Aldair de França Neto

**Estudo dos mecanismos envolvidos no
remodelamento de artérias de resistência
de ratos hipertensos induzidos pelo
tratamento com ouabaína**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Fisiologia
Humana USP/ Instituto de
Ciências Biomédicas/ ICB, para
obtenção do Título de Doutor em
Fisiologia Humana.

Área de concentração: Fisiologia
Humana

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana
Venturini Rossoni

Versão original

São Paulo

2016

RESUMO

DE-FRANÇA-NETO, A. **Estudo dos mecanismos envolvidos no remodelamento de artérias de resistência de ratos hipertensos induzidos pelo tratamento com ouabaína.** 2016. 126 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A administração crônica de ouabaína (OUA) induz hipertensão arterial (HA) em ratos, alterações funcionais e remodelamento em artérias mesentéricas de resistência (AMR). A literatura sugere que a resposta pressórica da OUA pode ser bloqueada pelo antagonismo do receptor AT_1 e pela inibição COX-2. No entanto, não se conhece a participação dessas vias no remodelamento arterial nesse modelo de HA. O presente estudo teve como objetivo investigar o papel do sistema renina-angiotensina (SRA) e da COX no remodelamento das AMR induzido pela OUA. Ratos Wistar (45 dias) foram tratados por 5 semanas com OUA (30 μ g/kg/dia; s.c.) e co-tratados com losartana potássica (15 mg/kg/dia; v.o.), ácido acetilsalicílico (100 mg/kg/dia; v.o.), nimesulida (20 mg/kg/dia, v.o.) ou cloridrato de hidralazina (44 mg/kg/dia) e hidroclorotiazida (9,4 mg/kg/dia; v.o.; grupo HH). O grupo OUA apresentou elevação dos valores de pressão arterial e, ambos os co-tratamentos preveniram a resposta pressórica da OUA. As AMR dos ratos OUA apresentaram redução do diâmetro interno (Di), da área de secção transversa e do número de núcleos e aumento na rigidez, na quantidade de colágeno total e espécies reativas de oxigênio, as quais foram bloqueadas por todos co-ttos, exceto pela HH. Em AMR de ratos OUA, o SRA e a COX-2 participam da resposta pressórica, do remodelamento hipotrófico para dentro e da rigidez. Esses ajustes estão associados ao stress oxidativo e a deposição de colágeno na parede vascular estimulados pela capacidade da OUA em promover a ativação do receptor AT_1 e da COX-2.

Palavras-chave: Remodelamento vascular. Ouabaína. Hipertensão arterial.

ABSTRACT

DE-FRANÇA-NETO, A. **Study of the mechanisms involved on resistance artery remodeling in ouabain-induced hypertensive rats.** 2016. 126 p. Ph. D. Thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The chronic administration of ouabain (OUA) induces hypertension in rats, functional and structural alterations in mesenteric resistance arteries (MRA). It is well known that OUA-induced hypertension is blocked by AT₁ receptor antagonism and the COX-2 inhibition. However, the participation of these pathways in MRA remodeling in this model of hypertension remains unknown. This study aimed to investigate the role of the renin angiotensin system (RAS) and COX pathways on MRA remodeling induced by OUA. Male Wistar rats (45 days) were treated for 5 weeks with OUA (30 µg/kg/day, s.c.) and co-treated with losartan potassium (15 mg/kg/day, p.o.), aspirin (100 mg/kg/day; p.o.), nimesulide (20 mg/kg /day, p.o.) or hydralazine hydrochloride (44 mg/kg/day) plus hydrochlorothiazide (9.4 mg/kg/day; p.o.; HH group). The OUA group showed high blood pressure and both co-treatments prevented the pressor response of OUA. MRA of OUA rats showed reduced inner diameter and cross sectional area and increased arterial stiffness, the amount of total collagen and reactive oxygen species in the vascular wall, which were blocked by all co-treatments except for HH. In AMR from OUA rats, RAS and COX-2 participate in the pressor response, the inward hypotrophic remodeling and stiffness. These adjustments are the result of oxidative stress and increasing collagen deposition in the vascular wall stimulated by the OUA ability to stimulate the activation of AT₁ receptor and COX-2.

Keywords: Vascular remodeling. Ouabain. Arterial hypertension.

1 INTRODUÇÃO

Segundo os registros do Ministério da Saúde (2013), as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 339.672 óbitos no ano de 2013, sendo a maior causa de mortalidade ($\approx 28\%$) no Brasil. Entre elas, uma doença que vem se destacando devido a sua maior prevalência ao longo dos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013) é a hipertensão arterial (HA). Essa condição clínica caracteriza-se por ter origem multifatorial, apresentar níveis elevados e sustentados de pressão arterial e estar associada à alterações metabólicas, funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) (DOCUMENTO DO BANCO MUNDIAL, 2005; MALTA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; WILLIAMS, 2010).

Quanto à sua origem, a HA pode ser classificada como HA primária ou secundária. A HA primária é a forma de maior prevalência na população (90%). Essa forma da HA não possui causas definidas, mas está associada a muitos fatores de risco, como fatores hereditários, uma dieta pouco saudável, sedentarismo, stress ou abuso de bebidas alcoólicas. Por sua vez, a HA secundária tem prevalência de 3 a 5% e está associada à alguma condição clínica, como hiperaldosteronismo primário, feocromocitoma e paragangliomas, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, síndrome de Cushing, acromegalia, coartação da aorta, isquemia renal (hipertensão renovascular), síndrome da apnéia e hipopnéia obstrutiva do sono, doença renal crônica e o uso de drogas relacionadas com o desenvolvimento ou agravamento da HA (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Essa doença é um dos fatores de risco mais importantes para outras doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca e o acidente vascular encefálico, dentre outras (KAPLAN, 1998). Apesar dos avanços no seu diagnóstico e tratamento, suas causas permanecem desconhecidas na maioria dos casos.

Como dito anteriormente, a principal característica dessa condição clínica é a elevação sustentada dos valores de pressão arterial. Essa variável obedece a relação conteúdo/contênte, ou seja, a pressão arterial depende do volume sanguíneo contido no leito arterial (MICHELINI, 2008; SHEPHERD; VANHOUTTEN, 1979). Além disso, ela também é dependente de outros fatores, como o débito

cardíaco, que representa o produto da frequência cardíaca pelo volume sistólico, e a resistência periférica, que representa a resistência imposta ao fluxo sanguíneo pelas artérias nos leitos vasculares (BLOOM; FAWCETT, 1968; MICHELINI, 2008; MULVANY, 1984; SHEPHERD; VANHOUTTEN, 1979). Tanto na HA em humanos quanto em modelos animais pode-se observar uma relação direta entre a pressão arterial e a resistência vascular periférica. Nessa relação, o aumento da pressão arterial está comumente associado ao concomitante aumento da resistência vascular (FOLKOW, 1982; SHEPHERD, 1990).

A modificação da resistência vascular, que acompanha o aumento da pressão arterial, está relacionada com alterações nos componentes da parede vascular (FOLKOW, 1982; MULVANY, 1984; MULVANY; HALPERN, 1977; MULVANY; HANSEN; AALKAJAER, 1978; SCHIFFRIN, 1997; SHEPHERD, 1990), principalmente nas chamadas artérias de resistência (MULVANY, 1984, 2003, 2008). Essas modificações levam à alterações na estrutura e nas respostas funcionais dos componentes da parede arterial, como as células endoteliais, as células musculares lisas e a matriz extracelular, que podem resultar na elevação da pressão arterial observada na HA (FOLKOW, 1982; MULVANY, 1984; MULVANY; HALPERN, 1977; MULVANY; HANSEN; AALKAJAER, 1978; SCHIFFRIN, 1997; SHEPHERD, 1990).

Nesse contexto um importante modelo de estudo de HA experimental é o induzido pelo tratamento crônico com ouabaína (OUA) (MANUNTA et al., 1994). Esse composto orgânico é um digitálico cardiotônico utilizado para inibir a Na^+ , K^+ ATPase (LINGREL et al., 1998; WALLICK et al., 1977). Hoje sabe-se que esse digitálico cardiotônico está presente em concentrações diminutas no plasma de humanos (HAMLYN et al., 1991). Apesar de não se observar seu efeito inibidor sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase nestas concentrações, a OUA tem ganhado destaque por estar relacionada à HA essencial em humanos (HAMYLIN et al., 1982; PIERDOMENICO et al., 2001; ROSSI et al., 1995). Quando a OUA é utilizada cronicamente em ratos normotensos (como os ratos Wistar), com dosagens que atingem valores plasmáticos semelhantes aos encontrados em pacientes com HA essencial, ela induz a elevação da pressão arterial desses animais a valores semelhantes aos de uma HA leve a moderada em humanos (MANUNTA et al., 1994).

Nesse modelo experimental de HA, inúmeras modificações vasculares periféricas, tanto funcionais (BRIONES et al., 2009; CARGNELLI et al., 2000;

HERNANZ et al., 2008; ROSSONI et al., 2002a b; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a, b, c) como estruturais (BRIONES et al., 2006; ZHANG et al., 2009), já foram encontradas no sistema vascular e corroboram para o entendimento do mecanismo hipertensivo induzido pela OUA. Em relação às modificações funcionais, a ativação de vias como a do sistema renina-angiotensina e da enzima cicloxigenase-2 vem demonstrando grande importância como parte do mecanismo ativado pela OUA, responsável por alterar a pressão arterial e a reatividade vascular das artérias mesentéricas de resistência (AMR), e também de outras artérias e leitos vasculares (OLIVEIRA, 2013; PADILHA et al., 2008; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a, c, 2009), sugerindo que essas mesmas vias possam também estar envolvidas nas modificações estruturais encontradas nas AMR.

1.1 Sistema cardiovascular e o sistema circulatório

O sistema cardiovascular é constituído por uma bomba geradora de fluxo (o coração), uma série de vasos de distribuição e de coleta, e um extenso sistema de finos vasos que permitem trocas rápidas entre os tecidos e os vasos sanguíneos (LACCHINI; IRIGOYEN, 2008).

Uma parte essencial dentro do sistema cardiovascular é o sistema circulatório. Esse, se constitui de uma rede de tubos fechados, compostos de segmentos diferenciados (artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias) e com características estruturais e funcionais distintas (FRANCHINI, 2012). A principal função desse sistema é distribuir substâncias essenciais para os tecidos, assim como remover os produtos provenientes do metabolismo (LACCHINI; IRIGOYEN, 2008).

No sistema circulatório, os vasos sanguíneos apresentam suas paredes divididas basicamente em três camadas: túnica adventícia, túnica média e túnica interna (LACCHINI; IRIGOYEN, 2008). Nessas camadas, as composições são modificadas de acordo com a função do vaso. A túnica adventícia é composta por tecido conjuntivo frouxo, com grande quantidade de fibrócitos, fibras elásticas e colágeno (LACCHINI; IRIGOYEN, 2008; RHODIN, 1980). Nessa camada também podem ser encontrados mastócitos, macrófagos e, ocasionalmente, células de Schwann associadas a axônios (RHODIN, 1980). Por sua vez, a camada média vascular é composta principalmente por células musculares lisas e pelas lâminas

elásticas presentes entre essas células. Nessa camada, a proporção de células musculares lisas é maior em pequenas artérias (artérias de resistência) do que em grandes artérias (artérias de capacitância), representando 70 a 85% da camada em artérias de resistência (LEE et al, 1983; MULVANY et al. 1978; SMEDA et al., 1988; WALMSLEY, 1983). Mais internamente, a camada íntima é composta por uma única camada de células endoteliais e outra subendotelial, formada por matriz extracelular, fibrócitos e macrófagos. Em artérias de resistência, as células endoteliais frequentemente projetam-se através das fenestras na lâmina elástica interna e podem fazer contato com as células do músculo liso vascular na camada média, afetando o tônus vascular (CARLSON et al., 1982; LACCHINI; IRIGOYEN, 2008; RHODIN, 1980).

1.2 Artérias de resistência e o remodelamento arterial

Dentro do sistema circulatório, um grupo particular de artérias tem grande importância na determinação da resistência vascular: é a chamada artéria de resistência. Autores como Mulvany e Korsgaard (1983) e Schiffrin (1997) vêm demonstrando que esta artéria é a responsável por impor a maior parte da resistência ao fluxo sanguíneo no leito vascular onde se encontra.

Na literatura, as artérias de resistência têm sido definidas como resistentes por meio de classificações que levam em conta seu papel funcional no leito vascular ou as características estruturais da própria artéria, como o diâmetro luminal. Quanto à definição funcional, de acordo com Mulvany (2003), artérias de resistência são vasos pré-arteriolares que contribuem tanto passivamente como ativamente para a manutenção da resistência vascular basal e para o controle do fluxo sanguíneo durante as alterações hemodinâmicas. Por sua vez, a definição estrutural adotada por Bloom e Fawcett (1968) define que essas artérias são vasos pré-arteriolares com diâmetro luminal menor que 500 μm .

Levando-se em consideração que, de acordo com a Lei de *Poiseuille*, a resistência vascular periférica varia inversamente em relação a quarta potência do raio arterial, discretas variações do diâmetro luminal das artérias de resistência podem influenciar marcadamente a resistência vascular e, conseqüentemente, levar à uma modulação significativa da pressão arterial. Dessa maneira, as mudanças na geometria do vaso contribuem para a modificação dos valores normais da pressão

arterial por meio da modificação da resistência vascular. Essas modificações geométricas, chamadas de remodelamento vascular, podem ocorrer devido à alterações na função (reatividade vascular), na distensibilidade (rigidez vascular) ou na estrutura vascular (ARRIBAS et al, 2006; INTEGAN; SCHIFFRIN, 2000; MARTINEZ-LEMUS et al, 2009; MULVANY, 2008).

Segundo Mulvany (1999), essas modificações geométricas (remodelamento) das artérias de resistência, observadas em condições clínicas como na HA, não ocorrem como consequência do aumento na pressão sanguínea, mas sim para normalizar a tensão da parede na artéria. Essa afirmação tem sua explicação na *Lei de Laplace*, pois, em seu trabalho de 1984, Mulvany utilizou essa lei para demonstrar que o aumento da pressão arterial observado na HA é mantido pelo aumento na razão parede/lúmen (razão P/L) arterial. Sendo assim, em um primeiro momento, o aumento na quantidade de substâncias neuro-humorais pode elevar a pressão sanguínea, alterando a tensão da parede na artéria. No entanto, para normalizar a tensão de parede em longo prazo, a pressão arterial elevada é mantida pelo aumento da razão P/L dos vasos (MULVANY, 1999).

Por sua vez, Mulvany (1999) relatou que as características estruturais primárias dos vasos responsáveis pela razão P/L são o diâmetro e a espessura da parede vascular, estando o vaso submetido a uma determinada pressão transmural. O autor explica que, nessa condição, o diâmetro do lúmen é determinado pelas propriedades mecânicas passivas e ativas do vaso. Enquanto as propriedades passivas podem ser descritas pela relação entre a pressão intraluminal e a medida do lúmen sobre condições em que as células do músculo liso estão totalmente relaxadas, as propriedades ativas são função do tônus (contração) vascular, da quantidade e do arranjo das células musculares lisas (MULVANY, 1999).

Outro importante parâmetro da estrutura vascular citado por Mulvany (1999), derivado dos já citados, é a área de secção transversa (AST), que indica a quantidade de componentes dentro da parede vascular e, portanto, fornece informações a respeito dos processos biológicos que determinam a estrutura vascular.

Como demonstrado na figura 1 (MULVANY, 1999), as alterações na estrutura vascular, conhecidas como remodelamento arterial, são consideradas um processo complexo que pode envolver o aumento (hipertrofia), a diminuição (hipotrofia) ou o rearranjo (eutrofia) dos componentes da parede vascular e, também,

a redução (remodelamento para dentro) ou o aumento (remodelamento para fora) do diâmetro do lúmen vascular (MULVANY et al., 1996).

Figura 1 - Classificação de artérias quanto ao tipo de remodelamento arterial

A figura mostra as maneiras como o remodelamento arterial pode modificar a área de secção transversa (AST) do vaso sanguíneo. O ponto de partida é o vaso no centro. O remodelamento pode ser hipertrófico (com aumento da AST, como demonstrado na coluna da direita), eutrófico (sem mudanças na AST, como demonstrado nos vasos na coluna central) ou hipotrófico (com redução da AST, como demonstrado nos vasos da coluna à esquerda). Essas formas de remodelamento podem ser para dentro (inward; com redução no diâmetro luminal, como demonstrado na linha superior) ou para fora (outward; com aumento no diâmetro luminal, como demonstrado nos vasos da linha inferior). O eixo diagonal superior esquerdo ao inferior direito demonstra que a razão parede/luz não é modificada pela alteração no diâmetro e espessura da parede arterial. A parte superior, da esquerda para a direita, demonstra o aumento da razão parede/luz com as modificações estruturais. A parte inferior, da direita para a esquerda, demonstra a redução na razão parede/luz com as modificações estruturais. Modificado de Mulvany (MULVANY, 1999).

Como pode ser observado na figura 1, o remodelamento hipotrófico ocorre quando há redução na AST da parede vascular, representada pela mudança observada na figura 1 entre a artéria central e as artérias na coluna à esquerda. Como será descrito mais adiante, esse tipo de remodelamento arterial parece estar relacionado à redução de componentes da parede vascular (MÁRQUEZ-MARTIN et al., 2012; POURAGEAUD; DE MEY, 1997).

Já no remodelamento eutrófico, a AST da parede arterial não é modificada, como observado na coluna central da figura 1. Esse tipo de remodelamento parece predominar em artérias de resistência de modelos experimentais, nos quais o sistema

renina-angiotensina está mais ativado, como no modelo de: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (MULVANY; HALPERN, 1977; MULVANY; HANSEN, 1978; MULVANY; KORSGAARD, 1983) e dois rins, um clipe (LI et al., 1996). Por sua vez, no remodelamento hipertrófico ocorre o aumento da AST da parede arterial, como o observado na figura 1 entre a artéria central e as artérias da coluna à direita. Esse remodelamento parece predominar em modelos animais com HA severa, nos quais o sistema endotelina está mais ativado, como: no modelo DOCA-sal (DENG e SCHIFFRIN, 1992), um rim, um clipe (DENG; SCHIFFRIN, 1991; KORSGAARD; MULVANY, 1988) e no modelo Dahl-sal sensível (D'USCIO et al., 1997).

Dentro desse contexto, processos como o crescimento celular, a apoptose, a inflamação e a fibrose são eventos completamente envolvidos no remodelamento vascular hipertensivo do tipo eutrófico e hipertrófico, no qual sistemas regulatórios, como o sistema renina-angiotensina e a endotelina, exercem um importante papel (GIBBONS, 1998; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001).

Por outro lado, pouco ainda é conhecido a respeito do remodelamento vascular do tipo hipotrófico associado a HA. Para ele, relatos da literatura demonstraram que esse remodelamento arterial já foi observado em arteríolas aferentes renais de ratos SHR (NØRRELUND et al., 1994). Esse remodelamento hipotrófico para dentro da arteríola aferente renal do rato SHR estava associado ao aumento da pressão sanguínea arterial dos mesmos, fato curioso demonstrado por NØRRELUND et al. (1994), uma vez que nessa mesma variedade de rato, o remodelamento característico encontrado em AMR é do tipo eutrófico para dentro (AGABITI-ROSEI; HEAGERTY; RIZZONI, 2009; FEIH et al., 2008; MARTINEZ-LEMUS; HILL; MEININGER, 2009;). Dessa maneira essas modificações estruturais parecem ser diferentemente expressas dependendo do leito vascular observado.

Estudos com abordagens relacionadas à redução na perfusão vascular demonstraram o remodelamento hipotrófico em AMR (POURAGEAUD; DE MEY, 1997) e na artéria cerebral média (MÁRQUEZ-MARTIN et al., 2012). Neles, verificou-se que ratos normotensos submetidos à hipoperfusão crônica cerebral apresentam remodelamento hipotrófico para dentro na artéria cerebral média (MÁRQUEZ-MARTIN et al., 2012), o qual foi associado a uma maior expressão das metaloproteinases do tipo 1 e 9, responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular. Esses trabalhos sugerem que o remodelamento hipotrófico para

dentro está relacionado a um desbalanço na parede vascular, que resulta na perda de componentes dessa parede.

Além da modificação da geometria arterial, na HA o remodelamento vascular também está associado ao aumento da rigidez da parede vascular (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). Esse tipo de modificação é resultante da somatória da rigidez ativa (representada pelo tônus do músculo liso vascular) (AGABITI-ROSEI; HEAGERTY; RIZZONI, 2009) com a rigidez passiva, sendo essa última, um efeito das propriedades visco-elásticas intrínsecas principalmente das fibras de colágeno e de elastina presentes na matriz extracelular (BRIONES et al., 2010).

Nas artérias, os colágenos do tipo I e III são os principais componentes responsáveis por gerar rigidez na parede vascular (JACOB et al., 2001; WAGENSEIL; MECHAM, 2009). Estes, são proteínas rígidas que possuem o papel fisiológico de limitar a distensão vascular e, quando depositadas em excesso na parede vascular, elevam a rigidez vascular, como ocorre em condições patológicas como a HA (BRIONES et al., 2009; GÓMEZ-GARRE et al., 2006; INTENGAN et al., 1999b; RIZZONI et al., 2006; VIRDIS et al., 2004). Além do colágeno, a quantidade de fibras elásticas como a elastina, também contribui para a rigidez arterial. Essa proteína é o componente deformável da matriz extracelular e, por consequência, da parede vascular (BRIONES et al., 2010). Em condições normais, a produção de elastina é restrita à vida fetal e à infância (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006). No entanto, em condições patológicas, como na HA, as células vasculares podem sintetizar elastina como parte do processo para aumentar o stress na parede vascular (KEELEY; ALATAWI, 1991; KEELEY; JOHNSON, 1986;).

No vaso normal, a síntese e a degradação das proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina e outras proteínas como integrinas e fibronectinas) é finamente controlada por proteínas chamadas de metaloproteinases. Essas enzimas têm suas atividades reguladas por fatores que podem promover o remodelamento vascular devido a uma maior degradação da matriz extracelular e permitir a migração e proliferação de células musculares lisas e de células inflamatórias para a parede vascular (BOBIK; TKACHUK, 2003; RAFFETTO; KHALIL, 2008).

Dentro desse contexto, uma substância endógena associada à HA em humanos (HAMYLIN et al., 1982; PIERDOMENICO et al., 2001; ROSSI et al., 1995),

que vem ganhando destaque é a OUA. Estudos demonstram que a OUA é capaz de modificar a resistência vascular por agir tanto na reatividade vascular (BRIONES et al., 2009; CARGNELLI et al., 2000; HERNANZ et al., 2008; ROSSONI et al., 2002a b; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a, b, c;) como na geometria e rigidez arterial (BRIONES et al., 2006; ZHANG et al., 2009) além de estar envolvida com novos mecanismos intracelulares ativados via a Na^+ , K^+ ATPase (ABRAMOWITZ et al., 2003; AIZMAN; APERIA, 2003; AYDEMIR-KOKSOY; BRODIE et al., 1995; DMITRIEVA; DORIS, 2003; DVELA et al., 2012; KHUNDMIRI *et al.*, 2007; KOMETIANI et al., 1998; KOTOVA et al., 2006; KULIKOV et al., 2007; LIU et al., 2000; MONTERO et al., 1993; MURATA et al., 1996; TREVISI et al., 2006; XIE; CAI, 2003; XU et al., 2009). Essa substância endógena vem sendo muito estudada quanto aos mecanismos que descrevem sua habilidade de alterar a reatividade vascular em ratos Wistar, Sprague-Dawley e SHR (BRIONES et al., 2009; CARGNELLI et al., 2000; HERNANZ et al., 2008; OLIVEIRA, 2013; PADILHA et al., 2008; ROSSONI et al., 2002a b; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a, b, c ; XAVIER et al., 2009;). No entanto, pouco ainda é conhecido a respeito da capacidade da OUA em induzir o remodelamento hipotrófico para dentro como descrito por Briones et al. (2006) no modelo de HA induzido por ela própria em ratos Wistar.

1.3 A Na^+ , K^+ ATPase e a ouabaína

Trabalhos da literatura demonstraram que aproximadamente 50% dos pacientes com HA essencial apresentavam valores elevados de OUA plasmática (PIERDOMENICO et al., 2001; ROSSI et al., 1995) e que há uma relação entre a elevação da pressão arterial e a quantidade de OUA plasmática em indivíduos hipertensos (HAMLYN et al., 1982). Além disso modelos animais de HA, como a hipertensão renal (OVERBECK et al., 1976) e o modelo DOCA-sal (HAMLYN, 1989; HAMLYN; HAMILTON; MANUNTA, 1996), também apresentam como características as concentrações plasmáticas elevadas de ouabaína endógena.

A OUA (Figura 2) é uma substância que pertence a um grupo de compostos conhecidos como esteróides cardiotônicos, os quais são formados por um esqueleto esteroidal (aglicona), um anel lactona insaturado formado por cinco membros e uma porção açúcar (BARRUETO et al., 2006).

Figura 2 - Fórmulas estrutural e molecular da ouabaína.

Fórmula estrutural acompanhada da fórmula molecular da ouabaína. Como pode ser observado, a molécula de ouabaína é formada por um esqueleto esteroidal (aglicona), um anel lactona insaturado formado por cinco átomos e uma porção monossacarídica (pentose). Imagem obtida no endereço: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Ouaba%C3%ADna&lang=3 Acessado em: 26/10/2015.

Devido a sua propriedade de inibir a atividade enzimática e o transporte iônico realizado pela Na⁺, K⁺ ATPase (LINGREL et al., 1998; WALLICK et al., 1977), a OUA tem sido utilizada para inibir o transporte iônico realizado por essa enzima (APELL; SCHNEEBERGER; SOKOLOV, 1998). Esse composto apresenta efeito inotrópico positivo o qual foi aplicado para o tratamento da insuficiência cardíaca, o que lhe confere a designação geral de “cardiotônico” (EICHHORN; GHEORGHIADÉ, 2002; HAUPTMAN; KELLY, 1999; KATZ, 1985; LEE, 1985). Além disso, se usada agudamente em humanos saudáveis, a infusão desse digitálico é capaz de induzir o aumento da resistência vascular periférica, a redução do fluxo sanguíneo e a elevação da pressão arterial (MASON; BRAUNWALD, 1964; SCHULTE et al., 1987). Dessa forma, como apontado acima, o aumento plasmático desse digitálico é capaz de levar a um quadro que favorece o estado hipertensivo.

Por sua vez, o principal sítio de ação da OUA é a Na⁺, K⁺ ATPase, enzima expressa em todas as células de mamíferos e que, em sua via clássica, utiliza a energia da hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) para realizar o transporte de 3 íons Na⁺ e 2 íons K⁺ através da membrana (Figura 3A) (BOLDYREV, 2000; KAPLAN, 2002; SKOU, 2004). Inicialmente, pensava-se que a Na⁺, K⁺ ATPase era composta de um heterodímero de dois polipeptídeos principais, a subunidade α e a subunidade β

(Figura 3). No entanto, atualmente, alguns autores descrevem uma nova subunidade, a denominada subunidade γ , associada de uma maneira tecido-específica ao dímero da Na^+ , K^+ ATPase. Essa associação parece atuar na funcionalidade da enzima (BLANCO; MERCER, 1998; SWEADNER, 1989). Por sua vez, o polipeptídeo α representa a subunidade catalítica da enzima, contendo os sítios de ligação para o ATP, para o Na^+ , para o K^+ e para outros reguladores da Na^+ , K^+ ATPase, como os esteróides cardiotônicos (MORTH et al., 2007). Esse domínio é formado por 10 segmentos transmembrana, com as regiões C e N terminais citoplasmáticas e cinco pequenas alças extracelulares (BAGROV; SHAPIRO; FEDORA, 2009; MORTH et al., 2011;).

Enquanto a hidrólise do ATP e a translocação iônica ocorrem primariamente através da subunidade α , a Na^+ , K^+ ATPase também necessita da subunidade β para sua atividade. O polipeptídeo que constitui essa subunidade é uma proteína glicosilada do tipo II que apresenta uma calda citoplasmática N terminal, um único domínio transmembrana e a maior parte de sua estrutura voltada para o meio extracelular (GEERING, 2001; GEERING, 2008;). Essa subunidade atua como uma proteína chaperona que dirige o enovelamento correto e o direcionamento do polipeptídeo α durante sua síntese e transporte, garantindo o desenvolvimento funcional e a integração da Na^+ , K^+ ATPase na membrana plasmática (GEERING, 2001; JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003; KAPLAN, 2002).

Em mamíferos, quatro tipos de subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) e três tipos de subunidades β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) são expressas em diferentes combinações e também em tipos específicos de células, sendo reguladas pelo desenvolvimento (BLANCO, 2005; LINGREL et al., 2003; MOBASHERI et al., 2000; SWEADNER, 1991). Adicionalmente, uma das maiores diferenças cinéticas entre as isoformas α é sua sensibilidade única à OUA. Em roedores, enquanto a isoforma $\alpha 1$ é altamente resistente à inibição da OUA, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$ são progressivamente mais sensíveis a essa mesma inibição (BLANCO, 2005; O'BRIEN, 1994; SWEADNER, 1993). Dessa forma, as associações distintas das diferentes isoformas α e β resultam em múltiplos dímeros $\alpha\beta$ (isozimas) da Na^+ , K^+ -ATPase.

Entre suas funções, a Na^+ , K^+ ATPase é responsável por estabelecer um gradiente eletroquímico transmembrana para os íons Na^+ e K^+ , o qual é essencial para a manutenção da osmolaridade celular, volume, pH, potencial de membrana de

repouso e energia eletroquímica para o transporte secundário de íons e nutrientes através da membrana celular (BLAUSTEIN, 1993; BENARROCH, 2011; CLARKE; FAN, 2011; FERAILLE; DOUCET, 2001; GREEN, 2004; MCDONOUGH et al., 2002; SZNAJDER; FACTOR; INGBAR, 2002; ZHOU; DADA; SZNAJDER, 2008). Além disso, esse gradiente eletroquímico transmembrana também é importante em processos como a contração muscular e a propagação do potencial de ação (LINGEL, 1992).

Figura 3 - Via clássica e via de sinalização intracelular iniciadas pela ligação da ouabaína com a Na^+ , K^+ ATPase.

Diagrama mostrando a função celular de controle da Na^+ , K^+ ATPase pela OUA via suas funções de transporte iônico e sinalização. A) inibindo o bombeamento iônico realizado pela Na^+ , K^+ ATPase, a OUA pode diretamente modificar os níveis intracelulares de Na^+ e, secundariamente, o Ca^{2+} citosólico por meio do trocador Na^+ / Ca^{2+} . Esse representa o mais bem descrito mecanismo de ação dos esteroides cardiotônicos que leva ao aumento na contração do músculo cardíaco e liso. B) agindo através de uma subpopulação de Na^+ , K^+ ATPase na cavéola, a OUA ativa a via de sinalização da Na^+ , K^+ ATPase, a qual envolve uma série de intermediários intracelulares que, em última instância, modulam a expressão gênica e causam uma variedade de efeitos específicos do tipo celular, entre eles a proliferação celular, a apoptose, mudanças no metabolismo celular e a regulação da interação célula-célula. Na figura: O, ouabaína; α e β , subunidades da Na^+ , K^+ -ATPase. Figura retirada de Blanco e Wallace (2013).

Mais recentemente, trabalhos da literatura têm demonstrado que a Na^+ , K^+ ATPase participa de vias de sinalização intracelular que são independentes do transporte iônico de Na^+ e K^+ , atuando como uma molécula receptora (Figura 3B) que reúne um complexo de sinalização multiproteico denominado Na^+ , K^+ ATPase signalossoma (XIE; CAI, 2003). Uma interessante característica envolvendo esse papel de signalossoma da Na^+ , K^+ ATPase é que ele só ocorre em subpopulações de Na^+ , K^+ ATPase associadas a regiões de cavéolas (LIANG et al., 2007; LIU et al., 2003). Assim, atualmente, sugere-se a ocorrência de dois pools de Na^+ , K^+ ATPases na superfície celular, uma envolvida na sinalização como signalossoma e outra envolvida no bombeamento iônico.

Esse novo papel da Na^+ , K^+ ATPase como signalossoma foi estudado por Kometiani et al. (1998) e Liu et al. (2000) em células miocárdicas e do epitélio renal. Esses trabalhos demonstraram que a OUA foi capaz de induzir a interação da Na^+ , K^+ ATPase com proteínas de sinalização intracelular, levando à ativação da Src (uma tirosina quinase) e à fosforilação de outras proteínas efetoras. Adicionalmente, foi descrito que o papel da Na^+ , K^+ ATPase como transdutora dos efeitos da OUA também ocorrer em células do músculo liso vascular (ABRAMOWITZ et al., 2003; AYDEMIR-KOKSOY et al., 2001) e em outros tipos celulares (AIZMAN; APERIA, 2003; BRODIE et al., 1995; DMITRIEVA; DORIS, 2003; DVELA et al., 2012; KHUNDMIRI et al., 2007; KOTOVA et al., 2006; KULIKOV et al., 2007; MONTERO et al., 1993; MURATA et al., 1996; TREVISI et al., 2006; XU et al., 2009).

Como observado na Figura 3A, a inibição da Na^+ , K^+ ATPase induzida pela OUA produz diretamente a elevação na concentração intracelular do íon Na^+ . Secundariamente, ocorre a elevação intracelular do íon Ca^{2+} devido à redução do influxo de Na^+ através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na membrana celular. Essa elevação no Ca^{2+} intracelular permite um maior armazenamento desse íon no retículo sarcoplasmático, o qual é realizado pela Ca^{2+} -ATPase ali presente. Consequentemente, esse processo resulta em aumento da força de contração devido à maior liberação de Ca^{2+} para o meio intracelular (Figura 3A; BLAUSTEIN; JUHASZOVA; GOLOVINA, 1998; BLAUSTEIN; LEDERER, 1999).

1.4 A ouabaína endógena

A OUA foi identificada pela primeira vez como uma substância circulante no plasma humano por Hamlyn et al. (1991), sendo, desde então, observada de maneira endógena no plasma de outras espécies em concentrações que variam de valores picomolares a nanomolares. Adicionalmente, uma série de trabalhos tem sugerido que a OUA endógena é um importante fator natriurético (FEDOROVA; LAKATTA; BAGROV, 2000; LIU; XIE, 2010; LOREAUX et al., 2008; NESHER et al., 2009; YAMADA et al., 1997; YAN et al., 2012;). Esses trabalhos demonstraram que o aumento da OUA está relacionado com a excreção renal de Na^+ (NESHER et al., 2009; YAMADA et al., 1997), sendo essa substância, provavelmente, um mecanismo regulatório para manter a homeostase de Na^+ (FEDOROVA; LAKATTA; BAGROV, 2000).

Hoje sabe-se que a OUA é produzida no hipotálamo, na região antero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) e na zona glomerulosa e fasciculada do córtex da glândula adrenal, sendo a produção da região glomerulosa 5,5 vezes maior que a produção da região fasciculada (LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1995; MASUGI et al., 1988). Sua síntese ocorre em resposta a estímulos como: o aumento de volume, a angiotensina II e/ou por estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (BAGROV; SHAPIRO, 2008; BLAUSTEIN et al., 2009; GÓMEZ-SANCHEZ et al., 1994; LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1994, 1995; MATHWES et al., 1991; SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2007). Além disso, a produção biossintética dessa molécula requer hidroxicolesterol, pregnanolona e progesterona como precursores e segue reações metabólicas que são, em parte, divididas com aquelas de outros hormônios esteroides da adrenal (HAMLYN et al., 1998; SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2007).

Esse digitalico tem sido particularmente relacionado com o controle de funções envolvendo o sistema cardiovascular, renal e nervoso (BAGROV; SHAPIRO, 2008; BLAUSTEIN et al., 2009; SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2007), assim como, com a gênese e/ou manutenção de muitas condições, como insuficiência renal crônica (STELLA et al., 2008), uremia experimental (HARWOOD et al., 2001), exercício físico (ANTOLOVIC et al., 2000), hipóxia (RIGANTI et al., 2011), hiperaldosteronismo (ROSSI et al., 1995), insuficiência cardíaca congestiva (MANUNTA et al., 2009; MANUNTA et al., 2010) e HA (HAMLYN et al., 1982; HAUCK; FRISHMAN, 2012; OVERBECK et al., 1976; SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2007).

Como descrito acima, além da capacidade de inibir a Na^+ , K^+ ATPase, trabalhos recentes têm demonstrado novos mecanismos pelos quais a ação da OUA sobre a Na^+ , K^+ ATPase é capaz de iniciar uma complexa cascata de sinalização (LINGEL, 2010; XIE et al., 1999; XIE; CAI, 2003). Entre esses mecanismos, em concentrações menores que as necessárias para inibir a atividade Na^+ , K^+ ATPase, a OUA é capaz de agir como um agonista da Na^+ , K^+ ATPase e ativar a via de sinalização tirosino-quinase da cSRC no citoplasma celular (XIE et al., 1999; XIE; CAI, 2003). O evento central na sinalização da OUA via Na^+ , K^+ ATPase é a fosforilação de tirosinas em uma série de proteínas (Figura 3B). A Na^+ , K^+ ATPase não possui uma atividade tirosina quinase ou fosfatase inerentes à sua estrutura, dependendo do recrutamento e ativação da enzima Src. Dessa maneira, a Na^+ , K^+ ATPase assume o papel de receptor para a ligação com a OUA e a Src, de elemento de transdução envolvido na fosforilação proteica e amplificação de sinal (PIERRE; XIE, 2006). Em condições basais, a associação Na^+ , K^+ ATPase-Src permanece em estado inativo; entretanto, a ligação da OUA desfaz a interação da Na^+ , K^+ ATPase-Src, ativando a Src (YE et al., 2011).

Além disso, outros eventos nessa sinalização sinalossoma realizada pela Na^+ , K^+ ATPase são a capacidade de transativação com o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) e a montagem dependente da Src das proteínas Shc e Grb2 (HAAS et al., 2002). Essas vias, por sua vez, são capazes de estimular a Ras e a ativação ERK, uma MAPK importante em processo de proliferação celular (KOMETIANI et al., 1998). Desse modo, esse mecanismo estimulado pela OUA, via a função sinalossoma da Na^+ , K^+ ATPase, é responsável por ativar vias de crescimento e proliferação celular, pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), inflamação e apoptose (Figura 3B).

Com base nessas novas descobertas, a OUA passou a ser considerada, além de um digitálico capaz de inibir a atividade da Na^+ , K^+ ATPase, uma molécula agonista capaz de ligar-se à Na^+ , K^+ ATPase e sinalizar processos intracelulares que parecem estar correlacionados com a gênese de patologias, como a HA.

1.5 A ouabaína e a hipertensão arterial

Entre os modelos animais de HA experimental encontra-se o induzido pela OUA, em que o tratamento crônico de ratos com esse digitálico mimetiza o aumento observado no plasma (2 a 5 nmol/L) em pacientes com HA essencial (MANUNTA et al., 1994; PIERDOMENICO et al., 2001; ROSSI et al., 1995). Além disso, o tratamento crônico com OUA em animais é bem descrito na literatura como sendo capaz de induzir a HA (DI-FILIPPO et al., 2003; BRIONES et al., 2006; HUANG et al., 1994; HUANG; LEENEN, 1999; MANUNTA et al., 1994; MANUNTA; HAMILTON; HAMLYN, 2001; ROSSONI et al., 2002a e b; XAVIER et al., 2004a, b e c). Nesse modelo de HA, a administração subcutânea de OUA (30 µg/Kg/dia), em ratos, é capaz de induzir o aumento da pressão arterial e elevar as concentrações circulantes (5 nmol/L), renais, hipotalâmica e na pituitária anterior de OUA (MANUNTA et al., 1994). Além disso, apesar do efeito pressórico não requerer a glândula adrenal para sua ocorrência e não ser sensível a sal, observa-se o aumento das concentrações plasmáticas de aldosterona (MANUNTA et al., 1994). Também neste modelo de HA, a OUA ativa tanto mecanismos centrais quanto periféricos, que agem nos diferentes territórios cardiovasculares para produzir o aumento da pressão arterial (BRIONES et al., 2006; CARGNELLI et al., 2000; DI FILIPPO et al., 2003; HUANG et al., 1994; HUANG, LEENEN, 1999; ROSSONI et al., 2002a e b; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a; ZHANG et al., 2009).

Analisando o componente central do efeito hipertensivo estimulado pela OUA, Huang et al. (1994) demonstraram que tanto a administração crônica intracerebroventricular (central) quanto a intravenosa ou subcutânea (periférica) de ouabaína (10 µg/dia) foram capazes de elevar a pressão arterial média e a frequência cardíaca de ratos Wistar. Quando feito o bloqueio ganglionar com hexametonio, tanto a pressão arterial como a frequência cardíaca dos ratos tratados com ouabaína foram normalizadas, sugerindo que a administração de ouabaína exógena atua centralmente para gerar a HA devido à simpatoexcitação.

Adicionalmente, Huang e Leenen (1999) verificaram que o tratamento subcutâneo de ratos Wistar com ouabaína (50 µg/dia) por 14 dias, além de elevar a pressão arterial de repouso, também aumentou a pressão arterial média, a frequência cardíaca e a atividade do nervo simpático renal e reduziu os mesmos parâmetros em resposta ao agonista α_2 (guanabenzol). Esses efeitos induzidos pela OUA foram impedidos pelo tratamento com losartana, a qual antagoniza o receptor AT₁. Nesse

mesmo trabalho também foi constatado que o tratamento com OUA induziu a dessensibilização do controle barorreflexo da atividade do nervo simpático renal. Assim, esses autores demonstraram importantes ações induzidas pela OUA, uma vez que sua administração crônica e periférica foi capaz de ativar o sistema renina-angiotensina cerebral, resultando em redução da simpatoinibição e aumento na simpatoexcitação, prejudicando a função do barorreflexo e contribuindo para a HA por ela induzida.

A literatura também demonstrou diferentes efeitos cardíacos da OUA. Em cultura de cardiomiócitos isolados de ratos Wistar, o tratamento com 30 μM de OUA foi capaz de aumentar a contração do cardiomiócito e a expressão proteica do trocador Na^+ , Ca^{2+} (MÜLLER-EHMSEN et al. 2003). Nesse estudo, enquanto a contração do cardiomiócito foi aumentada no mesmo dia de início do tratamento (dia 0), a expressão do trocador Na^+ , Ca^{2+} ocorreu após 2 e 4 dias de tratamento com a OUA. O aumento na expressão do trocador Na^+ , Ca^{2+} também foi observado em ratos Wistar tratados cronicamente com OUA (4 dias; 6,5 mg/ kg/ dia; s.c.) (EL-ARMOUCHE et al., 2004). Nesses animais, o aumento na expressão gênica do trocador Na^+ , Ca^{2+} foi acompanhado pelo aumento na expressão gênica da proteína inibidora de fosfatase – 1 (I-1). Por sua vez, Rossoni et al. (2006) demonstraram que, com cinco semanas de tratamento, a OUA ($\approx 26,7$ $\mu\text{g/kg/dia}$; s.c.) foi capaz de induzir o aumento da pressão arterial, aumento no inotropismo e lusitropismo cardíaco e a não modificação da frequência cardíaca nos ratos Wistar. Esse mesmo tratamento também levou ao aumento na atividade da ATPase miosínica e na expressão proteica das isoformas catalíticas α_1 e α_2 da Na^+ , K^+ ATPase no homogeneizado do ventrículo esquerdo. Adicionalmente às observações de Rossoni et al. (2006), Padilha et al. (2008) constataram que o tratamento crônico de ratos Wistar com OUA (25 mg/kg/dia; s.c.) era capaz de aumentar a pressão arterial, a ventricular e a atividade da ATPase miosínica no homogeneizado do ventrículo esquerdo com apenas 15 dias de tratamento.

Já no território arterial, o uso crônico desse digitálico induziu, em animais, HA associada com importantes mudanças na reatividade vascular (BRIONES et al., 2009; CARGNELLI et al., 2000; HERNANZ et al., 2008; ROSSONI et al., 2002a e b; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a, b e c) e também a mudanças

estruturais (BRIONES et al., 2006; ZHANG et al., 2009) nos vasos sanguíneos que influenciam e aumentam a resistência vascular periférica.

Após cinco semanas de tratamento com OUA, em adição ao aumento da pressão arterial observado em ratos, diferenças regionais na reatividade vascular têm sido relatadas (BRIONES et al., 2009; CARGNELLI et al., 2000; HERNANZ et al., 2008; KIMURA et al., 2000; ROSSONI et al., 2002a b; XAVIER et al., 2004a, b e c). Entre essas, verificou-se: a redução na resposta constritora à fenilefrina, observada em anéis de aorta torácica e artéria mesentérica superior; a não alteração nas respostas contráteis mediadas por agonistas α -adrenérgicos nas artérias caudal, basilar encefálica, coronária e mesentérica de resistência (AMR); e, por outro lado, o aumento dessa resposta contrátil em anéis de artéria renal (BRIONES et al., 2009; CARGNELLI et al., 2000; HERNANZ et al., 2008; KIMURA et al., 2000; ROSSONI et al., 2002a b; XAVIER et al., 2004a).

Em relação à modulação endotelial, o tratamento crônico com a OUA aumenta a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio, os quais atuam na redução da contração vascular aos agonistas α -adrenérgicos e aumentam a atividade da Na^+ , K^+ ATPase em preparações experimentais de aortas e artérias mesentéricas (ROSSONI et al., 2002a e b; XAVIER et al., 2004a). Essa ação endotelial demonstrou ser mediada por meio do aumento na produção de óxido nítrico (NO, modulação nitrérgica) e, também, por estar relacionada ao aumento da expressão proteica das isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) da sintase do NO (ROSSONI et al., 2002a; XAVIER et al., 2004a). Além desses autores, outros trabalhos também mostraram o aumento do NO em outras preparações vasculares. HERNANZ et al. (2008) observaram que esse aumento no NO também ocorre nas artérias basilares encefálicas de ratos cronicamente tratados com OUA devido à maior biodisponibilidade desse fator. Por sua vez, BRIONES et al. (2009) demonstraram um importante mecanismo estimulado pelo aumento do NO nas artérias coronárias. Esses autores observaram que o aumento do NO estimulado pelo tratamento crônico com OUA foi responsável pela ativação de corrente iônica BKCa^{2+} , contribuindo para preservar a função endotelial da artéria coronária desses animais.

Curiosamente, apesar dos ajustes funcionais observados em artérias de condutância, as AMR de ratos Wistar hipertensos devido ao tratamento com OUA não apresentaram alterações da contração vascular à noradrenalina quando tratados por

5 semanas com esse digitálico (XAVIER et al., 2004a). No entanto, com esse tempo de tratamento, essas artérias apresentaram um desequilíbrio entre a produção de NO, que estava aumentada, e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que encontrava-se reduzido (XAVIER et al., 2004a).

Por outro lado, as mudanças na contração das AMR ocorrem de modo dependente do tempo nos ratos Wistar tratados com OUA. Wenceslau et al. (2011) demonstraram que as AMR dos ratos hipertensos tratados com OUA por 5 ou 10 semanas, não apresentaram alteração da resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina, coerente com trabalhos anteriores (XAVIER et al., 2004a). Contudo, o aumento na contração à noradrenalina nas AMR ocorreu nos ratos tratados por 20 semanas com a OUA (WENCESLAU et al., 2011), levando ao aparecimento de uma hiperreatividade vascular *in vitro*, mas com um tempo maior que o necessário para se observar o aumento pressórico *in vivo*. Nas AMR desses ratos, a hiperreatividade à noradrenalina foi relacionada com a redução da biodisponibilidade do NO devido ao estresse oxidativo produzido pela enzima COX-2 (WENCESLAU et al., 2011). Vale ressaltar que o aumento da expressão proteica da COX-2 nos ratos Wistar tratados com OUA pode ter ocorrido antes da 20ª semana de tratamento. Essa afirmativa baseia-se no fato de que Padilha et al. (2008) demonstraram que o tratamento com OUA aumenta a expressão proteica da COX-2 em AMR de ratos Wistar após 2 semanas de tratamento. Resultados semelhantes aos de Wenceslau et al. (2011) haviam sido observados quando estudados os anéis de artérias caudais provenientes de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados durante 5 semanas com OUA (XAVIER et al., 2009). Esse estudo, sugeriu que a presença do estado hipertensivo foi capaz de potencializar os efeitos deletérios induzidos pela ouabaína em artérias, estando a COX-2 envolvida nas alterações da reatividade vascular induzidas pela OUA e tornando essa enzima um importante alvo de estudo para o entendimento das ações vasculares da OUA.

Adicionalmente às alterações funcionais nas artérias de resistência, Briones et al. (2006) demonstraram que o tratamento crônico, por 5 semanas, com OUA, foi capaz de induzir o processo de remodelamento vascular nas AMR. Nessas artérias foram observadas alterações geométricas estruturais, como aumento na razão parede/luz, diminuição da área de secção transversa e redução nos diâmetros internos e externos nas artérias de resistência, quando comparadas com as dos

animais controle. Esse remodelamento vascular no modelo de HA, induzido pelo tratamento crônico com OUA, foi caracterizado como do tipo hipotrófico para dentro, o qual parece ter um papel-chave na gênese desse modelo de HA (BRIONES et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Nele, as modificações geométricas das AMR ocorreram associadas à diminuição do número de células musculares lisas, ao aumento da deposição de colágeno na camada média dessas artérias e ao aparecimento de rigidez vascular (BRIONES et al., 2006). Cabe ressaltar que essas mudanças estruturais nas AMR foram observadas com 5 semanas de tratamento com OUA, tempo de tratamento no qual não se observa mudanças na reatividade vascular dessas artérias (XAVIER, 2005).

Além do remodelamento vascular hipotrófico para dentro observado no terceiro ramo arterial do leito mesentérico, Zhang et al. (2009) também investigaram possíveis modificações que ocorrem em ramos arteriais menores que os terceiros ramos no leito vascular mesentérico. Esses autores observaram que, embora os terceiros ramos vasculares apresentassem as modificações estruturais classificadas como remodelamento hipotrófico para dentro, os quartos ramos arteriais do mesmo leito vascular não apresentaram nenhuma modificação estrutural. Esse resultado descrito por Zhang et al. (2009) corrobora para a idéia do remodelamento vascular nesse modelo de hipertensão não ocorrer em artérias menores que as do terceiro ramo no leito vascular mesentérico.

Embora já tenha sido descrita a capacidade do tratamento crônico com OUA em induzir remodelamento vascular (BRIONES et al., 2006; ZHANG et al., 2009), ainda não foram estudadas as vias envolvidas nas modificações geométricas e mecânicas descritas por Briones et al. (2006) e, posteriormente, por Zhang et al. (2009) nas AMR. Entretanto, duas importantes vias vêm sendo apontadas como responsáveis pelo desenvolvimento da HA induzida pela OUA: as vias do sistema renina-angiotensina (HUANG; GANTEN; LEENEN, 2001; HUANG; LEENEN, 1999; XAVIER et al., 2004a e c; ZHANG; LEENEN, 2001) e a da enzima COX-2 (OLIVEIRA, 2013; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2009).

1.6 A ouabaína e o sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina foi originalmente descrito como um sistema circulante; entretanto, sabe-se hoje que a maioria de seus componentes podem ser encontrados em vários tecidos do organismo, devido à existência de um sistema renina-angiotensina local ou tecidual (DANSER, 1996; DZAU, 1989). Na visão clássica do sistema renina-angiotensina circulante, a diminuição na pressão de perfusão renal induz a liberação de renina na mácula densa do aparelho justaglomerular. Já na circulação, a renina catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I e, por sua vez, a enzima conversora de angiotensina (ECA), situada na superfície do endotélio vascular, converte a angiotensina I em angiotensina II (SEALEY; LARAGH, 1990). Por fim, a angiotensina II liga-se preferencialmente ao seu sítio de alta afinidade do receptor AT_1 -embora também possa se ligar ao receptor AT_2 - presente em uma variedade de tecidos e, dessa maneira, exerce suas atividades biológicas (DZAU; SASAMURA; HEIN, 1993; TIMMERMANS et al., 1993;).

No entanto, em sua revisão, Santos (2014) aborda novos conceitos que foram considerados importantes para a visão contemporânea sobre o sistema renina-angiotensina. O moderno conceito do sistema renina-angiotensina, em adição aos componentes clássicos (renina, ECA, angiotensina II, angiotensina III, receptores AT_1 e AT_2), inclui outros novos componentes (ECA2 [DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000;], angiotensina-(1-7), receptor de (pró)renina [NGUYEN et al., 2002] e receptor MAS) [SANTOS et al., 2003].

Nesse contexto, a angiotensina II é o peptídeo ativo mais conhecido do sistema renina-angiotensina. Por meio da ativação do receptor AT_1 , esse peptídeo é capaz de promover a contração do músculo liso vascular, a produção de radicais livres, o crescimento e migração celular, a produção de proteínas da matriz extracelular e inflamação (ALLEN; ZHUO; MENDELSON, 2000).

Outros receptores também participam desse complexo sistema. A estimulação do receptor AT_2 ativa três vias de sinalização diferentes: via de produção de GMP cíclico/óxido nítrico (GOHLKE; PEES; UNGER, 1998; WALTERS; GASPARI; WIDDOP, 2005), ativação de fosfatases (FISCHER et al., 1998; HORIUCHI et al., 1997) e ativação da fosfolipase A2 (LOKUTA et al., 1994). A ativação desse receptor produz efeitos antagônicos à ativação do receptor AT_1 , relacionados, principalmente, com a regulação do processo inflamatório, fibrose e apoptose (STECKELINGS et al.,

2009). Por sua vez, o ligante descrito como estimulador do receptor MAS é a angiotensina (1-7) (SANTOS, 2014). A ligação do receptor MAS com a angiotensina (1-7) produz efeitos como: relaxamento nos vasos (BROSNIHAN et al., 1997; BROSNIHAN; LI; FERRARIO, 1996), estimulação da liberação de óxido nítrico pela eNOS e nNOS (COSTA et al., 2010; DIAS-PEIXOTO et al., 2008), efeito cardioprotetor (DE ALMEIDA et al., 2013; MOUNT; KEMP; POWER, 2007), efeito anti-hipertrofico (HE et al., 2004; LI et al., 2009), além de vários outros sobre o sistema cardiovascular e renal (ver revisão SANTOS, 2014).

Através de múltiplas vias eferentes, esse sistema pode elevar a pressão sanguínea. Entre essas vias, a angiotensina II pode elevar a pressão sanguínea por aumentar a liberação de catecolaminas dos terminais nervosos simpáticos, aumentando a contratilidade miocárdica e vascular, além de ser uma potente indutora de contração arterial (SEALEY; LARAGH, 1990). Ela também estimula a reabsorção de sódio no túbulo proximal e a produção de aldosterona no córtex adrenal, elevando a reabsorção de sódio no túbulo distal (SEALEY; LARAGH, 1990), o que reduz a natriurese. A angiotensina II é capaz de alterar a hemodinâmica glomerular, elevando a pressão coloidosmótica capilar peritubular e diminuindo a pressão hidrostática capilar peritubular (HALL; GAYTON, 1990; HALL, 1986). Essas mudanças resultam no aumento da transferência de sódio e água do lúmen tubular para o capilar peritubular, contribuindo para o aumento na pressão arterial.

Em outro importante papel, o sistema renina-angiotensina é capaz de induzir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e vascular, normalmente observada em humanos e em modelos animais de HA (MULVANY, 1995; SCHELLING; FISCHER; GANTEN, 1991). Além disso, ele é um bem conhecido mediador de remodelamento vascular, responsável por induzir mudanças no número de células e nas proteínas da matriz extracelular (CACHOFEIRO et al., 2008; LACOLLEY; LABAT; PU et al., 2003; PUJOL, 2002; SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004).

Basicamente, a capacidade do sistema renina-angiotensina em mediar o remodelamento vascular se dá pela capacidade da angiotensina II estimular vias de sinalização pró-fibróticas, em parte através da produção endógena de fatores mitogênicos tais como o TGF- β , fator de crescimento derivado de plaquetas, endotelina-1 (TOUYZ, 2005) e aldosterona (CALLERA et al., 2005), e também em

parte devido à sua capacidade de induzir o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CACHOFEIRO et al., 2008; SCHIFFRIN; TOUZY, 2004).

Alguns estudos vêm demonstrando que a OUA é capaz de ativar alguns componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Tamura et al. (1996) demonstraram que a OUA (10nM) foi capaz de induzir o aumento na liberação de aldosterona em cultura de células glomerulosas da adrenal, o qual é bloqueado pelo antagonismo do receptor AT₁. Por sua vez, a incubação aguda de OUA (1nM) foi capaz de induzir o aumento na síntese e liberação de angiotensina II no território vascular (PADILHA et al., 2004). Nesse estudo, a perfusão do leito vascular caudal isolado de rato SHR com 1nM de OUA induziu o aumento na sensibilidade à fenilefrina dependente da presença de endotélio. Esse efeito foi revertido pelos tratamentos com losartana e enalapril, sugerindo a capacidade da OUA em ativar a enzima conversora de angiotensina no endotélio vascular, promovendo a produção da angiotensina II que, por sua vez, sensibilizou o músculo liso vascular à ação da fenilefrina.

Relacionando o SRA com a HA induzida pela OUA, já foi observado que o antagonismo do sistema renina-angiotensina impede a capacidade desse digitálico em elevar a pressão arterial (HUANG; GANTEN; LEENEN, 2001; HUANG; LEENEN, 1999; XAVIER et al., 2004a e c). Na literatura, tanto a administração de antagonistas do receptor AT₁ como a utilização de ratos transgênicos com deficiência para o angiotensinogênio cerebral, foram capazes de impedir o aumento da atividade simpática e a HA induzida pelo tratamento crônico com OUA (HUANG; GANTEN; LEENEN, 2001; XAVIER et al., 2004a e c).

Por outro lado, esse sistema parece possuir ações diferenciadas para alterar a pressão arterial e as respostas vasculares induzidas pela OUA. Xavier et al. (2004a,c) demonstraram uma importante diferença entre a resposta arterial e pressórica nos ratos hipertensos induzidos com OUA. Eles observaram que as alterações funcionais encontradas em anéis de aorta, artéria mesentérica superior e AMR de ratos submetidos ao tratamento crônico com OUA são independentes da elevação da pressão arterial ou da ativação do sistema renina-angiotensina.

Por sua vez, Xavier (2005) estudou em sua tese de doutorado a relação do efeito pressórico com as modificações na reatividade vascular e no remodelamento vascular induzido pelo tratamento crônico com a OUA. Esse autor observou que o remodelamento vascular hipotrófico para dentro, a rigidez arterial e o efeito pressórico

foram impedidos pela inibição do receptor AT_1 , enquanto que as modificações na reatividade vascular da AMR não o foram. No entanto, cabe lembrar que ainda não é completamente conhecida a relação do efeito pressórico (hemodinâmico) e do remodelamento arterial induzido pela OUA com o sistema renina-angiotensina nesse modelo de HA. Além disso, é importante salientar que também há uma inter-relação entre o sistema renina-angiotensina e derivados da enzima cicloxigenase (COX) que parece contribuir no processo de desenvolvimento da HA.

1.7 A ouabaína e a enzima cicloxigenase

Uma vez liberado da membrana celular, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por uma de três vias enzimáticas principais: a da enzima cicloxigenase, a da enzima lipoxigenase, ou a via citocromo P450 monoxigenase (DUBOIS et al., 1998; WILLIAMS; MANN; DUBOIS, 1999).

Como demonstrado na figura 4, a cicloxigenase (COX) é uma enzima regulatória chave, capaz de catalisar a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H_2 (PGH_2), que é o substrato imediato para sintases e isomerases que irão produzir os prostanoides PGE_2 , PGI_2 , $PGF_{2\alpha}$ e tromboxano A_2 (TxA_2) (DANNENBERG et al., 2001; ELING et al., 1990).

Figura 4 - Vias de produção de prostanoide através da enzima cicloxigenase

Diagrama esquemático para a conversão do ácido araquidônico a eicosanóides através da via da cicloxigenase. Modificado de Stack e Dubois, 2001.

Entre as isoformas da COX, a COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos sobre condições basais (CROFFORD, 1997). Em contraste, a COX-2 é pouco encontrada ou ausente na maioria dos tecidos. Essa isoforma pode ser induzida por muitos estímulos fisiológicos e pró-inflamatórios, incluindo a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), os lipopolissacarídeos (LPS), o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (PARENTE; PERRETTI, 2003; RADJ, 2009).

Além disso, dependendo das maquinarias enzimáticas associadas a essas isoformas, o perfil dos eicosanóides produzidos pela COX pode ser modulado nos diferentes tipos celulares. Por exemplo: enquanto o TXA₂ é o principal produto derivado da COX nas plaquetas, a PGI₂ é o principal produto do endotélio vascular. Isso é resultado da maior expressão da tromboxano sintase nas plaquetas e da prostaciclina sintase na célula endotelial (SCHAFFER, 1995).

Essas isoformas da COX têm apresentado diferentes papéis na modificação da reatividade e no remodelamento vascular em modelos de HA. Luscher e Vanhoutte (1986) demonstraram que a contração induzida pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos SHR ocorrem devido à ativação da COX-1, resposta que desaparece quando utilizado o inibidor específico, o SC-560. Já em outros modelos de HA, como nos ratos hipertensos induzidos com OUA, e também em animais hipertensos DOCA-sal, a ativação da COX-2 e a consequente produção de prostanoídes dela derivados possuem um papel fundamental na disfunção endotelial encontrada nesses modelos (ADEAGBO et al., 2005; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2009).

Quanto ao papel da COX no remodelamento vascular, Viridis et al. (2011) demonstraram que a inibição da COX-1 (SC-560) preveniu a alteração estrutural (remodelamento hipertrófico) induzida pela angiotensina II, assim como reduziu a rigidez vascular. A inibição dessa isoforma impediu o aumento na deposição de colágeno e fibronectina e normalizou o conteúdo de elastina nas AMR dos camundongos infundidos com Angiotensina II (400 ng/ kg/ min; s.c.) (VIRDIS et al., 2011). Esses fatos apresentados pelos autores sugerem que a isoforma 1 da COX é uma das vias ativadas pela angiotensina II, sendo também a responsável por induzir as mudanças na geometria e mecânica arteriais nesse modelo de HA.

Adicionalmente, a COX-2 possui uma importante participação nos mecanismos hipertensivos. Viridis et al. (2013) apontaram para a isoforma 2 da COX como a possível fonte de espécies reativas de oxigênio na hipertensão arterial essencial em humanos. Nesse estudo, as artérias de resistências provenientes da biópsia de tecido adiposo subcutâneo apresentaram maior expressão proteica da isoforma 2 da COX, que foi co-localizada na camada média. Essa isoforma foi a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio nas artérias estudadas. Além disso, Avendaño et al. (2016) demonstraram o papel da COX-2 na modificação da estrutura vascular. Esses autores observaram que tanto em ratos SHR, como em camundongos infundidos com angiotensina II, a inibição da COX-2 é capaz de impedir a rigidez arterial nas AMR, impedir a deposição de colágeno, produzir a normalização das fenestras presentes na lâmina elástica e diminuir a expressão gênica do fator de crescimento do tecido conectivo e do inibidor do fator ativador plasminogênio - 1.

No entanto, diferentemente do que ocorre no modelo de HA induzido pela angiotensina II, a literatura a respeito do modelo de hipertensão induzido pela OUA vem apresentando descobertas relevantes que apontam para a ativação da isoforma 2 da COX como a via responsável por gerar modificações vasculares. La et al. (2015) demonstraram que o tratamento de culturas celulares de fibroblastos com OUA foi capaz de induzir o aumento na expressão proteica da COX-2. Essa ação induzida pela OUA foi associada à sua capacidade de inibir a Na^+ , K^+ ATPase. Em ratos SHR, o tratamento crônico com OUA (OLIVEIRA, 2013; XAVIER et al., 2009;) é responsável por aumentar a contração dos anéis da artéria caudal e AMR, sendo essas respostas normalizadas com a inibição da COX. Nesses animais, as alterações vasculares encontradas foram relacionadas, em parte, com o aumento na produção de prostanoídes contráteis derivados da COX-2 (OLIVEIRA, 2013; XAVIER et al., 2009).

A hiperreatividade à noradrenalina e o aumento na expressão proteica da COX-2 em AMR foram encontrados em ratos hipertensos pelo tratamento crônico com OUA (PADILHA et al., 2008; WENCESLAU et al., 2011). Interessantemente, a utilização do ridogrel (um inibidor da síntese de TxA_2 e antagonista do receptor $\text{PGH}_2/\text{TxA}_2$) diminuiu a contração da noradrenalina nas AMR dos ratos tratados com ouabaína por 20 semanas, o que sugere que o TxA_2 e o PGH_2 são os principais prostanoídes vasoconstritores produzidos pela COX-2 nesse modelo de HA (WENCESLAU et al., 2011).

Nesse contexto, embora ainda não seja conhecido o envolvimento da COX no remodelamento hipotrófico para dentro induzido pela OUA; porém, sabe-se que a isoforma 2 dessa enzima está mais expressa nas AMR de ratos Wistar tratados com OUA por 15 dias (PADILHA et al., 2008) e 20 semanas (WENCESLAU et al., 2011). Além disso, a COX está envolvida nas modificações da reatividade vascular dessas artérias (WENCESLAU et al., 2011) e em ratos SHR tratados com a mesma dose de OUA, porém com 5 semanas de tratamento (OLIVEIRA, 2013; XAVIER et al., 2009). Adicionalmente, o fato do sistema renina-angiotensina possuir um importante papel na gênese de processos de remodelamento vascular (CACHOFEIRO et al., 2008; LACOLLEY; LABAT; PUJOL, 2002; MULVANY, 1995; PU et al., 2003; SCHELLING; FISCHER; GANTEN, 1991; SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004), assim como os estudos que demonstram a resposta pressórica induzida pela OUA (HUANG; GANTEN; LEENEN, 2001; XAVIER et al., 2004a e c;) e a atuação tanto da COX-1 como da COX-2 no

mecanismo do remodelamento vascular induzido pelo aumento da angiotensina II (BELTRÁN et al., 2009; GALÁN et al., 2011; VIRDIS et al., 2011;), pode-se supor sua provável participação, juntamente com a via da COX-2, nesse processo de remodelamento vascular induzido pela OUA.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados anteriormente apresentados pode-se concluir que, o efeito pressórico induzido pela OUA está relacionado com a estimulação do sistema renina-angiotensina, por meio da ativação do receptor AT_1 e da enzima ciclooxigenase (COX)-2. De maneira inédita, nas AMR dos ratos tratados com a OUA, o remodelamento vascular hipotrófico para dentro, com rigidez da parede arterial, ocorreu devido à ativação do receptor AT_1 e da COX-2, não sendo uma resposta secundária ao aumento da pressão arterial. A ativação do receptor AT_1 e da COX-2 induziu o remodelamento hipotrófico para dentro, com rigidez, em AMR associado a redução na quantidade de células musculares lisas (apoptose celular) e ao estímulo à deposição de colágeno, tendo o stress oxidativo como sinalizador desse processo.

REFERÊNCIAS*

- ABDELRAHMAN, A. M.; AL SULEIMANI, Y. M. Four-week administration of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, improves endothelial dysfunction in the hindlimb vasculature of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arch. Pharm. Res.**, v. 12, p. 1584-1589, 2008.
- ABRAMOWITZ, J. et al. Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. **Circulation**, v. 108, p. 3048–3053, 2003.
- ADEAGBO, A. S. et al. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. **J. Hypertens.**, v. 23, p. 1025-1036, 2005.
- AGABITI-ROSEI, E. et al. Effects of antihypertensive treatment on small artery remodelling. **J. Hypertens.**, v. 27, p. 1107-1114, 2009.
- AIZMAN, O.; APERIA, A. Na,K-ATPase as a signal transducer. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 986, p. 489–496, 2003.
- AKIMOVA, O. A. et al. Death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence for p38 MAPK-mediated Nai+/Ki+-independent signaling. **Apoptosis**, v. 14, p. 1266–1273, 2009.
- AL SULEIMANI, Y. M. et al. Interaction of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, with cisplatin in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 1, p. 139-144, 2010.
- ALLEN, A. M. et al. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. **Am. J. Hypertens.**, v. 13, p. S31-S38, 2000.
- ALVAREZ, Y. et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **J. Hypertens.**, v. 23, p. 767-777, 2005.
- ALVAREZ, Y. et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 321, p. 381-388, 2007.
- AN, S.J. et al. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, p. 702–709, 2007.
- ANTOLOVIC, R. et al. Endogenous ouabain and its binding globulin: effects of physical exercise and study on the globulin's tissue distribution. **Hypertens. Res.**, v. 23, p. S93–S98, 2000.
- APELL, H.J. et al. Partial reactions of the Na,KATPase: kinetic analysis and transport properties. **Acta. Physiol. Scand. Suppl.**, v. 643, p. 235–245, 1998.
- ARRIBAS, S. M. et al. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. **Pharmacol. Ther.**, v. 111, p. 771-791, 2006.
- AVENDAÑO, M. S. et al. Role of COX-2-derived PGE2 on vascular stiffness and function in hypertension. **Br. J. pharmacol.**, 2016.
- AYDEMIR-KOKSOY, A. et al. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 46605–46611, 2001.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. **Nat. Clin. Pract. Nephrol.**, v. 4, p. 378–392, 2008.

BAGROV, A. Y. et al. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacol. Rev.**, v. 61, p. 09-38, 2009.

BARBIERI, S. S. et al. Tobacco smoke regulates the expression and activity of microsomal prostaglandin E synthase-1: role of prostacyclin and NADPH-oxidase. **FASEB. J.**, v. 25, p. 3731–3740, 2011.

BARRUETO, F. J. R. et al. Cardioactive steroid poisoning: a comparison of plant- and animal-derived compounds. **J. Med. Toxicol.**, v. 2, p. 152–155, 2006.

BAUMBACH, G.L.; HEISTAD, D.D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. **Hypertension**, v. 13, p. 968–792, 1989.

BELKHIRI, A. et al. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ expression. **Lab. Invest.**, v. 77, p. 533–539, 1997.

BELTRÁN, A. E. et al. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 1, p. 142-154, 2009.

BENARROCH, E.E. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 76, p. 287–293, 2011.

BENDALL, J.K. et al. Pivotal role of a gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**, v. 105, p. 293–296, 2002.

BENYAHIA, B. et al. Effects of SOD topical treatment on human skin radiofibrosis; a pathological study. **Breast. J.**, v. 5, p. 75–81, 1996;

BLANCO, G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. **Semin. Nephrol.**, v. 25, p. 292–303, 2005.

BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **Am. J. Physiol.** v.275, p. F633-F650. 1998

BLANCO, G.; WALLACE, D. P. Novel role of ouabain as a cystogenic factor in autosomal dominant polycystic kidney disease. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 305, p. F797–F812, 2013.

BLAUSTEIN, M. P. et al. The pump, the exchanger, and endogenous ouabain. **Hypertension**, v. 53, p. 291–298, 2009.

BLAUSTEIN, M. P. et al. The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: a new hypothesis. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 20, p. 691–703, 1998.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 1367–1387, 1993.

BLAUSTEIN, M. P.; LEDERER, W. J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. **Physiol. Rev.**, v. 79, p.763–854, 1999.

BLOOM, W.; FAWCETT, D. W. **A Textbook of histology**. 9th ed. Phyladelphia : Saunders, 1968.

BOBIK, A.; TKACHUK, V. Metalloproteinases and plasminogen activators in vessel remodeling. **Curr. Hpertens. Rep.**, v. 5, p. 466-472, 2003.

- BOENGLER, K. et. al. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. **Pharmacol. Ther.**, v. 120, p. 172-185, 2008.
- BOLDYREV, A. A. Na⁺,K⁺-ATPase: 40 years of investigations. **Membr. Cell. Biol.**, v. 13, p. 715-719, 2000.
- BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. **Hypertension**, v. 31, p. 181-188, 1998.
- BRILLA, C. G. et. al. Collagen metabolism in cultured rat cardiac fibroblasts: Response to angiotensin II and aldosterone. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 26, p. 809-820, 1994.
- BRIONES, A. M. et al. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. **J. Physiol.**, v. 552, p. 185-195, 2003.
- BRIONES, A. M. et al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 29, p. 193-201, 2006.
- BRIONES, A. M. et al. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. **Hypertension**, v. 54, p. 142-149, 2009.
- BRIONES, A. M. et al. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 19, p. 187-194, 2010.
- BRIONES, A. M. et. al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 29, p. 193-201, 2006.
- BRODIE, C. et. al. Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. **J. Cell. Physiol.**, v. 165 p. 246-253, 1995.
- BROSNIHAN, K. B. et al. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. **Biological research**, v. 31, n. 3, p. 227-234, 1997.
- BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, v. 27, n. 3, p. 523-528, 1996.
- BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. Angiotensin II induces Fat1 expression/activation and vascular smooth muscle cell migration via Nox1-dependent reactive oxygen species generation. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 66, p. 18-26, 2014.
- BUÑAG, R. D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. **J. Appl. Physiol.**, v. 2, p. 279-282, 1973.
- BUND, S. J. Mechanical properties of small femoral arteries in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 18, p. 1013-1034, 1996.
- CACHOFEIRO, V. et al. Aldosterone and the vascular system. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 109, p. 331-335, 2008.
- CALLERA, G. E. et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. **Hypertension**, v. 45, p. 773-779, 2005.
- CAPONE, C. et al. Cyclooxygenase 1-derived prostaglandin E2 and EP1 receptors are required for the cerebrovascular dysfunction induced by angiotensin II. **Hypertension**, v. 55, p. 911-917, 2010.
- CARGNELLI, G. et al. Effect of long-term ouabain treatment on contractile responses of rat aortae. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, p. 538-542, 2000.
- CARLSON, E. C. et. al. Electron microscopic studies of cat mesenteric arterioles: a structure-function analysis. **Microvasc. Resp.**, v. 24, p. 123-141, 1982.

- CASTRO, M. M. et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. **Matrix. Biol.**, v. 29, p. 194-201, 2010.
- CHEN, K. et. al. Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: Modulation by PPAR- γ ligand pioglitazone. *Hypertension*, v. 44, p. 655–661, 2004.
- CHUA, C. C. et. al. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. **Biochim, Biophys, Acta.**, v. 1401, p. 187–194, 1998.
- CLARKE, R. J.; FAN, X. Pumping ions. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 38, p. 726–733, 2011.
- COGOLLUDO, A. Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1091, p.41–51, 2006.
- COSTA, M. A. et al. Angiotensin-(1–7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 299, n. 4, p. H1205-H1211, 2010.
- COTTON, S. et al: Changes of plasma endothelin and growth factor levels, and of left ventricular mass, after chronic AT1-receptor blockade in human hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 11, p. 548–553, 1998.
- CRABOS, M. et. al. Characterization of angiotensin II receptors in cultured rat fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 2372–2378, 1994.
- CROFFORD, L. J. COX-I and COX-2 tissue expression: implications and predictions. **J. Rheumatol.**, v. 24, p. 15-19, 1997.
- DANDONA, P. et al. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v. 88, p. 4496–4501, 2003.
- DANNENBERG, A. J. et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet. Oncol.**, v. 2, p. 544–551, 2001.
- DANSER, A. H. Local renin-angiotensin systems. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 157, p. 211-216, 1996.
- DAVEL, A. P. Enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity and endothelial modulation decrease phenylephrine-induced contraction in aorta from ouabain-treated normotensive and hypertensive rats. **Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.**, v. 18, p. 113-122, 2014.
- DE ALMEIDA, P. W. M. et al. Functional cross-talk between aldosterone and angiotensin-(1-7) in ventricular myocytes. **Hypertension**, v. 61, n. 2, p. 425-430, 2013.
- DELANIAN. S. et. al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: Clinical trial. **Radiother. Oncol.**, v. 32, p. 12–20, 1994.
- DELVA, P. et al. Collagen I and III mRNA gene expression and cell growth potential of skin fibroblasts in patients with essential hypertension **J. Hypertens.**, v. 20, p. 1393-1399, 2002.
- DENG, L. Y.; SCHIFFRIN, E. L. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 6, p. 1782-1787, 1992.
- DENG, L. Y.; SCHIFFRIN, E. L. Morphological and functional alterations of mesenteric small resistance arteries in early renal hypertension in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 4, p. 1171-1177, 1991.
- DIAS-PEIXOTO, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 52, n. 3, p. 542-548, 2008.
- DI-FILIPPO, C. et al. Chronic peripheral ouabain treatment affects the brain endothelin system of rats. **J. Hypertens.**, v. 21, p. 747–753, 2003.

DMITRIEVA, R.I.; DORIS, P.A. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 28160–28166, 2003.

DOBRIN, P. B. Mechanical properties of arteries. **Physiol. Rev.**, v. 58, p. 397–460, 1978.

DOCUMENTO DO BANCO MUNDIAL. BRASIL. **Enfrentando o desafio das doenças não transmissíveis no Brasil**. Relatório No. 32576-BR. 15 de novembro de 2005., 2005.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ. Res.**, v. 87, n. 5, p. e1-e9, 2000.

DRUMMOND, C. A. et al. Na/K-ATPase Signaling Regulates Collagen Synthesis Through microRNA-29b-3p in Cardiac Fibroblasts. **Physiol. Genomics**, p. physiolgenomics. 00116.2015, 2015.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB. J.**, v. 12, p. 1063-1073, 1998.

D'USCIO, L. V. et al. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. **Hypertension**, v. 4, p. 905-911, 1997.

DVELA, M. et. al. Endogenous ouabain regulates cell viability. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 302, p. C442–C452, 2012.

DZAU, V. J. et. al. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. **J. Hypertens.**, v. 11, p. s13-s18, 1993.

DZAU, V. J. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall. **J. Hypertens.**, v. 7, p. 933-936, 1989.

EICHHORN, E. J. et. al. Digoxin. **Progr. Cardiovasc. Dis.**, v. 44, p. 251–266, 2002.

EL-ARMOUCHE, Ali et al. Ouabain treatment is associated with upregulation of phosphatase inhibitor-1 and Na⁺/Ca²⁺-exchanger and β -adrenergic sensitization in rat hearts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 318, n. 1, p. 219-226, 2004.

ELING, T. E. et al. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 01–45, 1990.

ENDEMANN, D. et al. Altered angiotensin II-induced small artery contraction during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats*. **American journal of hypertension**, v. 12, n. 7, p. 716-723, 1999

FEDOROVA, O. V. et. al. Endogenous Na,K pump ligands are differentially regulated during acute NaCl loading of Dahl rats. **Circulation**, v. 102, p. 3009–3014, 2000.

FEIHL, F. et al. Hypertension and microvascular remodelling. **Cardiovasc. Res.**, v. 78, p. 274-285, 2008.

FERAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 345–418, 2001.

FISCHER, T. A. et al. Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, n. 3, p. H906-H916, 1998.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol. Rev.**, v. 62, p. 347-504, 1982.

FRANCHINI, K. G. **Circulação arterial e hemodinâmica: física dos vasos sanguíneos e da circulação**. In: AIRES, M.M. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 474–489.

GALÁN, M. et al. Angiotensin II differentially modulates cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and prostaglandin I2 synthase expression in adventitial fibroblasts exposed to inflammatory stimuli. **J. Hypertens.**, v. 3, p. 529-536, 2011.

GARCÍA-REDONDO, A. B., et. al. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A2, Ca²⁺, and superoxide anion levels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 328, p. 19-27, 2009.

GEERING, K. Functional roles of Na, K-ATPase subunits. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 17, n. 5, p. 526-532, 2008.

GEERING, K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 33, p. 425-438, 2001.

GIBBONS, G. The pathophysiology of hypertension: the importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. **Am. J. Hypertens.**, v. 11, p. 177S-181S, 1998.

GOHLKE, P.; PEES, C.; UNGER, T. AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. **Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 349-355, 1998.

GÓMES-GARRE, D. et al. Losartan improves resistance artery lesions and prevents CTGF and TGF-beta production in mild hypertensive patients. **Kidney. Int.**, v. 69, p. 1237-1244, 2006.

GÓMEZ-SANCHEZ, E. P. et al. Is the circulating-like compound ouabain? **Am. J. Hypertens.**, v. 7, p. 647-650, 1994.

GONZÁLEZ, J. M. et al. Influence of elastin on rat small artery mechanical properties. **Experimental physiology**, v. 90, n. 4, p. 463-468, 2005.

GONZÁLEZ, J. M. et al. Postnatal alterations in elastic fiber organization precede resistance artery narrowing in SHR. **Am. J. Physiol. Heart and Circ. Physiol**, v. 291, n. 2, p. H804-H812, 2006

GOTTLIEB, S.S. et. al. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 86, p. 420-425, 1992.

GREEN, H.J. Membrane excitability, weakness, and fatigue. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 29, p. 291-307, 2004.

HAAS, M. et. al. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 18694-18702, 2002.

HALL, J. E. Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanism and blood pressure regulation. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. 960-972, 1986.

HALL, J. E.; GAYTON, A. C. Control of sodium excretion and arterial pressure by intrarenal mechanisms and the renin-angiotensin system. In: LARAGH, J. H.; BRENNER, B. M. **Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management**. New York: Raven Press, 1990. v. 1, 1105 p.

HAMLYN, J. M, et. al. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. **J. Hypertens.**, v. 14, p. 151-171, 1996.

HAMLYN, J. M. et al. A circulating inhibitor of (Na⁺ K⁺) ATPase associated with essential hypertension. **Nature**, v. 300, p. 650-652, 1982.

HAMLYN, J. M. et. al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 6259-6263, 1991.

HAMLYN, J. M. et. al. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 20, p. 523-533, 1998.

- HAMLYN, J. M. Increased levels of a humoral digitalis-like factor in deoxycorticosterone acetate-induced hypertension in the pig. **J. Endocrinol.**, v. 122, n. 1, p. 409-420, 1989.
- HAMLYN, J. M., MANUNTA, P. Ouabain, digitalis-like factor and hypertension. **J. Hypertens.**, v. 10, p. S99-S111. 1992.
- HARWOOD, S. et. al. Plasma OLC is elevated in mild experimental uremia but is not associated with hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 14, p. 1112–1115, 2001.
- HAUCK, C.; FRISHMAN, W. H. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺ ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. **Cardiol. Rev.**, v. 20, p. 130–138, 2012.
- HAUPTMAN, P. J.; KELLY, R.A. Digitalis. **Circulation**, v. 99, p. 1265–1270, 1999.
- HE, J. G. et al. [Effects of angiotensin-(1-7) on remodeling of myocardial collagen network in pressure-overloaded rats]. **Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue= Chinese critical care medicine= Zhongguo weizhongbing jijiuyixue**, v. 16, n. 9, p. 523-526, 2004.
- HERNANZ, R. et al. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 287, p. H225-H234, 2004.
- HORIUCHI, M. et al. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 30, p. 19022-19026, 1997
- HUANG, B. S. et al. Chronic central versus peripheral ouabain, blood pressure, and sympathetic activity in rats. **Hypertension**, v. 23, p. 1087–1090, 1994.
- HUANG, B. S. et. al. Responses to central Na(+) and ouabain are attenuated in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. **Hypertension**, v. 37, p. 683-686, 2001.
- HUANG, B.S.; LEENEN, F.H.H. Brain renin–angiotensin system and ouabain-induced sympathetic hyperactivity and hypertension in Wistar rats. **Hypertension**, v. 34, p. 107–112, 1999.
- HUNYADY, L.; CATT. K. J. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. **Mol. Endocrinol.**, v. 20, p. 953–970, 2006.
- INTENGAN, H. D. et. al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, p. 2267-2275, 1999.
- INTENGAN, H. D. et al. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. **Hypertension**, v. 33, p. 569-574, 1999a.
- INTENGAN, H. D. et al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, p. 2267-2275, 1999b.
- INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v. 36, p. 312-318, 2000.
- INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, v. 3, p. 581-587, 2001.
- JACOB, M. P. et al. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. **Pathol Biol.**, v. 49, p. 326-332, 2001.

JIANG, X. et al. Ouabain induces cardiac remodeling in rats independent of blood pressure. **Acta pharmacologica sinica**, v. 28, n. 3, p. 344-352, 2007

JORGENSEN, P. L. et. al. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p. 817-849, 2003.

KAGAMI, S. et. al. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through interaction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 2431–2437, 1994.

KAPLAN, J.H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 511–535, 2002.

KAPLAN, N. M. **Clinical Hypertension**. 7. ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1998. 444 p.

KARAA, A. et. al. Differential effects of oxidative stress on hepatic endothelial and Kupffer cell eicosanoid release in response to endothelin-1. **Microcirculation**, v. 13, p. 457–466, 2006.

KATO, H. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens.**, v. 9, p. 17–22, 1991.

KATZ, A. M. Effects of digitalis on cell biochemistry: sodium pump inhibition. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 5, p. 16A–21A, 1985.

KAWAGUCHI, Y. et. al. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. **Arch. Derm. Res.**, v. 88, p. 39–44, 1996.

KEELEY, F. W.; ALATAWI, A. Response of aortic elastin synthesis and accumulation to developing hypertension and the inhibitory effect of colchicine on this response. **Lab. Invest.**, v. 64, p. 499-507, 1991.

KEELEY, F. W.; JOHNSON, D.J. The effect of developing hypertension on the synthesis and accumulation of elastin in the aorta of the rat. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 64, p. 38-43, 1986.

KHUNDMIRI, S. J. et. al. Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 293, p. C1171–C1180, 2007.

KIMURA, K. et al. Different effects of in vivo ouabain and digoxin on renal artery function and blood pressure in the rat. **Hypertens. Res.**, v. 23, p. S67-S76, 2000.

KIRITOSHI, S. et. al. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 2570–2577, 2003.

KOMETIANI, P. et. al. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15249–15256, 1998.

KORSGAARD, N.; MULVANY, M. J. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. **Hypertension**, v. 2, p. 162-167, 1988.

KOTOVA, O. et. al. Metabolic and signaling events mediated by cardiotonic steroid ouabain in rat skeletal muscle. **Cell. Mol. Biol.**, v. 52, p. 48–57, 2006.

KUKREJA, R. C. et al. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. **Circ. Res.**, v. 59, p. 612-619, 1986.

KULIKOV, A. et. al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1768, p. 1691–1702, 2007.

- LA, J. et al. Regulation of myofibroblast differentiation by cardiac glycosides. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, p. ajplung. 00322.2015, 2016.
- LACCHINI, S.; IRIGOYEN, M.C. Estrutura e função do sistema cardiovascular. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2008, p. 377-384.
- LACOLLEY, P. et. al. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. **Circulation**, v. 106, p. 2848-2853, 2002.
- LAREDO, J. et. al. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 135, p. 794–797, 1994.
- LAREDO, J. et. al. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 212, p. 487–493, 1995.
- LEE, C. O. 200 years of digitalis: the emerging central role of the sodium ion in the control of cardiac force. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 249, p. C367–C378, 1985.
- LEE, R. M. K. W. et al. Ultrastructural changes in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **Blood. vessels.**, v. 20, p. 72-91, 1983
- LEFAIX, J. L. et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using CuZn SOD and Mn SOD: An experimental study. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 35, p. 305–312, 1996.
- LI, J. S. et al. Effects of endotheli antagonism on blood pressure and vascular struture in renovascular hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 40, p. h88-h93, 1996.
- LI, Y. et al. Angiotensin (1– 7) prevent heart dysfunction and left ventricular remodeling caused by renal dysfunction in 5/6 nephrectomy mice. **Hypertension Research**, v. 32, n. 5, p. 369-374, 2009.
- LI, Y.B. et. al. Selenium inhibits high glucose-induced cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, p. 2301–2306, 2011.
- LIANG, M. et. al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 10585–10593, 2007.
- LIJNEN, P. et. al. Angiotensin li-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. **J. Hypertens.**, v. 24, p. 757–766, 2006.
- LIJNEN, P. et. al. Inhibition of superoxide dismutase induces collagen production in cardiac fibroblasts. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, p. 1129–1136, 2008.
- LINGEL, J. B. The physiological significance of the cardiotonic sterpoids/ ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 72, p. 395-412, 2010.
- LINGEL, J. B. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 24, p. 263–270, 1992.
- LINGREL, J. B. et. al. Functional roles of the alpha isoforms of the Na,K-ATPase. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 986, p. 354–359, 2003.
- LINGREL, J. B. et. al. Ligand binding sites of Na,K-ATPase. **Acta. Physiol. Scand. Suppl.**, v. 643, p. 69–77, 1998.
- LIU, J. et. al. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 27838–27844, 2000.
- LIU, J.; XIE, Z.J. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1802, p. 1237–1245, 2010.

- LIU, L. et al. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na/K-ATPase. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 284, p. C1550–C1560, 2003.
- LIU, T.; FENG, X. H. Regulation of TGFbeta signalling by protein phosphatases. **Biochem. J.**, v. 430, p.191-198, 2010.
- LOKUTA, A. J. et al. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 7, p. 4832-4838, 1994.
- LOREAUX, E. L. et al. Ouabain-Sensitive alpha1 Na,K-ATPase enhances natriuretic response to saline load. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 19, p. 1947–1954, 2008.
- MALTA, D. C. et al. Doenças crônicas não transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. *Saúde Brasil 2008*, 337-362. 2009.
- MANUNTA, P. et al. A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor (abstract P36). **J. Hypertens.**, v. 10 p. S27, 1992.
- MANUNTA, P. et al. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. **J. Hypertens.**, v. 12, p. 549–560, 1994.
- MANUNTA, P. et al. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease. **J. Hypertens.**, v. 27, p. 09–18, 2009.
- MANUNTA, P. et al. Endogenous ouabain in renal Na⁺ handling and related diseases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1802, p. 1214–1218, 2010.
- MANUNTA, P. et al. Structure–activity relationship for the hypertensinogenic activity of ouabain: role of the sugar and lactone ring. **Hypertension**, v. 37, p. 471–477, 2001.
- MARCHON, C. et al. Effects of moderate exercise on the biochemical, physiological, morphological and functional parameters of the aorta in the presence of estrogen deprivation and dyslipidemia: an experimental model. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 35, p. 397-405, 2015.
- MÁRQUEZ-MARTÍN, A. et al. Middle cerebral artery alterations in a rat chronic hypoperfusion model. **J. Appl. Physiol. (1985).**, v. 112, p. 511-518, 2012.
- MARTÍN, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. **J. Hypertens.**, v. 30, p. 315–326, 2012.
- MARTINEZ-LEMUS, L. A. et al. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. **Physiology**, v. 24, p. 45-57, 2009.
- MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 18, p. 51-65, 2013.
- MASON, D. T.; BRAUNWALD, E. Studies on Digitalis. X. Effects of ouabain on forearm vascular resistance and venous tone in normal subjects and in patients in heart failure. **J. Clin. Invest.**, v. 43, p. 532–543, 1964.
- MASUGI, F. et al. Circulating factor with ouabain-like immunoreactivity in patients with primary aldosteronism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 135, p. 41-45, 1986.
- MASUGI, F. et al. Normalization of high plasma level of ouabain-like immunoreactivity in primary aldosteronism after removal of adenoma. **J. Jpn. Hypertens.**, v. 2, p. 17-20, 1988.
- MATHWES, W. R. et al. Mass spectral characterization of an endogenous digitalislike factor from human plasma. **Hypertension**, v. 17, p. 930–935, 1991.

- MCDONOUGH, A. A, et. al. The cardiac sodium pump: structure and function. **Basic. Res. Cardiol.**, v.97, p. I19 –I24, 2002.
- MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 292, p. C82-C97, 2007.
- MICHELINI, L. C. Regulação da pressão arterial: mecanismos neuro-hormonais. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2008. p. 571-593.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS: Informações de Saúde. Mortalidade, 2013. Disponível na internet: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def> Acesso em: 25 de Janeiro de 2016
- MOBASHERI, A. et. al. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Biosci. Rep.**, v. 20, p. 51–91, 2000.
- MONTERO, A. Effect of ouabain and hypothalamic, hypophysary inhibitory factor on rat mesangial cell proliferation. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 22, p. S35–S37, 1993.
- MONTEZANO, A. C.; AURELIE NGUYEN DINH CAT, A.; RIOS, F. J.; TOUYZ, R. M. Angiotensin II and Vascular Injury. **Curr. Hypertens.**, Rep., v. 16, p. 1-11, 2014.
- MORTH. J. P. et. al. A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H-ATPase ion pumps. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 12, p. 60–70, 2011.
- MORTH. J. P. et. al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. **Nature**, v. 450, p.1043–1049, 2007.
- MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J. mol. cell cardiol.**, v. 42, n. 2, p. 271-279, 2007.
- MÜLLER-EHMSSEN, J. et al. Longer term effects of ouabain on the contractility of rat isolated cardiomyocytes and on the expression of Ca and Na regulating proteins. **Basic res. Cardiol.**, v. 98, n. 2, p. 90-96, 2003.
- MULVANY, M. J. Determinants of vascular hemodynamics characteristics. **Hypertension**, v. 6, p. 13-18, 1984.
- MULVANY, M. J. et al. Vascular remodeling. **Hypertension**, v. 28, p. 505–506, 1996.
- MULVANY, M. J. Resistance vessel growth and remodeling: cause or consequence in cardiovascular disease? **J. Hum. Hypertens.**, v. 9, p. 479–485, 1995.
- MULVANY, M. J. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. **J. Vasc. Res.**, v. 6, p. 558-560, 2003.
- MULVANY, M. J. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? **Cardiovasc. Res.**, v. 1, p. 09-13, 1999.
- MULVANY, M. J.; HANSEN, P. K.; AALKAJAER, C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. **Circ. Res.**, v. 6, p. 854-864, 1978.
- MULVANY, M. J.; KORSGAARD, N. Correlations and otherwise between blood pressure, cardiac mass and resistance vessel characteristics in hypertensive, normotensive and hypertensive/normotensive hybrid rats. **J. Hypertens.**, v. 3, p. 235-44, 1983.
- MULVANY, M. J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v. 46, p. 461-467, 2008.

- MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ. Res.**, v. 1, p. 19-26, 1977.
- MURATA, Y. et. al. Ouabain-induced cell proliferation in cultured rat astrocytes. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 72, p. 347–353, 1996.
- MUZAFFAR, S. et. al. Iloprost inhibits superoxide formation and gp91phox expression induced by the thromboxane A2 analogue U46619, 8-isoprostane F2 α , prostaglandin F2 α , cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. **Br. J. Pharmacol.**, v.141, p. 488–496, 2004.
- MUZAFFAR, S. et. al. NADPH oxidase 1 mediates upregulation of thromboxane A2 synthase in human vascular smooth muscle cells: inhibition with iloprost. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 658, p.187–192, 2011.
- MUZAFFAR, S. et. al. Superoxide from NADPH oxidase upregulates type 5 phosphodiesterase in human vascular smooth muscle cells: inhibition with iloprost and NONOate. **Br. J. Pharmacol.**, v. 155, p. 847–856, 2008.
- NAKAMURA, K. et. al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. **Circulation**, v. 98, p. 794–799, 1998.
- NESHER, M. et. al. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 297, p. H2026–H2034, 2009.
- NGUYEN, G. et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J. Clin. Invest.**, v. 109, n. 11, p. 1417-1427, 2002.
- NØRRELUND, H. et al. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. **Hypertension**, v. 24, p. 301-308, 1994.
- O'BRIEN, W. J. et. al. Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v 310, p. 32–39, 1994.
- ODENBACH, J. et. al. MMP-2 mediates angiotensin II-induced hypertension under the transcriptional control of MMP-7 and TACE. **Hypertension**, v. 57, p. 123-130, 2011.
- OHNAKA, K. et al. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 35, p. 68-75, 2000.
- OLIVEIRA, H. T. Avaliação da reatividade em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao tratamento crônico com ouabaína: Avaliação dos possíveis mecanismos envolvidos [Tese]. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013
- ONAL, I. K. et al. Serum levels of MMP-9 and TIMP-1 in primary hypertension and effect of antihypertensive treatment. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 20, p. 369-372, 2009.
- ORLOV, S. N. et. al. Na/K pump and endothelial cell survival: [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of [Na⁺]_i. **Pflug. Arch. Eur. J. Phy.**, v. 448, p. 335–345, 2004.
- OTANI, A. et. al. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 82, p. 619–628, 1998.
- OVERBECK, H. W. et al. Depressed function of a ouabain-sensitive sodium-potassium pump in blood vessels from renal hypertensive dogs. **Circ. Res.**, v. 38, p. 48–52, 1976.
- PADILHA, A. S. et al. Ouabain at nanomolar concentration promotes synthesis and release of angiotensin II from the endothelium of the tail vascular bed of spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 3, p. 372-380, 2004.

- PADILHA, A. S. et al. Chronic ouabain treatment enhances cardiac myosin ATPase activity in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 7, p. 801-806, 2008.
- PADILHA, A. S. et al. Ouabain treatment changes the role of endothelial factors in rat resistance arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 600, p. 100–116, 2008.
- PARDO, A. et al. Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications. **Am. J. pathol**, v. 153, n. 3, p. 833-844, 1998.
- PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, p. 153–159, 2003.
- PENG, J. et. al. Tumor necrosis factor- α -induced AT receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblasts responses that favor fibrosis. **Circ. Res.**, v.91, p. 1119–1126, 2002.
- PENG, T. et. al. NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. **FASEB. J.**, v. 19, p. 293–295, 2005.
- PIERDOMENICO, S. D. et al. Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 14, p. 44–50, 2001.
- PIERRE, S. V.; XIE, Z. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. **Cell. Biochem. Biophys.**, v. 46, p. 303–316, 2006.
- POPOVIC, N. et al. Transforming growth factor- β signaling in hypertensive remodeling of porcine aorta. **Am. J. Physiol Heart. Circ. Physiol.**, v. 297, p. H2044-H2053, 2009.
- POURAGEAUD, F.; DE MEY, J.G. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. **Am. J. Physiol.**, v.273, p. H1699-H1706, 1997.
- PU, Q. et al. Endothelin antagonist on aldosterone-induced oxidative and vascular remodeling. **Hypertension**, v. 42, p. 49-55, 2003.
- QI, Z. et al. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 61-69, 2002.
- QIU, J. et al. Proteomics investigation of protein expression changes in ouabain induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 104, n. 3, p. 1054-1064, 2008.
- QUINTAS, L. E. M. et al. Alterations of Na⁺/K⁺-ATPase function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 49, n. 3, p. 525-531, 2010
- RADI, Z. A. Pathophysiology of cyclooxygenase inhibition in animal models. **Toxicol. Pathol.**, v. 37, p. 34–46, 2009.
- RAFFETO, J.D.; KHALIL, R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 346-359, 2008.
- RHODIN, J. A. G. Architecture of the vessel wall. In: BERNE, R.M. et al. **Handbook of physiology: The cardiovascular system. Vascular smooth muscle.** Bethesda, Md.: Am. Physiological Society, 1980. sect. 2, v.2, chapt. 1, p.01-31.
- RIGANTI, C. et. al. Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 872–885, 2011.
- RIZZONI, D. et al. Changes in extracellular matrix in subcutaneous small resistance arteries of patients with primary aldosteronism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, p. 2638-2642, 2006
- ROSENDORF, C. Endothelin, Vascular Hypertrophy, and Hypertension. **Cardiovasc. Drug. Ther.**, v. 10, p. 795-802, 1996.

- ROSSI, G. et al. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels. **J. Hypertens.**, v.13, p. 1181–1191, 1995.
- ROSSONI, L. V. et al. Alterations in vascular reactivity to phenylephrine and Na⁺, K⁺-ATPase activity and expression in hypertension induced by chronic administration of ouabain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 135, p. 771–781, 2002a.
- ROSSONI, L. V. et al. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. **Life. Sci.**, v. 79, p. 1537-45, 2006.
- ROSSONI, L. V. et al. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. **Am. J. Physiol.**, v. 283, p. H2110–H2118, 2002b.
- SANO, H. et. al. Increased angiotensin II-stimulated collagen synthesis in cultured cardiac fibroblasts from spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 84, p. 1148, 1991.
- SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003.
- SANTOS, R. A. Angiotensin-(1–7). **Hypertension**, v. 63, n. 6, p. 1138-1147, 2014.
- SAPIA, L. et al. Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 49, n. 3, p. 459-468, 2010
- SCHAFER, A. L. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 35, p. 209-219, 1995.
- SCHELLING, P. et. al. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? **J. Hypertens.**, v. 1, p. 3-15, 1991.
- SCHIFFRIN, E. L. Resistance arteries as endpoints in hypertension. **Blood. Press.**, v. 2, p. 24-30, 1997.
- SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 287, p. H435-H446, 2004.
- SCHIRNER, M.; TAUBE, C. Different effects of aspirin on blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) with high and spontaneously low levels of blood pressure. **Br. J. Pharmacol.**, v. 4, p. 900-901, 1993.
- SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **Am. J. Cardiovasc. Drugs.**, v. 7, p. 173–189, 2007a.
- SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. **Am. J. Physiol.**, v. 293, p. C509–C536, 2007b.
- SCHULTE, K. L. et al. Ouabain-induced elevation in forearm vascular resistance, calcium entry and alpha-adrenoceptor blockade, and release and removal of noradrenaline. **J. Hypertens.**, v. 5, p. S215–S218. 1987.
- SEALEY, J. E.; LARAGH, J. H. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: IN LARAGH, J. M.; BRENNER, B. M. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management**. New York: Raven. Press., p. 1287-1317, 1990.
- SHEPHERD, J. T. Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. **J. Hypertens.**, v. 8, p. S15-S17, 1990.

SIWIK, D. A. et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. **Circ. Res.**, v. 85, p. 147–153, 1999.

SKOU, J.C. The identification of the sodium pump. **Biosci. Rep.**, v. 24, p. 436–451, 2004.

SMEDA, J.S. et. al. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. **Circ. Resp.**, v. 63, p. 518-533, 1988.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH V. **Arq Bras Cardiol.** v. 89. p. 1 - 48, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH VI. **Rev. Bras. Hipertens.** v. 17. p. 4 – 60, 2010.

STACK, E.; DUBOIS, R. N. Regulation of cyclo-oxygenase-2. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 15, n. 5, p. 787-800, 2001

STECKELINGS, U. M. et al. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 11. P. 67 – 73, 2009.

STELLA, P. et. al. Endogenous ouabain and cardiomyopathy in dialysis patients. **J. Intern. Med.**, v. 263, p. 274–280, 2008.

STEPHANOU, B. K. et. al. Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 10002-10008, 2000.

SU, E. J. et. al. Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor. **Circ. Res.**, v. 82, p. 321–327, 1998.

SUN, Y. et. al. Angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 122, p. 395–403, 1993.

SWEADNER, K. J. Isozymes of the Na⁺/ K⁺ -ATPase. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 988, 185 – 220, 1989.

SWEADNER, K. J. Multiple digitalis receptors. A molecular perspective. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 3, p. 2–6, 1993.

SWEADNER, K. J. Overview: subunit diversity in the Na,K-ATPase. **Soc. Gen. Physiol. Ser.**, v. 46, p.63–76, 1991.

SZNAJDER, J.I. et. al. Invited review: lung edema clearance: role of Na⁺-K⁺-ATPase. **J. Appl. Physiol.**, v. 93, p. 1860–1866, 2002.

TAMURA, M. et al. Ouabain increases aldosterone release from bovine adrenal glomerulosa cells: role of renin-angiotensin system. **Am. J. Physiol. Endocrinol Met.**, v. 270, n. 1, p. E27-E35, 1996.

TAYEBJEE, M.H. et. al. Extracellular matrix biology ogy: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? **J. Hypertension.**, v. 21, p. 2211-2218, 2003.

TIMMERMANS, P.B. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 205-251, 1993.

TIPNIS, S.R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000.

TOUYZ, R. M. Molecular ad cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.14, p. 125-131, 2005.

- TREVISI L. et. al. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. **FEBS. Lett.**, v. 580, p. 2769–2773, 2006.
- TUTTLE, R. S.; YAGER, J.; NORTHRUP, N. Age and the antihypertensive effect of aspirin in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 3, p. 755-758, 1988.
- VANHOUTTE, P. M. Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension? **Hypertension**, v. 21, p. 747-751, 1993.
- VIEL, E.C. et. al. . Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 298, p. H938–H944, 2010.
- VILLARREAL, F.J. et. al. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. **Circulation**, v. 88, p. 2849–2861, 1993.
- VIRDIS, A et al. Endothelial Dysfunction in Small Arteries of Essential Hypertensive Patients Role of Cyclooxygenase-2 in Oxidative Stress Generation. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 337-344, 2013.
- VIRDIS, A. et al. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. **Hypertension**, v. 53, p. 1008-1016, 2009.
- VIRDIS, A. et al. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused mice: effects of cyclooxygenase-1 inhibition. **Eur. Heart. J.**, v. 23, p. 2225-2234, 2011.
- VIRDIS, A. et al. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **J. Hypertens.**, v. 22, p. 535-542, 2004.
- VOZENIN-BROTTONS, M. C. et. al. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF- β 1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 30, p. 30–42, 2001.
- WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 957-989, 2009.
- WALLICK, E. T. et. al. Recent advances in cardiac glycoside- Na^+ , K^+ -ATPase interaction. **Fed. Proc.**, v. 36, p. 2214–2218, 1977.
- WALMSLEY, J. G. et. al. Medial morphometry and mechanics of sequential rabbit ear arteries and myograph ring segments. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. H840-H848, 1983.
- WALTERS, P. E.; GASPARI, T. A.; WIDDOP, R. E. Angiotensin-(1–7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 960-966, 2005.
- WANG, H. D. et. al. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. **Circ. Res.**, v. 88, p. 947–953, 2001.
- WELCH, W. J. et al. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1, AT2, and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 293, H2644-H2649, 2007.
- WENCESLAU, C. F. et al. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. **J. Vasc. Res.**, v. 48, p. 316-326, 2011.
- WILLIAMS, C. S. et. al. The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer, and development. **Oncogene**, v. 18, p. 7908-7916, 1999.
- WOLF, G. et. al. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultural murine mesangial cells. **Am. J. Pathol.**, v. 140, p. 095–107. 1992;

WOLF, G.; WENZEL, U. O. Angiotensin II and Cell Cycle Regulation. **Hypertension**, v. 43, p. 693–698, 2004.

WONG, J. et. al. Angiotensin-converting enzyme inhibition abolishes medial smooth muscle PDGF-AB biosynthesis and attenuates cell proliferation in injured carotid arteries: relationships to neointima formation. **Circulation**, v. 96, p. 1631–1640, 1997.

WONG, S. L. et al. Pivotal role of protein kinase Cdelta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, p. 1169-1176, 2011.

WU, R. et. al. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 3, p. 387-392, 2002.

WU, R. et. al. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. **Hypertension**, v. 45, p. 1139-1144, 2005.

XAVIER, F. E. Alterações Funcionais e Estruturais em Artérias de Resistência de Ratos com Hipertensão Induzida por Ouabaína: Efeito do tratamento anti-hipertensivo com losartan [Tese]. Universidade Federal do Espírito Santo. 2005

XAVIER, F. E. et al. Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: the role of vascular mechanisms. **J. Hypertens.**, v. 27, p. 1233-1242, 2009

XAVIER, F. E. et al. Contribution of the endothelin and renin–angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, p. 794–802, 2004a.

XAVIER, F. E. et al. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in α -adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, p. 215-225, 2004c.

XAVIER, F.E. et al. Neurogenic nitric oxide release increases in mesenteric arteries from ouabain hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 22, p. 949–957, 2004b.

XIE, Z. et al. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺-K-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 19323-19328, 1999.

XIE, Z., CAI, T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. **Mol. Interv.**, v. 3: p. 157–168, 2003.

XU, J.W. et. al. Signal pathways in ouabain-induced proliferation of leukemia cells. **World. J. Pediatr.**, v. 5: p. 140–145, 2009.

YAMADA, K. et. al. Elevation of ouabainlike compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. **Hypertension**, v. 30, p. 94–98, 1997.

YAN, Y. et. al. Ouabain-stimulated trafficking regulation of the Na,K-ATPase and NHE3 in renal proximal tubule cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 367, p. 175–183, 2012.

YE, Q. et. al. Identification of a potential receptor that couples ion transport to protein kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p.6225–6232, 2011.

YU, W. et al. Protective effect of the silkworm protein 30Kc6 on human vascular endothelial cells damaged by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL). **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e68746 (1-11), 2013.

YUAN, L. et al. Ang (1–7) protects islet endothelial cells from palmitate-induced apoptosis by AKT, eNOS, p38 MAPK, and JNK pathways. **J. Diabetes Res.**, v. 2014, p.1-10. 2014

ZHANG, J. et al. Low-dose ouabain constricts small arteries from ouabain-hypertensive rats: implications for sustained elevation of vascular resistance. **Am. J. Physiol Heart. Circ. Physiol.**, v. 297, p. H1140-H1150, 2009.

ZHANG, J.; LEENEN, F. H. H. AT(1) receptor blockers prevent sympathetic hyperactivity and hypertension by chronic ouabain and hypertonic saline. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. H1318-H1323, 2001.

ZHAO, Q. et. al. Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling. **Hypertension**, v. 44, p. 264-270, 2004.

ZHOU, G. et. al. Regulation of alveolar epithelial function by hypoxia. **Eur. Respir. J.**, v. 31, p. 1107-1113, 2008.

ZHOU, M.; JAIMES, E. A.; RAIJ, L. Vascular but not cardiac remodeling is associated with superoxide production in angiotensin II hypertension. **J. hypertens.**, v. 23, n. 9, p. 1737-1743, 2005.