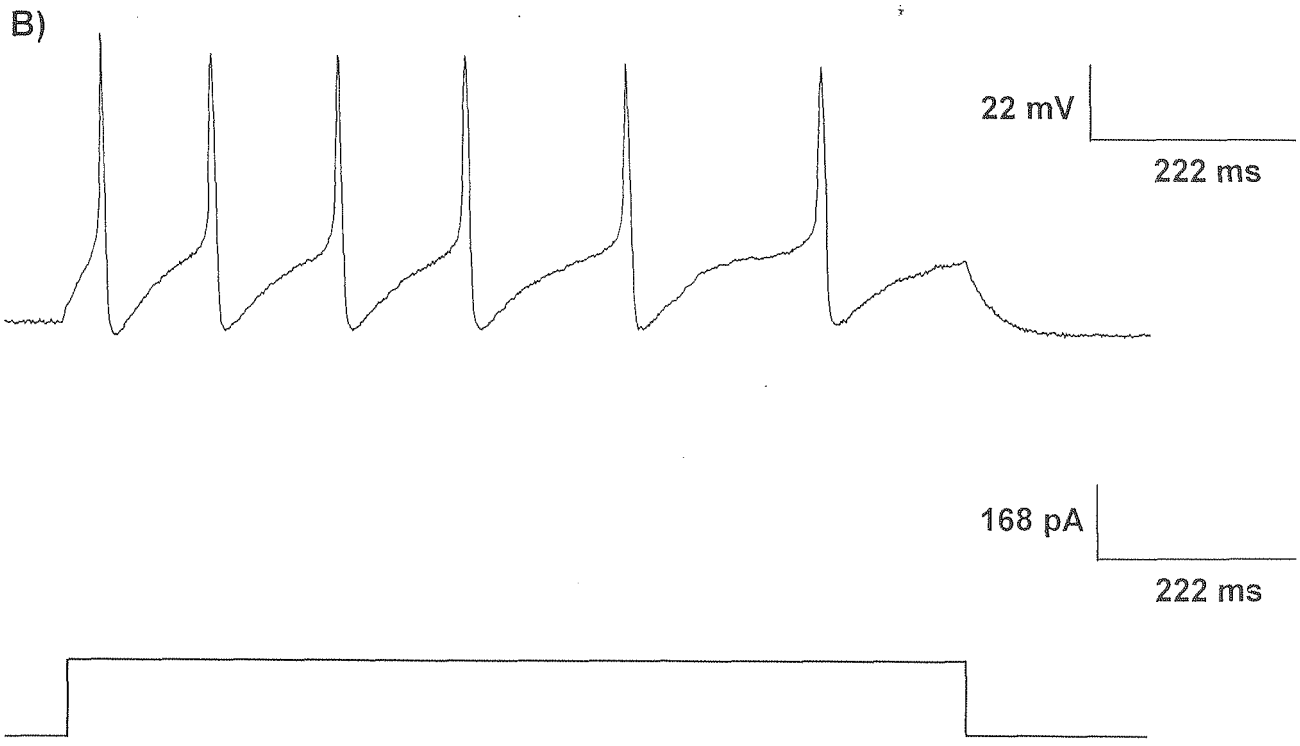
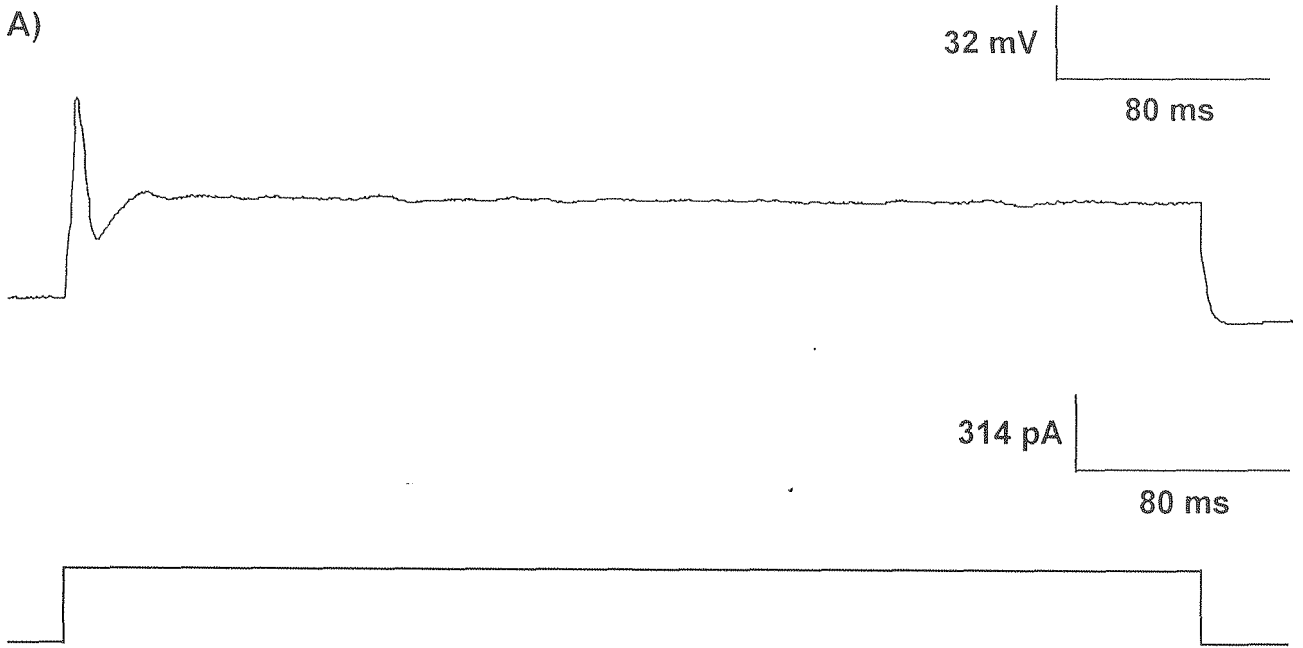
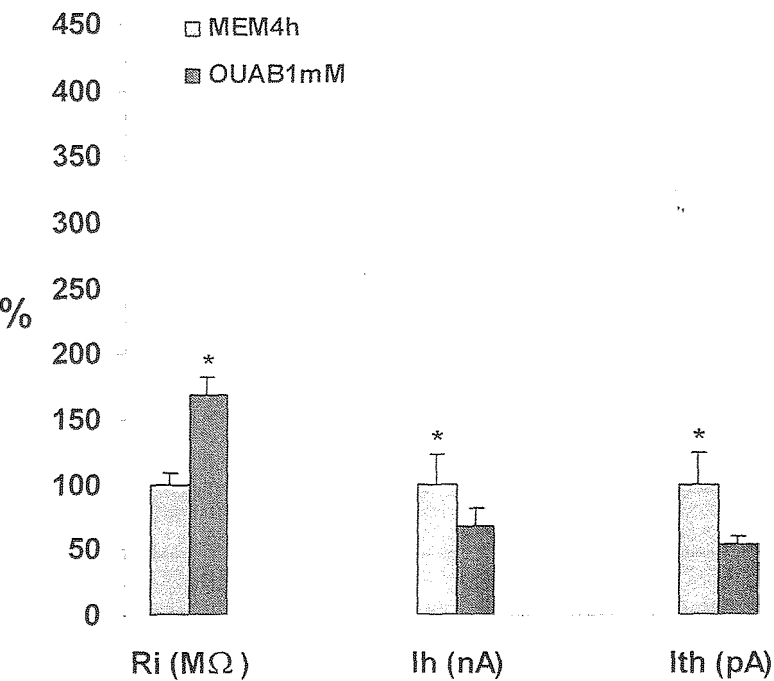
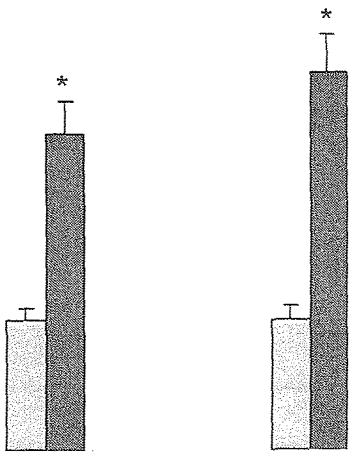


FIGURA 20 ALTERAÇÕES NA EXCITABILIDADE E PROPRIEDADES PASSIVAS PRODUZIDAS POR ALTAS DOSES DE OUABAÍNA (1 mM) EM NEURÔNIOS AGUDAMENTE DISSOCIADOS DE GCS DE RATOS ADULTOS. R_i ($M\Omega$), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA), CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO EM -60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA; $nAP_{2x_{ith}}$ NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO DOBRO DO LIMIAR; $nAP_{3x_{ith}}$, NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE $0,4$ nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE $1,4$ pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA; *, SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE ($P < 0,05$; TESTE T NÃO PAREADO).





nAPramp



nAP2xlth

nAP3xlth

4.5 Efeito da dihidroouabaína e da raminose sobre a excitabilidade e propriedades passivas de neurônios simpáticos

Os trabalhos de (MANUNTA, P., et al., 2001), preconizam que o açúcar e um anel lactâmico insaturado, presentes na estrutura da ouabaína, afetam a potência inibitória da bomba. Tal fato, nos levou a investigar o efeito da raminose sobre a excitabilidade dos neurônios dos gânglios cervicais superiores (GCS).

Neurônios agudamente dissociados foram mantidos em 150 μ l de meio de cultura (MEM) por 120 minutos (2hs), para aderir. Transcorrido este período adicionou-se 350 μ l do meio MEM. Em um grupo adicionou-se apenas MEM (controle), num segundo grupo adicionou-se também dihidroouabaína (DH) para se obter uma concentração final de 10 nM e no terceiro grupo foi adicionado raminose de maneira a se obter uma concentração final de 10nM, (RH). Os grupos DH e RH foram exposto por 60 minutos (1h) à dihidroouabaína e a raminose, respectivamente e o controle MEM4h recebeu mais 2 horas de exposição ao meio de cultura e em seguida (perfazendo um total de 4 horas de exposição o MEM). Todos os grupos de neurônios foram superfundidos com solução nutritora de Locke com $[K^+] = 5,6$ mM por 10 minutos para que ocorresse a estabilização, após o que foram colhidos de cada um deles os seguintes parâmetros eletrofisiológicos: E_{mh} , R_i , I_h , e I_{th} , (pré-definidos anteriormente em 2.2.3 eletrofisiologia). A excitabilidade neuronal foi avaliada através do número de potenciais de ação produzidos em nAP_{ramp} , $nAP_{2xI_{th}}$ e $nAP_{3xI_{th}}$ (vide 2.2.3 eletrofisiologia). Todos os neurônios foram mantidos no E_{mh} de -60 mV através do clampeamento de 118 nA no grupo controle 37 nA no DH e 96 nA no grupo RH (Tabela 7), valores esses que não foram significativamente diferentes. Os parâmetros de R_i e I_{th} foram significativamente diferentes nos grupos MEM4h, RH em relação a DH. As resistências de membrana 70,7, 147 e 98,3 M Ω (Tabela 7), observadas nos grupos MEMPRI4h, DH e RH, respectivamente, foram significativamente diferentes no grupo DH em relação aos outros grupos ($p < 0,05$, anova e teste Bonferoni). Os limiares de corrente 157 pA, 40 pA e 143 pA, não foram diferentes do ponto de vista estatístico em relação ao grupo controle. A excitabilidade neuronal foi

aumentada (Figura 21 e 22), e quando ela foi avaliada, nos grupos DH e RH em relação ao controle, através de $nAP_{2xI_{th}}$, $nAP_{3xI_{th}}$ e nAP_{ramp} foram significantes apenas no grupo DH. (Figura 23)

Tabela 7 – Efeitos da dihidrouabaina 10 nM e da raminose 10 nM sobre as propriedades passivas e a excitabilidade de neurônios agudamente dissociados, de gânglios cervicais superiores de ratos adultos

PARÂMETROS	MEM4h ^a	DH ^b	RH ^c	p ^d
E_{mh} (mV)	$-50,18 \pm 0,43$	$-59 \pm 0,7$	$-59 \pm 0,5$	-
R_i (M Ω)	$70,7 \pm 6,2$	$147 \pm 23,2^*$	$98 \pm 19,5$	0,0021
I_h (nA)	118 ± 26	37 ± 2	96 ± 4	> 0,05
I_{th} (pA)	157 ± 38	40 ± 7	$143 \pm 54,2$	0,875
nAP_{ramp}	$2,8 \pm 0,52$	$14,8 \pm 3^*$	$3,6 \pm 1,68$	0,00218
$nAP_{2xI_{th}}$	$1,6 \pm 0,74$	$4 \pm 0,7^*$	$2,1 \pm 0,7$	0,0001
$nAP_{3xI_{th}}$	$1,89 \pm 0,187$	$7,5 \pm 0,96^*$	$2,9 \pm 1,19$	0,001
N	27	4	7	-

a – MEM4h – Células incubadas com MEM com fenol red e usadas após 4 horas após a dissociação

b – DH – Células incubadas com dihidrouabaina 10 nM e exposta por um período de 1 hora

c – RH – Células incubadas com raminose 10 nM e exposta por um período de 1 hora

d – probabilidade de que um dado valor de MEM4h seja igual ao valor correspondente de dihidrouabaina 10 nM, teste t não pareado.

* $p < 0,05$ (significativamente diferente do valor correspondente em MEM4h, teste t não pareado) e anova teste de BONFERONI.

Figura 21

Efeito da dihidrouabaina 10 nM, Raminose 10 nM sobre a excitabilidade neuronal de neurônios agudamente dissociados de GCS estimulados com uma rampa despolarizante de corrente. A, B e C mostram traçados experimentais de neurônios, com potenciais de repouso mantidos em -60 mV através do clampeamento contínuo 37 (em A), 118 (em B) e 96 nA (em C) de corrente hiperpolarizante. Os neurônios foram previamente cultivados em MEM com fenol red e empaladas após 4 horas (em A), exposto a dihidrouabaina 10 nM por um período de 1 hora (após 4 horas de dissociação) (em B) e à raminose 10 nM por 1 hora de exposição (após 4 horas de dissociação) (em C). E depois transferidos para câmara de superfusão com Locke contendo 5,6 mM de potássio. Em A, B e C os traços superiores representam as respostas de voltagens e os inferiores as rampas estimulantes de correntes intracelulares de 0,4 nA de amplitude máxima, taxa de crescimento de 1,4 pA/ms e 800 ms de duração.

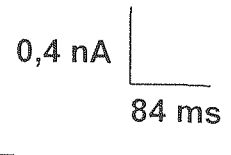
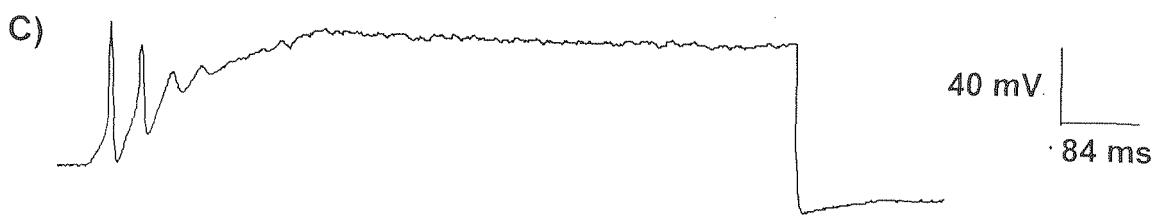
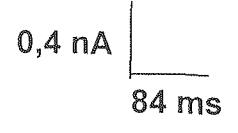
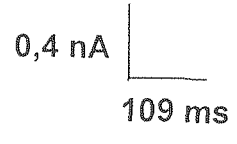
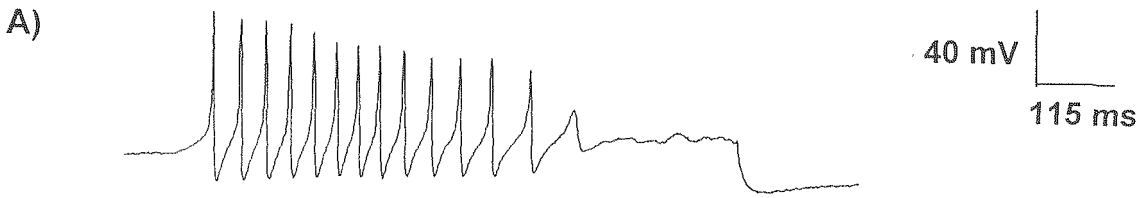


Figura 22

Efeito da dihidrouabaina 10 nM, Raminose 10 nM sobre a excitabilidade neuronal de GCS estimulado com pulso despolarizante de corrente de valor duas vezes o limiar. A, B e C mostram traçados experimentais de neurônios, estimulados com uma rampa de corrente de 400 ms e amplitude duas vezes o limiar de corrente com potenciais de repouso mantidos em -60 mV através do clampeamento contínuo 118 (em A), 40 (em B) e 143 nA (em C) de corrente hiperpolarizante. Os neurônios foram previamente cultivados em MEM com fenol red e empalados após 4 horas (em A), expostos à dihidroouabaina 10 nM por um período de 1 hora (após 4 horas de dissociação) (em B) e à raminose 10 nM por 1 hora de exposição (após 4 horas de dissociação) (em C). E depois transferidos para câmara de superfusão com Locke contendo 5,6 mM de potássio. Em A, B e C os traços superiores representam as respostas de voltagens e os inferiores os pulsos estimulantes (onda quadrada de corrente despolarizante, com duração de 400 ms, injetada a partir do meio intracelular).

Figura 22

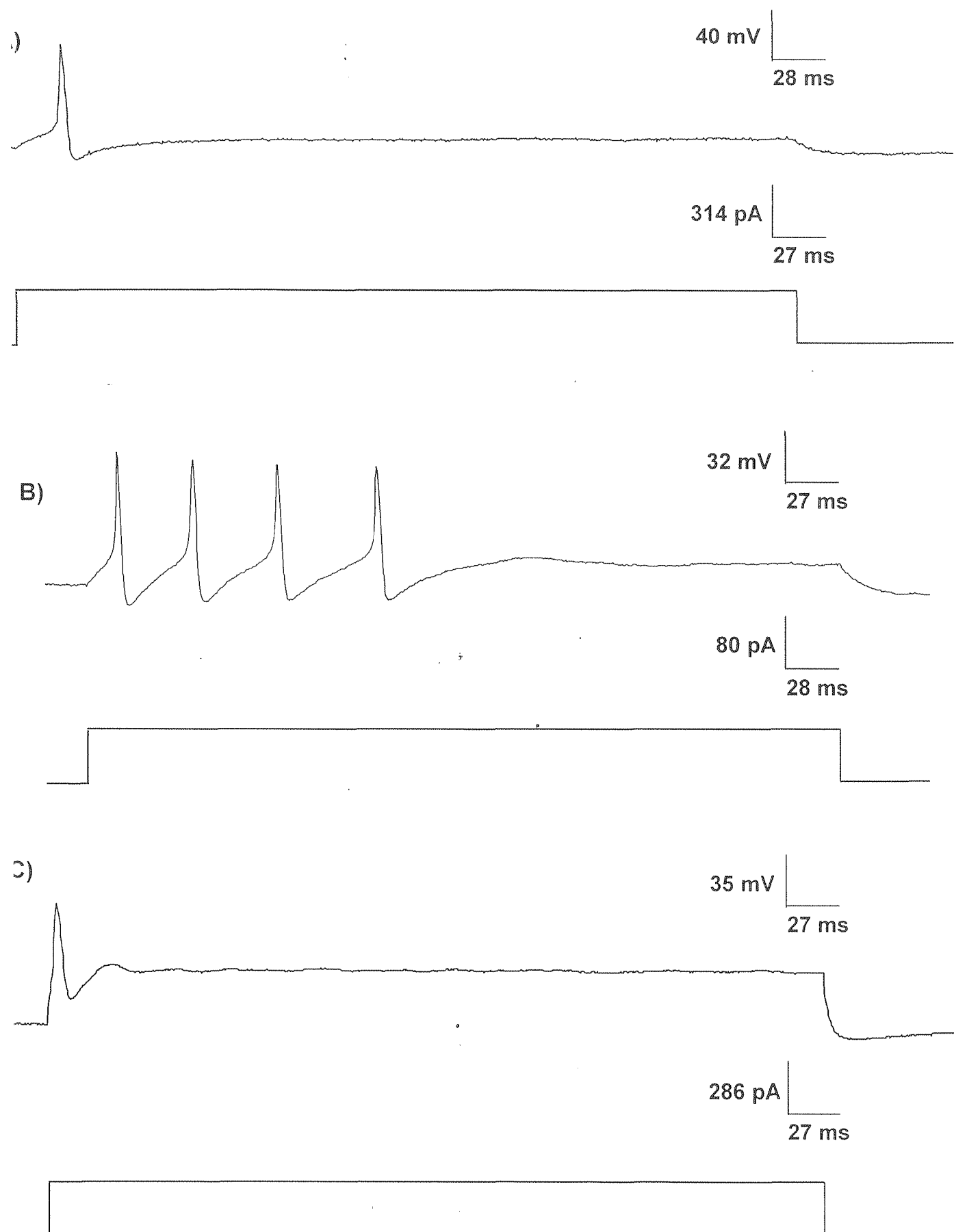
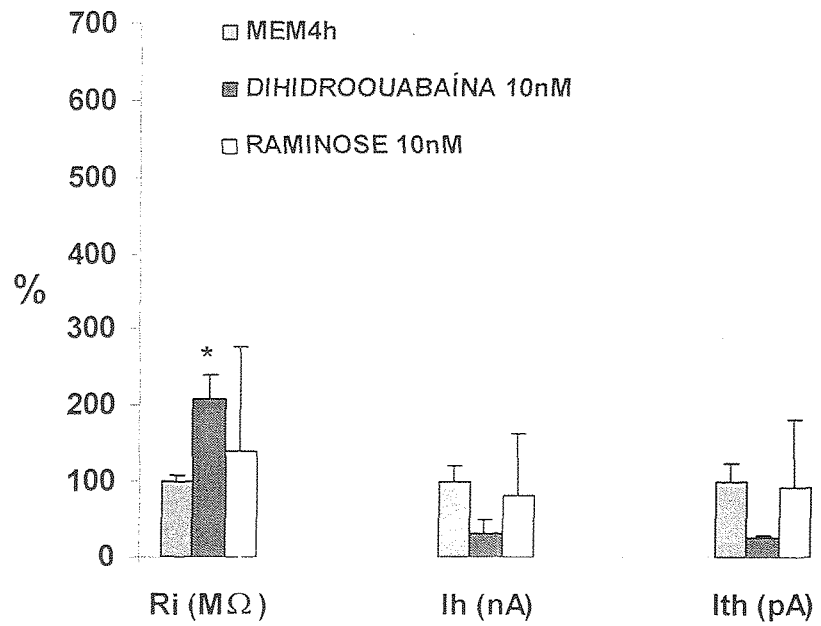
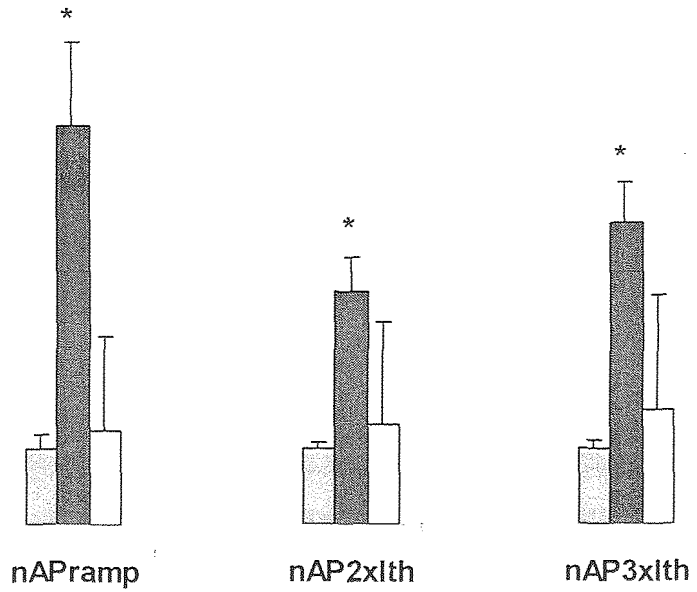


FIGURA 23 **ALTERAÇÕES NA EXCITABILIDADE E NAS PROPRIEDADES PASSIVAS DE NEURÔNIOS AGUDAMENTE DISSOCIADOS DE GCS EXPOSTOS A DIHIDROOUABAÍNA 10 nM E RAMINOSE 10 nM.** R_i ($M\Omega$), RESISTÊNCIA ELÉTRICA DE ENTRADA, EM MEGA OHMS; I_h (nA), CORRENTE BASAL USADA NO CLAMPEAMENTO PARA MANTER O POTENCIAL TRANSMEMBRANA DE REPOUSO EM -60 mV, EM nA; I_{th} CORRENTE NECESSÁRIA PARA DESENCADear UM POTENCIAL DE AÇÃO EM pA; $nAP_{2x_{ith}}$ NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO DOBRO DO LIMIAR; $nAP_{3x_{ith}}$, NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO EM RESPOSTA A UM PULSO DE CORRENTE DE AMPLITUDE IGUAL AO TRIPLO DO LIMIAR; (nAP_{ramp}), NÚMERO DE POTENCIAIS DE AÇÃO PRODUZIDOS EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO COM UMA RAMPA DE $0,4$ nA DE AMPLITUDE E DURAÇÃO DE 800 ms, E UMA INCLINAÇÃO DE $1,4$ pA. ORDENADA, VALOR DE CADA PARÂMETRO, EM PERCENTUAIS DO CONTROLE. BARRA VERTICAL NO TOPO DE CADA COLUNA, ERRO PADRÃO DA MÉDIA; *, SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE ($P < 0,05$; TESTE T NÃO PAREADO).





5 DISCUSSÃO

5.1 As alterações da excitabilidade neuronal pela ouabaína 10 nM

A descoberta mais importante deste estudo é que a ouabaína, na concentração de 10 nM, aumenta a excitabilidade dos neurônios do gânglio cervical superior (GCS) deslocando o funcionamento deles, no que concerne a resposta a estímulos despolarizantes, do padrão fásico em que aproximadamente 96% (WEEMS & SZURSZEWSKI, 1978; GALVAN & SEDLMEIR, 1984; CASSELL et al., 1986) se encontram, para um padrão mais tônico. Esta mudança é observada em gânglios intactos de ratos espontaneamente hipertensos, (REH), usado como um dos modelos de hipertensão (BUNAG, & EFERAKEYA, 1976; YAMORI, & OKAMOTO, 1969; EILAM, et al., 1991) que se caracteriza pela perda de acomodação (YAROWSKY, & WEINREICH, 1985; MAGEE, JEFFERY, & GEOFFREY SCHOFIELD, 1994; JUBELIN, & KANNAN, 1990) e pelo aumento da frequência de disparo que fisiologicamente se situa na faixa entre 1 a 4 Hz (YOSHIMURA, et al., 1987). Como estes neurônios são os processadores mais distais das informações que trafegam pelo ramo eferente nervoso, o simpático, eles determinam uma hiperreatividade (NAGATSU, et al., 1976; NAKAMURA, 1977; MATSUMOTO, 1967; LAIS, et al., 1977; LAIS, et al., 1974), observada nestes casos.

5.2 A concentração de ouabaína utilizada

A concentração de 10 nM utilizada neste estudo adquire uma importância especial por ela estar numa faixa fisiológica que varia de 0.2-0.7 nM (HOFFMAN, & BIGGER, Jr 1990; BROWN, & ERDMANN, 1984), e por razões que discutiremos a seguir, o que torna o aumento da excitabilidade neuronal observada neste estudo um dado importante para se discutir e analisar a participação da ouabaína produzida endógenamente.

A ouabaína, um cardiotônico do tipo digitálico (JACOBS, & BIGELOW, 1932; FAGGE, & STEVENSON, 1865), tem sido objeto de muitos estudos que levaram a várias descobertas, entre as quais se destaca a demonstração de que ela bloqueia o funcionamento da Na-K-ATPase (WOOD & MOE, 1942; SCHATZMANN, 1953; SKOU, 1957) em, praticamente, todos os tecidos como, axônios de invertebrados marinhos, músculo cardíaco de mamíferos (REUTER, & SEITZ, 1968), e em músculo liso vascular (REUTER, et al 1973). Tem-se postulado que essa ação sobre a Na-K-ATPase é a causa primária da atividade que deu grande destaque à ouabaína, o efeito inotrópico positivo, pois ela levaria a uma cascata de ações que culminaria com aumento do inotropismo cardíaco devido ao bloqueio da Na-K-ATPase, causando uma redução do gradiente de potencial eletroquímico do Na^+ , que por sua vez, causaria a redução do nível de funcionamento do mecanismo de troca $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$, (BAKER, & BLAUSTEIN, 1968; BAKER, et al., 1969; BLAUSTEIN, & HODGKIN, 1969) produzindo assim um aumento da $[\text{Ca}^{++}]$ intracelular e o efeito final observado seria o aumento do inotropismo cardíaco (WOOD, & MOE, 1942). Essa explicação para o aumento do inotropismo cardíaco tem sido questionada (BAKER, & WILLIS, 1972; ELLIS, 1977; HAMLIN, et al., 1985; LEE, & DAGONTINO, 1982; SHEU, & BLAUSTEIN, 1992). Para promover o bloqueio da Na-K-ATPase em miócitos cardíacos necessitam-se de concentrações da ouabaína na faixa de 1 a 100 μM (REUTER, & SEITZ, 1968). A ouabaína é também ativa em outros tecidos excitáveis: músculo liso (REUTER, et al., 1973), neurônios (BAKER & BLAUSTEIN, 1968; BLAUSTEIN, & HODGKIN, 1969), e músculo cardíaco de mamíferos (REUTER, &

SEITZ, 1968). Nos estudos disponíveis na literatura, tem-se demonstrado que, na faixa de concentração de 10 a 1000 μM , que é chamada de farmacológica, a ouabaína bloqueia a Na-K-ATPase (BAKER, & WILLIS, 1972; FORBUSH, 1983; SCHATZMANN, 1953; SKOU, 1960) e é com a finalidade de bloquear essa enzima que ela tem sido utilizada experimentalmente, nessa faixa de concentração.

Os efeitos de 10 nM de ouabaína, apresentados neste estudo, situam-se numa faixa de concentração bem inferior à farmacológica. Há estudos documentando e demonstrando, que a ouabaína é produzida endogenamente pela córtex da glândula suprarenal (TAMURA, et al., 1988; BOULANGER, et al., 1993; LUDENS, et al., 1992; HAMLYN, et al., 1991; GOTO, et al., 1992; SCHONER, 1992) e, em quantidades menores, por outros tecidos (HAMLYN, et al., 1991), sendo secretada em quantidades que promovem concentrações na faixa de 1 – 100 nM, chamada fisiológica (HOFFMAN, & BIGGER, Jr., 1990; BROWN, & ERDMANN, 1984). Os dados relacionados a 10 nM de ouabaína, aqui apresentados, são efeitos que podem, portanto, ser considerados fisiológicos. Esses dados corroboram toda uma linha de pesquisa desenvolvida por vários laboratórios ao redor do mundo, que atribui à ouabaína relevante papel fisiológico (HAMLYN, et al., 1991; BLAUSTEIN, 1977) em mamíferos e, inclusive, em humanos (HAMLYN, et al., 1991; GOTO, et al., 1992; SCHONER, 1992).

Os efeitos dessa concentração, (10nM) aqui apresentados, foram estabelecidos em um curso temporal rápido, uma hora de exposição a 10 nM de ouabaína onde em relação ao grupo controle há um aumento significativo no número de potenciais produzidos por um pulso de amplitude duas e três vezes o valor do limiar celular e duração de 400 ms (vide Tabela 01). Caso 10 nM não tivesse apresentado nenhum resultado dentro do tempo de observação dos nossos experimentos, isso não seria conclusivo para negar a participação fisiológica da ouabaína, uma vez que muitos outros hormônios esteroidais apresentam efeitos que se desenvolvem ao longo de dias e cujos primeiros efeitos mensuráveis só ocorrem após muitas horas (HEIERHOLZER & BÜHLER, 1996). O

dado positivo nesse curto espaço de tempo de exposição vem torná-lo mais relevante ainda.

A atividade da ouabaína na concentração de 10 nM sugere o mecanismo de ação em termos do sítio de atuação dessa substância na estrutura macromolecular que é a Na-K-ATPase, mais especificamente na subunidade α de mamíferos (PRESSLEY, 1992; SHAMRAJ, & LINGREL, 1994; SHULL, et al., 1986; TAKEYASU, et al., 1990), e em tecidos nervosos (BLANCO, et al 1990; JEWICIL & LINGREL 1991; THENEN, et al., 1996, BLAUSTEIN & HAMLYN 1991).

5.3 O deslocamento do funcionamento neuronal para um padrão mais tônico

Os neurônio do gânglio cervical superior têm características funcionais importantes para que se possa compreender a relevância do aumento da excitabilidade neuronal aqui apresentada. Primeiro, os neurônio do GCS são uma rota sináptica obrigatória para toda a informação que trafega pelo gânglio, o faz por via sináptica (CABOT, 1990; STRACK, et al., 1989; STRACK, et al., 1988). Segundo, as sinapses do GCS são todas do tipo integrativas (SKOK, 1973). Isso implica que um aumento da excitabilidade fará o sinal transitar mais facilmente através do gânglio e assim, para um dado input, o output será maior. Em outras palavras, haverá uma tendência ao aumento do tônus simpático ao nível dos seus efetores. Como os efetores do simpático, de uma maneira geral e, em particular, do GCS, promovem, quando há aumento do tônus simpático, vasoconstrição e essa, por sua vez, leva a aumento da resistência vascular periférica (COWLEY, Jr., 1992; ABOUD, & THAMES, 1983), o resultado final de um aumento da excitabilidade neuronal no GCS, favorece a instalação de um aumento da pressão arterial.

Há várias maneiras de se quantificar a excitabilidade neuronal (CASSEL & SUZURSZEWSKI, 1978; KING & SUZURSZEWSKI, 1988). A maneira mais difundida é através das medidas da cronaxia e da reobase (YAROWSKY & WEINREICH, 1985). Nesse trabalho optou-se pela utilização de pulsos de longa

duração porque eles são mais informativos sobre aspectos do funcionamento neuronal, mais relacionados com o processamento do sinal (WEEMS & SZURSZEWSKI, 1978; DECKTOR & WEEMS, 1981; JULE & SZURSZEWSKI, 1983). Um neurônio fásico sinaliza bem transições, mas não estados estacionários. Os neurônios tônicos sinalizam transições e estados estacionários, embora a transição não seja tão nítida quanto no neurônio fásico (LEVITAN & KACZMAREK, 1991). No presente não investigamos como essas alterações se refletiriam especificamente ao nível do controle da pressão arterial.

O deslocamento da resposta neuronal a estímulo despolarizante de longa duração para um padrão mais tônico implicam alterações de correntes iônicas que modulam a excitabilidade neuronal. Entre essas correntes estão as correntes de potássio A e M (OUBROWN & NARAHASHI 1988; YAMADA, et al., 1989; CASSEL & MCLACHCAN, 1986), e D2 (WANG & MCKINNON, 1995).

Modificações do estado de ativação da corrente A de potássio, contudo, não parecem ser a causa do aumento da excitabilidade neuronal observada neste trabalho, pois a faixa de inativação da corrente A se situa entre -55 e -60 sendo necessárias hiperpolarizações a -70 mV para a desativação desta corrente, faixas estas que não inclui o potencial transmembrana que clampeamos em -60 mV (MCKINNON & WANG, 1995), bem como, com as incursões de voltagens dos pulsos despolarizantes que utilizamos. Adicionalmente, vale relembrar que a corrente A é considerada de pouca importância para a modulação da excitabilidade dos neurônios fásicos do GCS (MCLACHLAN, et al., 1986; MCKINNON & WANG, 1995).

A corrente I_{D2} , não parece ser a causa, pois quando a I_{D2} é bloqueada com TEA as células se mantêm no seu padrão tônico (STORM, 1988; WANG & MCKINNON, 1995).

A corrente M, dentre todas aquelas que modulam a excitabilidade neuronal, conhecidas no momento, parece ser a que melhor se adapta ao padrão de modificações promovidas pela ouabaína em concentração de 10 nM. A faixa de ativação da corrente M em neurônios simpáticos se situa de -55 a -35 mV (BROWN & ADMS, 1980). Assim, alterações do estado de condutância do canal M

poderão contribuir de maneira insignificante para determinação do potencial de repouso. Contribuirão também de maneira insignificante para determinação da resistência de entrada, quando essa for medida com o protocolo utilizado nesse trabalho, ou seja, com pulsos hiperpolarizantes a partir de um potencial transmembrana mantido em -60 mV e sendo suportado por vários trabalhos onde a existência do padrão tônico não altera as propriedades passivas da célula (CASSEL, et al., 1984). Como os neurônios utilizados já apresentavam um potencial de repouso próximo a -60 (≈ -58 mV), para manter a voltagem transmembrana ao longo do experimento ajustada em -60 mV, necessitou-se de pequena quantidade de corrente de clameamento, que também, como seria de se esperar, não foi alterada pela modificação do estado de ativação do canal M. As alterações do canal M não alteram os parâmetros do potencial de ação tais como, duração, "overshoot", amplitude, voltagem limiar, etc., que se devem ao estado de ativação do canal rápido de Na^+ e a outros canais de K^+ (WANG & MCKINNON, 1995). As características do potencial de ação desse trabalho não se alteraram, o que está em acordo com a hipótese de alteração do canal M*. Por outro lado, a inativação dos canais M promoveria um aumento do número de potenciais de ação em um pulso de longa duração, transformando a célula de fásica em tônica (ADMS, et al 1982) ou transformando a sua resposta de voltagem a uma onda quadrada de corrente para um padrão mais tônico, no sentido de que após a ouabaína ele está mais próximo de ser tônico. Há definições de neurônios fásicos e tônicos. A mais aceita para neurônios do sistema nervos autônomo é a proposta por (MCLACHLAM, 1986) que define como neurônios tônicos aqueles que, em sua resposta de voltagem a um estímulo que seja uma onda quadrada de corrente de 1 segundo de duração, de amplitude o dobro do limiar, apresente potenciais de ação ao longo de toda a duração do estímulo. Nesse trabalho não utilizamos ondas quadradas de 1 segundo de duração. Nossas ondas quadradas de corrente tiveram, contudo, duração suficientemente longa para demonstrar com clareza o deslocamento da resposta de voltagem em direção ao padrão tônico. Além disso, é importante observar que as alterações no número de potenciais de ação na resposta ao pulso que foi o duplo do limiar de corrente, foram de grande monta em relação ao que pode representar para aumento do fluxo de informação, pois representaram aumentos de aproximadamente de 100 a 600 %. Isso se

traduziria num grande aumento das informações que levariam a um grande aumento do tônus do efetor simpático.

5.4 A localização anatômica dos neurônios afetados

A localização dos neurônios que utilizamos, todos provenientes do GCS, tem importância na interpretação dos resultados. Sabemos que vários tipos neuronais, de diferentes localizações, estão envolvidos no controle da pressão arterial, desde neurônios aferentes, como os dos gânglios nodoso e jugular, passando pelos neurônios processadores e controladores do núcleo do trato solitário (SPYER, 1981; SELLER & ILLERT, 1969; KUMADA, et al., 1990; KALIA & MESULAM, 1980) e de vários outros locais do sistema nervoso central, até os neurônios mais distais na cadeia neuronal, que no caso do sistema nervoso autônomo simpático são os neurônios pós-ganglionares. Os neurônios do GCS são do tipo mais distal do SNA simpático. Fazem sinapse diretamente com os efetores. Cada neurônio da cadeia controladora da homeostase da função cardiovascular, onde se situa o controle da pressão arterial, pode ser representado por uma função de transferência com várias alças de feedback. Nessa situação, uma modificação de uma função de transferência terá maior chance de levar a uma modificação do output sem posterior atenuação se ela ocorrer na última função de transferência que gera diretamente o output. Ora, os neurônios do GCS estão em contato imediato com efetores (GIBBINS, 1990). Assim, uma modificação no padrão de funcionamento desses neurônios representa uma probabilidade bem mais alta de que essas modificações levem a uma alteração do tônus do efetor do que em outros locais do sistema nervoso. Assim uma demonstração de aumento de atividades que levarão a aumento de tônus simpático terão chance muito maior de se manifestar ao nível do efetor se ocorrerem no GCS do que se ocorrerem, por exemplo no hipotálamo. Em realidade, é sabido que a ouabaína altera a excitabilidade em neurônios do hipotálamo e da região rostro-ventro-lateral do bulbo. Se a essas considerações forem adicionadas aquelas concernentes ao aumento da excitabilidade, discutidas acima, concluiremos que os dados desse estudo sugerem que a ouabaína

endógena, que atinge concentrações iguais ou superiores a 10 nM, é um fator de aumento da pressão arterial. Contudo, essa demonstração de aumento da excitabilidade neuronal simpática necessita de ser comprovada em estudos em gânglios simpáticos intactos. Estudos de Hamlyn e colaboradores têm demonstrado que a infusão contínua de ouabaína em doses diárias que promovem aumento da sua concentração plasmática em ratos na faixa fisiológica, após poucos dias promove hipertensão arterial e, nos gânglios retirados desses animais hipertensos, aumento da transmissão sináptica do GCS (YUAN et al., 1993).

5.5 Interação entre os Efeitos da Ouabaína e o $[K^+]$ da solução nutritora

Sabe-se que os efeitos da ouabaína são antagonizados por aumentos da $[K^+]$ extracelular (HAMLYN, et al., 1991; BAKER & WILLIS, 1972). Esse antagonismo ocorre também em relação as células do córtex-adrenal em cultura (WARD, et al, 2002). Os dados do presente estudo estão de acordo com esse padrão de interação quando demonstram que a variação da $[K^+]$ de 4,7 mM, um valor considerado bem fisiológico, para 5,6 mM, promove uma diminuição da excitabilidade, que foi pequena, mas detectável através da presença de significância na diferença entre o número de potenciais na resposta de voltagem à onda quadrada de corrente dupla do limiar (Tabela 04). Esses dados sugerem também uma hipótese muito interessante. Na medida em que a ouabaína participar da modulação dos valores da pressão arterial, seja como fator de controle, seja como fator de perturbação, a $[K^+]$ passa a ser o elemento que desloca a ligação da ouabaína com a bomba e se liga em receptores para ouabaína nas células adrenocorticais participando de um mecanismo de feedback, que poderá também contribuir como fator de perturbação ou de controle da PA. Num contexto mais amplo, os dados sugerem que concentrações de um outro íon, o K^+ , além da $[Na^+]$ extracelular (LIAKEN & FARNESTIL, 1991), podem interferir com o controle da PA.

5.6 Ouabaína, hipertensão e os dados da presente investigação

Os dados da presente tese elencam os trabalhos que se apresentam na literatura que dão suporte a hipótese que vem sendo construída de que a ouabaína e outros compostos ouabaína símile são secretados na circulação pela células do córtex das adrenais, não apresentando diferença estrutural, na resposta frente a anticorpos e perfis cromatográficos, se caracterizando como um hormônio endógeno. As evidências experimentais também apontam para uma forte correlação entre a ouabaína e estados de hipertensão essencial, sendo inclusive isolada de plasma humano e sendo inclusive responsável pela reversão de um estado hipertensivo quando um ouabaínoma foi retirado de uma paciente. Entretanto não haviam evidências da ação da ouabaína em concentrações fisiológicas de 10 nM alterando o padrão de disparo de neurônios de um efector final da rede neuronal de controle da pressão arterial, mesmo a despeito de estar bem caracterizado a sua ação sobre outras estrutura como o hipotálamo. Há a necessidade de se aprofundar os estudo eletrofisiológicos para que se encontre uma forma de trazer este efector para o seu comportamento fásico. Ficou bem claro que as alterações causadas pela ouabaína se localizam nas faixas de voltagem das correntes de potássio sem entretanto causar modificações nas propriedades passivas dos neurônios simpáticos, fato este corroborado por outros autores em gânglios intactos de animais hipertensos. A corrente de potássio que se apresenta como uma forte candidata é a corrente M e portanto um dos passos a serem estudados. Entretanto o fato das concentrações de potássio poderem modular o aumento da excitabilidade destes neurônios, indicando haver um mecanismo de modulação dependente de potássio, operante também em neurônios a semelhança dos fatos experimentais descritos por Hamylin em fevereiro de 2002, nos leva a questionar se os achados na literatura que demonstram ser o potássio um íon com propriedades antihipertensinogênicas, se devem somente a propriedade das altas concentrações de potássio produzem (EISNER, et al., 1984). Uma desfosforilação da enzima em um estado inicial por ocasião da translocação do cátion para o citoplasma. Em nossos estudos a raminoase não

apresentou atividade excitatória nas mesmas concentrações de ouabaína como era de se esperar.

6 CONCLUSÃO

A ouabaína, em concentrações nanomolares (10 nM), é capaz de provocar uma perda de acomodação em neurônios agudamente dissociados do GCS, levando a alteração do padrão de disparo desses neurônios, de fásico para mais tônico. Esta perda de acomodação é modulada por alterações das concentrações de potássio dentro da faixa fisiológica. As alterações observadas neste estudo são semelhantes àsquelas observadas em ratos espontaneamente hipertensos e são coerentes com a hipótese de que a ouabaína endógena pode ser um fator causador de hipertensão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, F. M., THAMES, M. D.: Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. In: **Geiger SR (ed). Handbook of Physiology: A Critical, Comprehensive Presentation of Physiological Knowledge & Concepts.** section 2: The Cardiovascular System. Bethesda, MD: **American Physiological Society.**, v. 3, p. 675 - 753, 1983.

ABBOUD, F. M.: Interaction of cardiovascular reflexes in humans. In: Lown B, Malliani A, Prosdocimi M (eds). **Neural Mechanisms & Cardiovascular Disease.** Berlin: Springer-Verlag, p. 73 - 84, 1986.

ABELES, M., & Y. PRŪT. 1996.: Spatio-temporal firing patterns in the frontal cortex of behaving monkeys. **J. Physiol.** Paris. 90:249-250

ADAMS, P. R., BROWN, D. A., CONSTANTINI, A.: M-currents & other potassium currents in bullfrog sympathetic neurones. **Journal of Physiology**, v. 330, p. 537-572, 1982.

AMENDT, K., CZACHURSKI, I., DEMBOWSKY, K., et al.: Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 1, p. 103 - 107, 1979.

ARITA, H., KOGO, N., ICHIKAWA, K. Locations of medullary neurons with nonphasic discharges excited by stimulation of central and/or peripheral chemoreceptors & by activation of nociceptors in cat. **Brain Res.**, v. 442, p. 1-10, 1988.

ARNAUD, M. Sur la matiere cristallisee active de fleches empoisonnees des Comalis, extraite du bois d'Ouabaio. C. R. **Acad. Sci.**, Paris, v. 106, p. 1011-1014, 1888.

BAIR, W., & C. KOCH.: Temporal precision of spike trains in extrastriate cortex of the behaving macaque monkey. **Neural Comput.** 8:1185-1202, 1996

BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P.: HODGLIN, A. L., STEINHARDT, R. D. The influence of calcium ions on sodium influx in squid axons. **J. Physiol.**, Lond., v. 200, p. 431 - 458, 1969.

BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P.: Sodium-dependent uptake of calcium by crab nerve. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 150, p. 167-170, 1968.

BAKER, P. F., WILLIS, J. S. Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells. **J. Physiol.**, v. 224, p. 441 - 462, 1972.

BAKER, P. F., WILLIS, J. S. Inhibition of the sodium pump in squid giant axons by cardiac glycosides: dependence on extracellular ions & metabolism. **J. Physiol.**, Lond., v. 224, p. 463 - 475, 1972.

BALDA, M. S., PIROLA, C. J., DABSYS, S. M., FINKIELMAN, S., NAHMOD, V. E. Saralasin blocks the effect of angiotensin II & extracellular fluid saline expansion on the Na-K-ATPase inhibitor release in rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, Part A Theory Pract., v. 8, p. 997 - 1008, 1986.

BAULIEU, E. E.: Neurosteroids: a new function in the brain. **Biol. Cell.**, v. 71, p. 3 - 10, 1991.

BAULIEU, E. E., ROBEL, P. (1995). Nongenomic mechanisms of action of steroid hormones. In Bock, G.R. & Goode, J.A. (eds.) *Nonreproductive Actions of Sex Steroids*, p. 24 - 42. **CIBA Foundation Symposium** 1991. (Chichester: Wiley)

BELARDINELLI, L., D. HARDER, N., SPERELAKIS, R., RUBIO, & BERNE, R. M. Cardiac glycoside stimulation of inward Ca^{2+} current in vascular smooth muscle of canine coronary artery. **J. Pharmacol., Exp. Ther.**, v. 209, p. 62-66, 1979.

BELLUZZI, O., SACCHI, O. A five conductance model of the action potential in the rat sympathetic neurone. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 55, p. 1-30, 1991.

BELLUZZI, O., SACCHI, O. WANKE, E. A fast transient outward current in the rat sympathetic neur, studied under voltage-clamp conditions. **J. Physiol.**, Lond., v. 38, p. 91 - 108, 1985a.

BELLUZZI, O., SACCHI, O., WANKE, E. Identification of delayed potassium and calcium currents in the rat sympathetic neurone under voltage clamp. **J. Physiol.**, Lond., v. 38, p. 109 – 129, 1985b.

BLANCO, G., BERBERIAN, G., BEAUGÉ, L. Detection of a highly ouabain sensitive isoform of rat brainstem Na.K-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1027, p. 1 – 7, 1990.

BLATZ, A. L., MAGLEBY, K. L. Calcium-activated potassium channels. **Trends Neurosci.** v. 10, p. 463 – 467, 1987.

BLATZ, A.,L., MAGLEBY, K. L. Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance cultured rat skeletal muscle. **Nature**, v. 323, p. 718 - 720, 1986.

BLAUSTEIN, M. P. Commentary. What is the link between vascular smooth muscle sodium pumps and hypertension? **Clin. Exp. Hypertens**, v. 3, p. 173 - 178, 1981.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca⁺² stores and cell responsiveness, **Am. J. Physiol.**, v. 204, p. C1367 - C1387, 1993.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. **Am. J. Physiol.**, v. 232, (Cell Physiol. 1), p. C165-C173, 1977.

BLAUSTEIN, M. P. The role of Na⁺-Ca⁺² exchange in the regulation of tone in vascular smooth muscle. In: *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*,

edited by. CASTEELS, R., GODFRAIND, T., RUEGG, J. C. Amsterdam: **Elsevier North-Holland Biomedical**, , p. 101 - 108, 1977.

BLAUSTEIN, M. P., DIPOLO, R., REEVES, J. P. Sodium/calcium exchange; proceedings of the second international conference. **Ann. NYAcad. Sci.**, v. 459, p. 1-671, 1991.

BLAUSTEIN, M. P., GOLDMAN, W. F., FONTANA, G., KRUEGER, B., SANTIAGO, E. M., STEELE, T. D., WEISS, D. N., YAROWSKY, P. J. Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle. **Ann. NYAcad. Sci.**, v. 639, p. 254 - 274, 1991.

BLAUSTEIN, M. P., HAMLIN, J. M. Endogenous ouabain: implications for cardiovascular disease diagnosis and therapy. **MD. Med. J.**, v. 41, p. 501 - 504, 1992.

BLAUSTEIN, M. P., HAMLIN, J. M. The pathogenesis of essential hypertension: a link between dietary salt and high blood pressure. **Hypertension**, Dallas, v. 18, n. 3, p. 111184 - 111195, 1991.

BLAUSTEIN, M. P., HODGKIN, A. L. The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. **J. Physiol.**, Lond., v. 200, p. 497-527, 1969.

BORIN, M. L., GOLDMAN, W. F., BLAUSTEIN, M. P., Intracellular free Na⁺ in resting and activated A7r5 vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. C1513 - C1524, 1993.

BOULANGER, B. R., LILLY, M. P., HAMLIN, J. M., LAREDO, J., SHURTLEFF, D., GANN, D. Ouabain is secreted by the adrenal gland in awake dogs. **Am. J. Physiol.**, v. 264, (Endocrinol. Metab. 27), p. E413 - E419, 1993.

BRALEY, L. M., WILLIAMS, G. H. The effects of ouabain on steroid production by rat adrenal cells stimulated by angiotensinII, α -1-24 adrenocorticotropin, and potassium. **Endocrinology**, v. 103, p. 1997-2005, 1978.

BROWN, D. A., ADAMS, P. R. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K^+ current in a vertebrate neurone. **Nature**, v. 283, p. 673-676, 1980.

BROWN, D. A., NARAHASHI, T. M. Currents. in Ion Channels. **Plenum**, New York, v. 1, p. 55 – 94, 1988.

BROWN, L., ERDMANN, E. Binding of digitalis derivatives to beef, cat and human cardiac (Na^+ - K^+)-ATPase. Affinity and kinetic constants. **Arch. Int. Pharmacodyn Ther**, v. 271, p. 229-240, 1984.

BUCKLEY, J. P., DOUREOUT, M. F., LIANG, Y. Y., CHELLY, J. E. Central angiotensin II mechanisms and the sodium pump. **J. Hypertens**, v. 4, n. 6, p. S465-S467, 1986.

BUNAG, R. D., EFERAKEYA, A. E. Immediate hypotensive after effects of posterior hypothalamic lesions in a awake rats with spontaneous renal or DOCA hypertension. **Cardiovasc. Res.**, v. 10, p. 663-669, 1976.

BUNAG, R. D., EFERAKEYA, A. E.; LANGDON, D. S. Enhancement of hypothalamic pressor responses in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 228, p. 211-222, 1975.

CABOT, J. B.: Sympathetic preganglionic neurons: cytoarchitecture, ultrastructure, and biophysical properties. In: Loevy AD, Spyer KM (eds). Central Regulation of Autonomic Functions. New York: **Oxford University Press**, p. 44 - 67, 1990.

CARRIER, G. O., IKEDA, S. R. TTX-sensitive Na^+ channels and Ca^{2+} channels of the L- and N-type underlie the inward current in acutely dispersed coeliac-mesenteric ganglia neurons of adult rats. **Pflugers Archiv**, v. 421, p.7-16, 1992.

CASPI, E., LEWIS, D. O. Progesterone: its possible role in the biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata*. **Science Wash DC**, v. 156, p. 519 - 520, 1967.

CASSEL, J. F., McLAHLAN, E. M. The effect of a transient outward current (1L) on synaptic potentials in sympathetic ganglion cells of the guinea-pig. **J. Physiol., Lond.**, v. 374, p. 273 - 288, 1986.

CASSELL, J. F. & LICHLACHLAN, E. M.. Two calcium-activated potassium conductances in a subpopulation of coeliac neurones of guinea-pig and rabbit. *Journal of Physiology* 394, 331-349, 1987.

CASSELL, J. F., CLARK, A. L., MCLACHLAX, E. M. Characteristics of phasic and tonic sympathetic ganglion cells of the guinea-pig. *Journal of Physiology*, v. 372, p. 457-483, 1986.

CATTELL, M., GOLD, H. Influence of digitalis glycosides on force of contraction of mammalian cardiac muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 62, p. 116 - 125, 1938.

CAURLELD, V. A., XU, K., D'AQUILLA, Y. T., SHYJAN, A. W., LEVENSON, R. Molecular cloning and characterization of Na⁺-K⁺-ATPase from *Hydra vulgaris*: implications for enzyme evolution and ouabain sensitivity. *New Biol.*, v. 4, p. 339 - 348, 1992.

CHADWICK, D., WIDDOWS, K.. Steroids and Neuronal Activity, **Ciba Foundation Symposium 153**. (Chichester: Wiley) (eds.), (1990)

COHEN, M. P. Aldose reductase, glomerular metabolism, and diabetic nephropathy. *Metab. Clin. Exp.*, v. 35, n. 1, p. 55-59, 1986.

CONNOR, J. A., STEVENS, C. F. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on a isolated neurone soma. *J. Physiol.*, Lond., v. 213, p. 31 - 53, 1971b.

CONNOR, J. A., STEVENS, C. F. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.*, Lond. v. 213, p. 21 - 30, 1971a.

CONSTANTI, A., BROWN, D. A. M-currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neuroscience Letters*, v. 24, p. 289-294, 1981.

COOKSON, H. The thyroid and the heart. *Br. Med. J.*, v. 1, p. 254 - 259, 1959.

COOKSON, M. S., IBBERTSON, H. K. Serum digoxin in patients with thyroid disease. *Br. Med. J.*, v. 3, p. 566 - 568, 1975.

COOPER, E. J., SHRIER, A. Inactivation of A currents and A channels on rat nodose neurons in culture. **J. Gen. Physiol.**, v. 94, p. 881 – 910, 1989.

COOPER, E., SHRIER, A. Single-channel analysis of fast transient potassium currents from rat nodose neurones. **J. Physiol. Lond.**, v. 369, p. 199 – 208, 1985.

COOTE, J. H.: The organization of cardiovascular neurons in the spinal cord. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 110, p. 147 - 285, 1988.

COWLEY, A. W. Jr.: Long-term control of arterial blood pressure. **Physiol. Rev.**, v. 72, p. 231 - 300, 1992.

CROWCROFT, P. J., HOLMAN, M. E., SZURSZEWSKI, J. H. Excitatory input from the distal colon to the inferior mesenteric ganglion in the guinea-pig. **Journal of Physiology**, v. 219, p. 443-461, 1971.

CZYZEWSKA-SZAFRAN, H., WUTKIEWICZ, M., REMISZEWSKA, M., JASTRAZEBSKI, Z., CZARNECKI, A., DANYSZ, A. Down-regulation of the GABA-ergic system in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 41, p. 619 – 627, 1988.

DAMPNEY, R. A. L.: Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 323 - 364, 1994.

DATYNER, N. B., GINTANT, G. A., COHEN, I. S. Versatile temperature controlled tissue bath for studies of isolated cells using an inverted microscope. **Pflugers Archiv.**, v. 403, p. 318-323, 1985.

DAUT, J. Modulation of the excitatory synaptic response by fast transient K⁺ current in snail neurones. **Nature**, v. 246, p. 193 - 196, 1973.

DECHATEL, R., P. WEIDMANN, J. FLAMMER, W. H., ZIEGLER, C., BERETTA-PICCOLI, VETTER, W., REUBI, F. C. Sodium renin, aldosterone, catecholamines, and blood pressure in *diabetes mellitus*. **Kidney Int.**, v. 12, p. 412 - 421, 1977.

DECKTOR, D. L., WEEMS, W. A. A study of renal-efferent neurones and their neural connexions within cat renal ganglia using intracellular electrodes. **Journal of Physiology**, v. 321, p. 611-626, 1981.

DECKTOR, D. L., WEEMS, W. A. An intracellular characterization of neurones and neural connections within the left coeliac ganglion of cats. **Journal of Physiology**, v. 341, p. 197-211, 1983.

DEVRIES, G. J., DEBRUIN, J. P. C., UYLINGS, H. B. M., Corner, M. A. (eds.), Sex differences in the brain. **Progress Brain Res**, v. 61, (Amsterdam: Elsevier) (1984).

DEWARDENER, H. E., MACGREGOR, G. A. Dahl's hypothesis that a saluretic substance may be responsible for a sustained rise in arterial pressure. Its possible role in essential hypertension. **Kidney Int.**, v. 18, p. 1 - 9, 1980.

DIBONA, G. F., JONES, S. Y. Arterial baroreflex function in borderl hypertensive rats. **Hypension**, v.19, p. 56-61, 1992.

DIXON, J. E., MCKINNON, D. Expression of the trk gene family of neurotrophin receptors in prevertebral sympathetic ganglia. **Developmental Brain Research**, v. 77, p. 177-182, 1994.

DODGE, F. A., COOLEY, J. W. Action potential of the motoneuron. **IBM J. Res. Dev.**, v. 17, p. 219 – 229, 1973.

ECCLES, R. M. Intracellular potentials recorded from a mammalian sympathetic ganglion. **J. Physiol.**, London, v. 130, p. 572 - 584, 1995.

ECKBERG, D. L., FRITSCH, J. M.: How should human baroreflexes be tested **News. Physiol. Sci.**, v. 8, p. 7 - 12, 1993.

EILAM, P., MALACH, R., BERGMANN, F., SEGAL, M. Hypertension induced by hypothalamic transplantation from genetically hypertensive to normotensive rats. **J. Neurosci.**, v. 1, p. 401-411, 1991.

EISNER, D. A., LEDERER, W. J., VAUGHAN-JONES, R. D. The quantitative relationship between twitch tension and intracellular sodium activity in sheep cardiac Purkinje fibres. **J. Physiol.**, v. 355, p. 251 - 266, 1984.

EISNER, D. A., SMITH, T. W. The Na-K pump and its effectors in cardiac muscle. In: *The Heart and Cardiovascular System* (2nd ed.), edited by FOZZARD, H. A., HABER, E., JENNINGS, R. B., KATZ, A. M., MORGAN, H. E. New York: Raven, v. 1, p. 863 - 902, 1992.

ELLIS, D. The effects of external cations and ouabain on the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinje fibres. **J. Physiol.**, Lond., v. 273, p. 211 - 240, 1977.

FAGGE, C. H., STEVENSON T. On the application of physiological tests for certain organic poisons, and especially digitaline. **Proc. R. Soc.**, Lond., v. 14, p. 270 - 274, 1865.

FIESER, L. F., FIESER, M., STEROIDS. New York: Reinhold, p. 727 - 809. 1959.

FINKEL, A. S., REDMAN, S. Theory and operation of a single microelectrode voltage clamp. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 101-127, 1984.

FORBUSH, B., III. Cardiotonic steroid binding to Na⁺K⁺-ATPase. **Curr. Top. Membr. Transp.** v.19, p. 167-201, 1983.

FRANIOLINI, F. Calcium and voltage dependence of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from cultured hippocampal neurons of rat. **Biochim. biophys. Acta.**, v. 943, p. 419 - 421, 1988.

FRESCHI, J. E. Membrane currents of cultured rat sympathetic neurons under voltage clamp. **J. Neurophysiol.** v. 50, p. 1460 - 1478, 1983.

GALVAN, M. A transient outward current in rat sympathetic neurones. **Neurosci. Lett.** v. 31, p. 295 - 300, 1982.

GALVAN, M., SEDLMEIR, C. Outward currents in voltage-clamped rat sympathetic neurones. **J. Physiol.**, Lond., v. 356, p. 115 - 133, 1984.

GARDOS, G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. **Biochim. biophys. Acta.**, v. 30, p. 653 – 654, 1958.

GERALD, F., DIBONA, SUSAN, Y, JONES, LINDA, L., SAWIN, DIBONA. Renal sympathetic neural mechanisms as intermediate phenotype in spontaneously hypertensive rats et al. **Hypertension** v. 27, n. 3, Part 2 march, 1996.

GIBBINS, L.: Peripheral autonomic nervous system. In: Paxinos G (ed). The Human Nervous System. San Diego: **Academic Press.**, p. 93 - 123, 1990.

GOTO, A., K., YAMADA, M., IEHII, M. YOAHIOKA, T. IEHIGURO, EGUCHI, C., SUGIMOTO, T. Purification and characterization of human urine-derived digitalis-like factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 154, p. 847-853, 1988.

GOTO, A., YAMADA, K., YAGI, N., NAGOAH, H., HUI, C., SUGIMOTO, T. Novel concept on the roles of ouabain-like compound (OLC) in hypertension (Abstract). **J. Hypertens.**, v. 10, n. 4, p. S50, (1992)

GOTO, A., YAMADA, K., YAGI, N., YOSHIOKA, M., SUGIMOTO, T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, p. 377 - 399, 1992.

GRAY, C. M., KONIG, P., ENGEL, A. K., SINGER, W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. **Nature**, v. 338, p. 334 – 337, 1989.

GREEFF, K., SCHADEWALDT, H. Introduction and remarks on the history of cardiac glycosides. In: Cardiac Glycosides. Part I: **Experimental Pharmacology**, edited by K. Greeff Berlin: Springer-Verlag., p. 1-12, 1981.

GREEFF, K., WIRTH, K. E. Pharmacokinetics of Strophanthus glycosides. In: Cardiac Glycosides. **Part II: Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology**, edited by K. Greeff. Berlin: Springer-verlag, , p. 57 - 85, 1981.

GREENE, R. W., HAAS, H. L., REINER, P. B. Two transient outward currents in histamine neurones of the rat hypothalamus in vitro. **J. Physiol.**, Lond., v. 420, p. 149 - 163, 1990.

GRIFFITH, W. H., GALLAGHER, J. P., SHINNICK-GALLAGHER, P.. An intracellular investigation of cat vesical pelvic ganglia. **Journal of Neurophysiology**, v. 43, p. 343-354, 1980.

HADDY, F. W., OVERBECK, H. W. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. **Life Sci.** v. 19, p. 935-948, 1976.

HAGIWARA, S., KLSA.O, K., SAITO, N. Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media **J. Physiol.** Lond., p. 155 – 489, 1961.

HAINSWORTH, R.: Reflexes from the heart. **Physiol. Rev.**, v. 71, p. 617 - 658, 1991.

HAMBLEY, J. W.; JOHNSTON, G. R.; SHAW, J. Alterations in a hypothalamic GABA system in the spontaneously hypertensive rat. **Neurochemistry**, v. 6, p. 813-822, 1984.

HAMLYN, J. M. Increased levels of a humoral digitalis-like factor in deoxycorticosterone acetate-induced hypertension in the pig. **J. Endocrinol.**, v. 122, p. 409 - 420, 1989.

HAMLYN, J. M., & P. MANUNTA. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. **J. Hypertens.** 10, Suppl. 7: S99-S111, 1992.

HAMLYN, J. M., BLAUSTEIN, M. P. Sodium chloride, extracellular fluid volume, and blood pressure regulation. **Am. J Physiol.**, (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 20), v. 251, p. F563-F575, 1986.

HAMLYN, J. M., BLAUSTEIN, M. P., BOVA, S., DUCHARME, D. W., HARRIS, D. W., MANDEL, F., MATHEWS, W. R., LUDENE, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc. NatL Acad. Sci.**, USA, v. 81, p. 6259 - 6263, 1991.

HAMLYN, J. M., COHEN, N., ZYREN, J., BLAUSTEIN, M. P. Activating effects of low dose cardiotonic steroids on dog kidney Na,K-ATPase activity: role of endogenous inhibition. In: *The Sodium Pump*, edited by I. Isl. Glynn and C. Ellory. Cambridge, UK: **The Company of Biologists**, p. 667-673, 1985.

HAMLYN, J. M., R. RINGEL, J. SCHAEFFER, P. D. LEVINSON, B. P. HAMILTON, A. A. ROWARAKI, & M. P. BLAUSTEIN. A circulating inhibitor of (Na⁺K) - ATPase associated with essential hypertension. **Nature**, Lond., v. 300, p. 650 - 652, 1982.

HANING, R. S., TAIT, A. S., TAIT, J. F. In vitro effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells. **Endocrinology**, v. 87, p. 1147 - 1167, 1970.

HIERHILZER, K. BÜHLER, H. Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action. In: GREGER, R. & WINDHORST, U. (Eds): **Comprehensive Human Physiology**, 1996; vol. 1, p. 404-429, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

HINES, M. The NEURON simulation program. In: **Neural Network Simulation Environments**, ed. Skrzpek, J., Kluwer Academic, Norwell, MA, p. 127-136, 1993.

HIRST, G. D. S., JOHNSON, S. M., VAN HELDEN, D. F. The slow calcium-dependent potassium current in a myoenteric neurone of the guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, Lond., v. 361, p. 315 - 337, 1985.

HIRST, G. D. S., McLACHLAN, E. M. Development of dendritic calcium currents in ganglion cells of the rat lower lumbar sympathetic chain. **Journal of Physiology**, v. 377, p. 349-368, 1986.

HOFFMAN, B. F., BIGGER, J. T. Jr. Digitalis and allied cardiac glycosides. In: Coodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (8th ed.), edited by A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies, and P. Taylor. New York: Macmillan, 1990, p. 814 - 839.

HOPKINS, D. A.: The dorsal motor nucleus of the vagus nerve and the nucleus ambiguus: structure and connections. In: Hainsworth R, McWilliam PN, Mary DAS (eds). *Cardiogenic Reflexes*. oxford: **Oxford University Press.**, p. 185 - 203, 1987.

IRIUCHIJIMA, J. Arterial pressure in spontaneously hypertensive rats after high spinal cord section. **Jpn. Circ. J.**, v. 40, p. 887-888, 1976.

JACOBS, W. A., BIGELOW, N. M. Ouabain or g-strophanthin. **J. Biol. Chem.**, v. 96, p. 647 - 658, 1932.

JANDHYALA, B. S., ANSARI, A. F. Elevation of sodium levels in the cerebral ventricles of anaesthetized dogs triggers the release of an inhibitor of ouabain-sensitive sodium, potassium ATPase into the circulation. **Clin. Sci. Lond.**, v. 70, p. 103 - 110, 1986.

JANIG, W.: Functions of the sympathetic enervation of the skin. In: Loewy AD, Spyer KM (eds). *Central Regulation of Autonomic Functions*. New York: **Oxford University Press.**, p. 334 - 348, 1990.

JANIG, W.: Pre and postganglionic vasoconstrictor neurons: differentiation, types, and discharge properties. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 50, p. 525 - 539, 1988.

JEWCIL, E. A., LINGREL, J. B. Comparison of substrate dependence properties of the rat Na⁺/K⁺ATPase α_1 , α_2 and α_3 isoforms expressed in HeLa cells, **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 16925 - 16930, 1991.

JONES, K. J. Gonadal steroids and neuronal regeneration. A therapeutic role. **Adv. Neurol.**, v. 59, p. 227 - 400, 1993.

JOYNER, M. J., SHEPHERD, J. T.: Autonomic control of circulation. In: Low PA (ed). *Clinical Autonomic Disorders: Evaluation and Management*. Boston: Little, Brown and Company, p. 55 - 67, 1993.

JUBELIN, B. C., KANNAN, M. S. Neurons from neonatal hypertensive rats exhibit abnormal membrane properties in vitro. **Am. J. Physiol.**, v. 259, (Cell Physiol. 28), p. C389-C396, 1990.

JUHASZOVA, M., BLAUSTEIN, M. P. Na⁺ pump ion and high ouabain affinity subunit isoforms are differently distributed in cells, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 1800 – 1805, 1997.

JUHASZOVA, M., BLAUSTEIN, M. P., Distinct. distribution of different Na⁺ pump α subunit isotorms in plasmalemma: physiological implications, **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 834, p. 524 - 535, 1997.

JULE, Y., SZURSZEWSKI, J. H. Electrophysiology of neurones of the inferior mesenteric ganglion of the eat. **Journal of Physiology**, v. 344, p. 277-292, 1983.

JUNG, L. M. Therapeutic use of digitalis until tbe time of William Withering. In: **Cardiac Glycosides 1785 - 1985. Biochemistry –Pharmacology – Clinical Relevance**, edited by E. Erdmann, K. Greeff, & J. C. Skou. Darmstadt, Germany: Steinkopff Verlag, 1986, p. 17 - 18.

JUNG-TESTAS, I., RENOIR, J. M., GASE, J. M., BAULIEU, E. E. Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 193, p. 12 - 19, 1991.

JUNG-TESTAS, I., SCHUMACHER, M., ROBEL, P., BAULIEU, E. E. Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 48, p. 145 – 54, 1994.

JUSKEVICH, J. C., ROBINSON, D. S., WHITEHORN, D. Effect of hypothalamic stimulanon in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 51, p. 429-439, 1978.

KALIA, M., MESULAM, M. M.: Brain stem projections of sensory and motor components of the *vagus* complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. **J. Comp. Neurol.**, v. 193, p. 4670 - 508, 1980.

KASAI, H., KAWHEYAMA, M., YAMAGUCHI, K., FUKUDA, J. Single transient K channels in mammalian sensory neurons. **Biophys. J.**, v. 49, p. 1243 – 1247, 1986.

KAWAI, T. L., WATANABE, M. Blockade of Ca-activated K conductance by apamin in rat sympathetic neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, p. 225-232, 1986.

KING, B. F., SZURSZEWSKI, J. H. An electrophysiological study of inferior mesenteric ganglion of the dog. **Journal of Neurophysiology**, v. 51, p. 607-615, 1984.

KING, B. F., SZURSZEWSKI, J. H. Electrotonic characteristics and membrane properties of neurons in the inferior mesenteric ganglion in guinea-pig. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 23, p. 229-239, 1988.

KOSTYUK, P. G., VESELOVSKY, N. S., FEDULOVA, S. A., TSYNDRENKO, A. Y. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons - III. Potassium currents. **Neuroscience**, v. 6, p. 2439 - 2444, 1981.

KUMADA, M., TERUI, N., KUWAKI, T.: Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. **Prog. Neurobiol.**, v. 35, p. 331 - 361, 1990.

KUNTZ, A., SACCOMANNO, G. Reflex inhibition of intestinal motility mediated through decentralized prevertebral ganglia. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, p. 163-170, 1944.

LAIKEN, N.D. & FARNESTIL, D.D. Regulation of volume and osmolality of the body fluids. In: WEST, J.B. (Ed.) **Best and Taylor's basis of medical practice**. 12th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1991.

LANDIS, S. C., PATTERSON, P. H. Neural crest cell lineages. **Trends in Neuroscience**, v. 4, p. 172-175, 1981.

LASKEY, W., POLOSA, C.: Characteristics of the sympathetic pre-ganglionic neuron and its synaptic input. **Prog. Neurobiol.**, v. 31, p. 47 - 84, 1988.

LATORRE, R., OSERHAUSER, A., LAHARCA, P., ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **A. Rev. Physiol.**, v. 51, p. 385 - 399, 1989.

LEVENSON, R. Isoforms of the Na⁺/K⁻-ATPase: family members in search of function, **Rev. Physiol Biochem. und. Pharmacol.**, v. 123, p. 1 - 45, 1994.

LEE, C. O., DAGONTINO, M. Effect of strophanthidin on, intracellular Na ion activity and twitch tension of constantly driven canine cardiac Purkinje fibers. **Biophys. J.**, v. 40, p. 185 - 198, 1982.

LESKE, L., MCKENNA, K. E.: Quantitative analysis of bulbospinal projections from the rostral ventrolateral medulla: contribution of C1-adrenergic and nonadrenergic neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 324, p. 1 - 13, 1992.

LEVITAN, I.B. & KACZMAREK, L.K. Electrical signaling. In: LEVITAN, I.B. & KACZMAREK, L.K. (Eds.) **The neuron, cell and molecular biology**, 1991; p. 33-50, Oxford University Press, New York, NY.

LEW, G. M. Developmental changes in catecholamines in organs and brain regions of genetically hypertensive rats. **Comp. Gen. Pharmacol.**, v. 6, p. 115-120, 1975.

LINDEN, R. J.: The function of atrial receptors. In: Hainsworth R, McWilliam PN/Mary DAS (eds). **Cardiogenic Reflexes**. oxford: **Oxford University Press.**, p. 18 - 44, 1987.

LIVINGSTONE, D., LIVINGSTONE, C. Narrative of an Expedition of the Zamaesi. **London: Murray, 1865, p. 464 - 468.**

LUDENS, J. H., CLARK, M. A., ROBINSON, F. G., DUCHARME, D. W. Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabainlike compound. **Hypertension Dallas**, v. 19, p. 721 - 724, 1992.

MAGEE, J. C., SCHOFIELD, G. G. Neurotransmission through sympathetic ganglia of spontaneously hypertensive rats **Hypertension**, Dallas, v. 20, p. 367 - 373, 1992.

MAJEWSKA, M. D., Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. **Progress Neurobiol.**, v. 38, p. 379 - 395, 1992.

MANUNTA, P. Ç., HAMILTON, B. P. Ç., HAMYLIN, J. M. Structure-activity relationships for the hypertensinogenic activity of ouabain: Role of the sugar and lactone ring., (2 part 2) feb., v. 37, p. 472 - 477, 2001.

MANUNTA, P., G. EVANS, B. P., HAMILTON, D., GANN, J., RESAU, HAMLYN, J. M. A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor (Abstract). **J. Hypertens**, v. 10, n. 4, p. S27, 1992.

MANUNTA, P., ROGOWSKI, A. C., HAMILTON, B. P., PRUCE, E., HAMLYN, J. M. High dietary intake of sodium increases plasma ouabain levels in normal man (Abstract). **Hypertension Dallas**, v. 20, p. 427, 1992.

MARTY, A. Ca-dependent K-channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. **Nature**, v. 291, p. 497 – 500, 1981.

MATSUMOTO, M. Morphological studies on the autonomic nervous system of hypertensive rats. II. Enzyme histochemical study on the superior cervical sympathetic ganglion of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, v. 31, p. 1187-1196, 1967.

MAUE, R. A., DIONNE, V. E. Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons. **J. Gen. Physiol.** v. 90, p. 95 – 125, 1987.

McAFEE, D. A., YAROWSKY, P. J. Calcium-dependent potentials in the mammalian sympathetic neurone **J. Physiol.**, Lond., v. 290, p. 507 – 523, 1979.

MCCARRON, M., ALGCR, B. E., Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: role of a Ca²⁺-dependent conductance, **J. Neurophysiol.**, v. 57, p. 509, 1987.

MCEWEN, B. S. Steroid hormones are multifunctional messengers to the brain. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v. 2, p. 62-70, 1991.

MCEWEN, B. S., GOULD, E., ORCHINIK, M., WEILAND, N.G., WOOLLEY, C. S., Oestrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes, 1995.

MCGRAIL, K. M., PHILLIPS, J. M., SWEADNER, K. J. Immuno-fluorescent localization of three Na-K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na-K-ATPase. **J. Neurosci.**, v. 11, p. 381 – 391, 1991.

MCLACHLAN, E. I., MECKLER, R. L. Characteristics of synaptic input to three classes of sympathetic neurone in the coeliac ganglion of the guinea-pig. **Journal of Physiology**, v. 415, p. 109-129, 1989.

MEECH, R. W. & STANDEN, N. B. Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. **J. Physiol.**, Lond., v. 249, p. 211 – 239, 1975.

MILANICK, M. A. Ferret red cells: Na/Ca exchange and Na-K-Cl cotransport. **Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.** 102A: 619 - 624, 1992

MOVITT, E. R. Digitalis and Other Cardiotonic Drugs. New York: **Oxford Univ. Press**, p. 160, 1949.

NAGATSU, T., IKUTA, K. Y., NUMATA, T., KATO, M., SANO, I. N. A., GATSU, H., UMEZAWA, M., MATSUZARI, T., TAKEUCHI. Vascular and brain dopamine p-hydroxylase activity in young spontaneously hypertensive rats. **Science**, v. 194, p. 290-291, 1976.

NAKAMURA, K., Selective activation of sympathetic ganglia in young spontaneously hypertensive rats. **Nature** London, v. 226, p. 265, 1977.

NEHER, E. Two fast transient current components during voltage clamp of snail neurons. **J. Gen. Physiol.**, v. 58, 36 – 53, 1971.

NERBONNE, J. M., GURNEY, A. M. Development of excitable membrane properties in mammalian sympathetic neurons. **J. Neuro. Sci.**, v. 9, p. 3272 - 3286, 1989.

PARKER, J. C. Sodium-calcium and sodium-proton exchangers in red blood cells. **Methods Enzymol**, v. 173, p. 292 - 300, 1989.

PELIKAN, E. W. Sur un nouveau poison du coeur provenant de l'inee ou onage, et employe au Gabon (Afrique occidentale) comme poison des fleches. *C. R. Acad. Sci. Paris*, v. 60, p. 1209 - 1211, 1865.

PENNEFATHER, P., LANCASTER, B., ADAMS, P. R., NICOLL, R. A. Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 82, p. 3040-3044, 1985.

PIETNNI, G. M., MATTEOLI, G., BANKER, M. J. Caplan, Isoforms of the Na⁺/K⁺ ATPase are present in both axons and dendrites of hippocampal neurons in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 89, p. 8414 - 8418, 1992.

PITTS, R. F., BRONK, D. W. Excitability cycle of the hypothalamus-sympathetic neurone system. *Am. J. Physiol.*, v. 135, p. 504-522, 1942.

POLOSA C, YOSHIMURA M, NISHI S: Electrophysiological properties of sympathetic preganglionic neurons. *Annu Rev Physiol* 50:541-551, 1988.

PRESSLEY, T. A. Phylogenetic conservation of isoform-specific regions with the α -subunit of Na⁺-K⁺-ATPase, *Am. J. Physiol.*, v. 262, p. C743 - C751, 1992.

PRIEST, C. A., PFAFF, D. W., Actions of sex steroids on behaviours beyond reproductive reflexes. In Bock, G.R. & Goode, J.A. (eds.) **Non-reproductive Actions of Sex Steroids**, p. 74 - 89. CIBA Foundation Symposium 191. (Chichester: Wiley) 1995

QUINN, S. D., BRAUNEIC, U., TILLOTCON, D. L., CORNWALL, M. C., WILLIAMS, G. H. Calcium channels and control of cytosolic calcium in rat and bovine zona glomerulosa cells. *Am. J. Physiol.*, v. 262, (Cell Physiol. 31), p. C598 - C606, 1992.

QUINN, S. D., WILLIAMS, G. H., TILLOTTEON, D. L. Calcium response of single adrenal glomerulosa cells to external potassium. *Am. J. Physiol.*, v. 255, (Endocrinol Metab. 18), p. E488 - E495, 1988.

REUTER, H., BLAUSTEIN, M. P., HAUALER, G. Na - Ca exchange and tension development in arterial smooth muscle. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 265, p. 87 - 94, 1973.

REUTER, H., SEITZ, H. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. **J. Physiol.**, Lond., v. 195, p. 451 - 470, 1968.

RNDY, B. Diversity and ubiquity of K channels. **Neuroscience**, v. 2, p. 729 - 749, 1988.

ROBEL, P., BAULIEU, E. E. Neurosteroids. Biosynthesis and function. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 5, p. 1 - 8, 1994.

ROBERTSON, G. L., SHELTON, R. L., ATHAR, S. The osmoregulation of vasopressin. **Kidney Int.**, v. 10, p. 25 - 37, 1976.

ROELFSEMA, P. R., ENGEL, A. K., KONIG, P., SINGER, W. Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. **Nature**, v. 385, p. 157 - 161, 1997.

ROGAWSKI, M. A., The A-current: how ubiquitous feature of excitable cells is it? **Trends Neuro. Sci.**, v. 8, p. 214 - 219, 1985.

ROSS, C. A., RUGGIERO, D. A., PARK, D. H., et al.: Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **J. Neuro.Sci.**, v. 4, p. 474 - 494, 1984.

SAH, P. Role of calcium influx and buffering in the kinetics of a Ca^{2+} -activated K^{+} current in rat vagal motoneurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 68, p. 2237-2347, 1992.

SAH, P., McLACHLAN, E. M. A slow-voltage-activated potassium current in rat vagal neurons. **Proceedings of the Royal Society**, v. 249 B, p. 71-76, 1992.

SALA, F., HERNANDEZ-CRUZ, A. Calcium diffusion in a spherical neuron. **Biophysics Journal**, v. 57, p. 313-324, 1990.

SASAKI, S., LEE, L., IYOTA, I., KAMBARA, S., OKAJIMA, H., INOUE, A., TAKAHASHI, H., TAKEDA, K., YOUSHIKURA, M., NAKAGAWA, M., IJICHI, H. Central GABA-ergic stimulation attenuates hypertension and hypothalamic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens**, v. 4, (suppl. 3), p. S171-S174, 1986.

SAXON, M. E., SAFRONOVA, V. G. The rest-dependent depression of action potential duration in rabbit myocardium and the possible role of the transient outward current. A pharmacological analysis. **J. Physiol.**, Paris, v. 78, p. 461 - 466, 1982.

SCHADEWALDT, H. Fruitful routes and blind alleys taken by digitalis therapy since its introduction by Withering. In: **Cardiac Glycosides 1785-1985. Biochemistry – Pharmacology – Clinical Relevance**, edited by E. Erdmann, K. Greefl & J. C. Skou. Darmstadt, Germany: Steinkopff Verlag, 1986, p. 11 - 16.

SCHATZMANN, H. J. Herzglycoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocytenmembran. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, v. 11, p. 346 - 354, 1953.

SCHMIDT, R. E., MODERT, C. W., YIP, H. K., JOHNSON, E. M. Retrograde axonal transport of intravenously administered ¹²⁵I-nerve growth factor in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes**, v. 32, p. 654-663, 1983.

SCHOENEN, J., FAULL, R. L. M.: Spinal cord: cytoarchitectural, dendroarchitectural, and myeloarchitectural organization. In: Paxinos G (ed). *The Human Nervous System*. San Diego: **Academic Press**, p. 19 - 53, 1990.

SCHOFIELD, G. G., IKEDA, S. R. Potassium currents of acutely isolated rat superior cervical ganglion neurons. **Brain Research**, v. 485, p. 205-214. 1989.

SCHOFIELD, G. G., IKEDA, S. R., Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. **Pflugers Archiv.**, v. 411, p. 481-490, 1988.

SCHONER, W. Endogenous digitalis-like factors. **Clin. Exp. Hyper-tens.**, Part A Theory Pract., v. 14, p 767 - 814, 1992.

SCHUMACHER, M. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. **Trends Neuro. Sci.**, v. 13, 359 – 620, 1990.

SEGAL, M., ROGAWSKI, M. A., BARKER, J. L. A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. **J. Neuro. Sci.** v. 4, p. 604 - 609, 1984.

SELLER, H., ILLERT., M.: The localization of the first synapse in the carotid sinus baroreceptor reflex pathway and its alteration of the afferent input. **Pflugers. Arch.** v. 306, p. 1 - 19, 1969.

SEMBA, T. Intestino-intestinal inhibitory reflexes. **Japanese Journal of Physiology**, v. 4, p. 241-245, 1954.

SHAMRAJ, O. L., LINGREL, J. B. A putative fourth Na⁺/K⁻-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis, **Proc. Nat. Acad. Sci.**, USA., v. 91, p. 12952 – 12956, 1994.

SHEPHERD, J. T., MANCIA, G.: Reflex control of the human cardiovascular system. **Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.**, v. 105, p. 1 - 9, 1986.

SHEPHERD, J. T.: Cardiac mechanoreceptors. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, et al (eds). **The Heart and Cardiovascular System**: Scientific Foundations. New York: Raven Press, v. 2, p. 1535 - 1558, 1986.

SHEU, S.S., BLAUSTEIN, M. P. Sodium/calcium exchange and the control of cell calcium and contractility in cardiac and vascular smooth muscles. In: **The Heart and Cardiovascular System** (2nd ed.), edited by H. A. Fozzard, E. Haber, R. B. Jennings, A. M. Katz, and H. E. Morgan. New York: Raven, 1992, p. 903-943.

SHIMAHARA, T. Modulation of synaptic output by the transient outward potassium current in *Aplysia*. **Neuro. Sci. Lett.**, v. 24, p. 139 - 142, 1981.

SHONDORF, R.: The role of the sympathetic skin response in the assessment of autonomic function. In: Low PA (ed). *Clínica / Autonomic Disorders: Evaluation and Management*. Boston: **Little, Brown and Company**, 231 – 241, 1993.

SHULL, G. E., GREEB, J., LINGREL, J. B. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit from rat brain, **Biochemisiry.**, v. 25, p. 8125 – 8131, 1986.

SIMMONS, M. A. The complexity and diversity of synaptic transmission in the prevertebral sympathetic ganglia. **Progress in Neurobiology**, v. 24, p. 43-93, 1985.

SIMONEAU, M., DISTASI, C., TAUC, L., BARBIN, G. Potassium channels in mouse neonate dorsal root ganglion cells: a patch-clamp study. **Brain. Res.**, v. 412, p. 222 -32, 1987.

SKOK, V. I., Igaku Shoin, Tokyo. Physiology of Autonomic Ganglia, **Journal of the Autonomic Nervou System** v. 72, p. 263-270, 1973.

SKOK, V. I., IVANOV, A. Y. What is the ongoing activity of sympathetic neurons? **Journal of the Autonomic Nervou System**, v. 71, p. 263-270, 1983.

SKOU, J. C. Further investigations on a Mg²⁺Na⁺-activated adenosinetriphosphatase possibly related to the active transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve cell membrane. **Biochim. Biophys. Acta** 42: 6-23, 1960.

SKOU, J. C. The influence of some cations on and adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 23, p. 394 - 401, 1957.

SKOU, J. C. William Withering – The man and his work. In: *Cardiac Glycosides 1785-1985. Biochemistry – Pharmacology – Clinical Relevance*, edited by E. Erdmann, K. Greeff, & J. C. Skou. Darmstadt, Germany: Steinkopff Verlag, , p. 1 - 10. 1986

SMART, T. G. Single calcium-activated potassium channels recorded from cultured rat sympathetic neurones. **J. Physiol.**, Lond., v. 389, p. 337 – 360, 1981.

SONGU-MIZE, E., BEALER, S. L., HAMID, A. I. Centrally administered ANF promotes appearance of a circulating sodium pump inhibitor. **Am. J. Physiol.**, v. 258 (Heart Circ. Physiol. 27), p. H1655 - H1659, 1990.

SPAT, A., P. ENYEDI, G. HAJNOOSKY, & L. HUNYEDY. Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells. **Exp. Physiol.** 76: 859-885 1991.

SPYER, K. M.: Neural organization and control of the baroreceptor reflex. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 88, p. 24-124, 1981.

STANDISH, A., ENQUIST, L. W., SCHWABER, J. S.: Enervation of the heart and its central medullary origin defined by viral tracing. **Science**, v. 263, p. 232 - 234, 1994.

STORM, J. F. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. **Nature**, v. 336, p. 379-381, 1988.

STRACK AM, SAWYER WB, HUGHES JH, et al.: A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudo rabies viral infections. **Brain. Res.**, 491:156-162, 1989.

STRACK, A. M., SAVYER, W. B., PLATT, K. B., et al.: CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudo rabies virus. **Brain Res.** v. 491, p. 274 - 291, 1989.

STRACK, A. M., SAWYER, W. B., MARUBIO, L. M., et al.: Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. **Brain Res.**, v. 455, p. 187 - 191, 1988.

SUNDARAM, K., SAPRU, H.: NMDA receptors in the interme-diolateral column of the spinal cord mediate sympathoexcitatory cardiac responses elicited from the ventrolateral medullary pressor area. **Brain. Res.**, v. 544, p. 33 - 41, 1991.

SVEADNER, K. J. Isoenzymes of the Na^+/K^- -ATPase, **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 988, p. 185 - 220, 1989.

SZENT-GYORGYI, A. **Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle**. New York: Academic, p. 135, 1953.

SZURSZEWSKI, J. H. Physiology of mammalian prevertebral ganglia. **Annual Review of Physiology**, v. 43, p. 53-68, 1981.

TAKEYASU, K., LEMAS, V., FAMBROUGH, D. M., Stability of Na^+/K^- ATPase α -subunit isoforms in evolution, **Am. J. Physiol.**, v. 259, C619 - C630, 1990.

TAMURA, M., LAM, T. T., INAGAMI, T. Isolation and characterization of a specific endogenous Na^+/K^- -ATPase inhibitor from bovine adrenals. **Biochemistry**, v. 27, p. 4244 - 4253, 1988.

THENEN, A. G., NESTOR, N. B., BALL, W. J., BLOSTEIN, R. Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation of the Na^+/K^- ATPase, **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 7104 - 7112, 1996.

THORP, R. H., COBBIN, L. B. **Cardiac Stimulant Substances**. New York: Academic, p. 223 - 272, 1967.

TRAUB, R. D. Simulation of intrinsic bursting in CA3 hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 7, p. 1233 - 1242, 1982.

TRAUB, R. D., LLINAS, R. The spatial distribution of ionic conductances in normal and axotomized motoneurons. **Neuroscience**, v. 2, p. 829 - 849, 1977.

VASSALE, M., LEE, C. O. The relationship among sodium activity, calcium, and strophanthidin inotropy in canine cardiac Purkinje fibers. **J. Gen. Physiol.**, v. 83, p. 287 - 307, 1984.

WALDROP, T. G., BAUER, R. M. Modulation of sympathetic discharge by a hypothalamic GABAergic mechanism. **Neuro-pharmacology**, v. 28, p. 263-269, 1989.

WALDTOP, T. G., BAUER, R. M., IWAMOTO, G. A. Microinjection of GABA antagonists into the posterior hypothalamus elicits locomotor activity and a cardiorespiratory activation. **Brain Res.**, v. 444, p. 84 – 94, 1988.

WALLIN, B. G., ELAM, M.: Insights from intraneural recordings of sympathetic nerve traffic in humans. **News Physiol. Sci.**, v. 9, p. 203 - 207, 1994.

WANG, H.S. & MCKINON, D. Potassium currents in rat prevertebral sympathetic neurones: control of firing properties. **Journal of Physiology**, 485: 319-335, 1995.

WARD, S. C., HAMILTON, B. P., HAMLIN, J. M. Novel receptor for Ouabain: Studies in Adrenocortical cells and Membranes. **Hypertension.**, (2part2) Feb, v. 39, p. 536 – 542, 2002.

WEEMS, W. A., SZURSZEWSKI, J. H. An intracellular analysis of some intrinsic factors controlling neural output from inferior V/ mesenteric ganglion of guinea pigs. **Journal of Neurophysiology**, v. 41, p. 305-321, 1978.

WITHERING, W. **An Account of the Fogleve and Some of its Medical Uses.** London: Robinson, 1785, p. 207.

WOOD, E. H., MOE, G. K. Electrolyte and water content of the ventricular musculature of the heart-lung preparation with special reference to the effects of cardiac glycosides. **Am. J. Physiol.**, v. 136, p. 515 - 522, 1942.

WRAY, S., EISNER, D. A., ALLEN, D. G. Two hundred years of the fogleve. **Med. Hist.**, v. 5, p. 132 - 150, 1985

YAMADA, W. M., KOCH, C. Y., ADAMS, P. R. Multiple channels and calcium dynamics. In: **Methods in Neuronal Modeling**, ed. KOCH, I G 8:SEaEv, I., pp. 97-133. Bradford, Cambridge, MA, USA. 1989.

YAMORI, Y., OKAMOTO, D. Hypothalamic tonic regulation of blood pressure in spontaneously hypenensive rats. **Jpn. Circ. J.**, v. 33, p. 509 – 519, 1969.

YAROWSKY, P., D. WEINREICH. Loss of accommodation in sympathetic neurons from spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, Dallas, v. 7, p. 268-276, 1985.

YOSHIMURA, M., POLOSA, C., NISHI, S.: Noradrenaline induces rhythmic bursting in sympathetic preganglionic neurons. **Brain. Res.**, v. 420, p. 147 - 151, 1487.

YU, S. P., O MALLEY, D. M., ADAMS, P. R. Regulation of M. current by intracellular calcium in bullfrog sympathetic ganglion neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 3487 - 3499, 1994.

YU, W. H. Survival of motor neurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. **Brain. Res.**, v. 491, 379 – 382, 1989.

YUAN, C., MANUTA, P., HAMLYN, J.M., CHEN, S., BHOEN, E., YEUN, J. Pamnani, M.B. Long-term ouabain administration produces hypertension in rats. **Hypertension**. 1993; 22: 178-187.