HELANE SANTOS TITO DE OLIVEIRA

**Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas
de resistência de ratos espontaneamente hipertensos
submetidos ao tratamento crônico com ouabaína**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD) da USP.

São Paulo
2013

RESUMO

Oliveira HT. Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao tratamento crônico com ouabaína. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O tratamento crônico de ratos normotensos e/ou espontaneamente hipertensos (SHR) com ouabaína (OUA) é capaz de induzir hipertensão arterial (HA) ou elevar os níveis pressóricos desses animais, respectivamente. Nos SHR a HA adicional induzida pela administração crônica de OUA está associada ao aumento da sensibilidade à fenilefrina em anéis de artéria caudal. Assim, considerando que alterações no estado contrátil dos vasos de resistência são importantes para regulação da pressão arterial, o objetivo desse estudo foi avaliar se o tratamento crônico com OUA é capaz de modificar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de SHR e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos. SHR com 45 dias de vida foram submetidos ao tratamento por cinco semanas com: veículo (CT, N=39) ou OUA (30 µg/kg/dia, sc, N=42); adicionalmente, grupos CT e OUA foram co-tratados com ácido acetilsalicílico (AAS, 100 mg/kg/dia, gavagem) constituindo os grupos CT-AAS (N=18) e OUA-AAS (N=16); ou nimesulida (NID, 20 mg/Kg/dia, gavagem) formando os grupos CT-NID (N=11) e OUA-NID (N=10). Durante os tratamentos, a pressão arterial caudal (PAC) foi medida semanalmente por pletismografia de cauda. Ao final do tratamento, mediante eutanásia, o leito mesentérico foi removido e os terceiros ramos da artéria mesentérica foram dissecados e montados em um miógrafo de arame. A técnica de *Western-blot* foi utilizada para avaliar a expressão protéica da sintase de óxido nítrico (NOS) endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) (* $p < 0,05$, Teste *t*). O tratamento com OUA elevou a PAC dos SHR (CT: $171 \pm 1,7$ vs. OUA: $184 \pm 3,3^*$ mmHg). A resposta contrátil à noradrenalina (NOR, 10^{-7} M - 30μ M) foi avaliada na ausência e na presença de L-NAME (100 µM), um inibidor da NOS; de indometacina (INDO, 10μ M), um inibidor da ciclooxigenase 1/2 (COX 1/2), do furagrelato (FURA, 10μ M), um inibidor da sintase do tromboxano A_2 (TXA $_2$), do SQ 29,548 (1 µM), um antagonista do receptor de TXA $_2$, dentre outros fármacos. Na ausência dos inibidores, a contração induzida pela NOR foi maior nas AMR dos animais tratados com OUA quando comparado aos CT (CT: $3,70 \pm 0,10$ vs. OUA: $4,12 \pm 0,07^*$ mN/mm). A incubação com L-NAME aumentou a reatividade à NOR nos dois grupos. Porém, a magnitude desse aumento foi menor nas AMR do grupo OUA. Na presença de INDO, FURA e SQ 29,548 a contração à NOR foi reduzida apenas nas AMR do grupo OUA. A expressão protéica da eNOS (32%*) e da nNOS (36%*) foram reduzidas nas AMR no grupo OUA. Os tratamentos com AAS e NID preveniram o aumento na PAC e na reatividade à NOR nas AMR dos SHR tratados com OUA; sugerindo que, nesse modelo, as alterações pressóricas e vasculares são mediadas por produtos da COX-2. Esse aumento da resposta contrátil das AMR à NOR deve-se a uma redução da modulação nitrérgica, via redução da síntese de NO, e a um aumento da vasoconstrição mediada pelo TXA $_2$ via COX-2. Assim, o aumento da pressão arterial observado em SHR tratados com ouabaína por cinco semanas é decorrente do prejuízo da modulação endotelial em artérias mesentéricas de resistência.

Palavras-chave: Hipertensão. Ouabaína. Endotélio vascular. Disfunção endotelial. Artérias mesentéricas de resistência.

ABSTRACT

Oliveira HT. Evaluation of the vascular reactivity in mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats submitted to chronic ouabain treatment. [Ph. D. thesis (Doctoral in Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Chronic treatment of normotensive and/or spontaneously hypertensive rats (SHR) with ouabain (OUA) induces arterial hypertension or raising blood pressure levels in these animals, respectively. Additionally, in SHR, hypertension induced by chronic administration of OUA is associated with an increased sensitivity to phenylephrine in caudal artery rings. Thus, whereas changes in the contractile state of resistance vessels are important for blood pressure regulation, the aim of this study was to evaluate whether chronic treatment with OUA is able to modify vascular reactivity in mesenteric resistance arteries (MRA) of SHR and assess the possible mechanisms involved. Thus, male, SHR at 45 days old were treated for five weeks with: vehicle (CT, N=39) or OUA (30 mg/kg/day, sc, N=42); additionally CT and OUA groups were co-treated with acetylsalicylic acid (ASA 100 mg/kg/day, gavage) constituting CT-ASA (N=18) and OUA-ASA (N=16) groups; or nimesulide (NID 20 mg/kg/day, gavage) forming CT-NID (N=11) and OUA-NID (N=10) groups. During this period, the caudal blood pressure (BP) was measured weekly by the tail cuff method. At the end of treatment, after euthanasia, mesenteric bed was removed and third branches of the superior mesenteric artery were dissected and mounted on a wire myograph. Western blot technique was used to evaluate the protein expression of nitric oxide synthase (NOS), endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) (* $p < 0.05$, t -Test). At the end of the treatment BP was higher in the OUA group (CT: 171 ± 1.7 vs. OUA: $184 \pm 3.3^*$ mmHg). The contractile response to norepinephrine (NOR $10 \mu\text{M}$ - $30 \mu\text{M}$) was evaluated in the presence and absence of L-NAME ($100 \mu\text{M}$), a NOS inhibitor, indomethacin (INDO $10 \mu\text{M}$), an inhibitor the cyclooxygenase1/2 (COX1/2), furegrelate (FURE $10 \mu\text{M}$), an inhibitor of thromboxane synthase A_2 (TXA₂), SQ 29.548 ($1 \mu\text{M}$), an antagonist of TXA₂ receptor, among other drugs. In the absence of inhibitors, the NOR-induced contraction was higher in the MRA of OUA treated animals compared as to CT (CT: 3.70 ± 0.10 vs. OUA: $4.12 \pm 0.07^*$ mN/mm). The incubation with L-NAME increased the NOR-induced contraction in the MRA of both groups. However, the magnitude of this increase was lower in the MRA of OUA group. In the presence of INDO, FURE and SQ 29.548 the contraction evoked by NOR was reduced only in the MRA of OUA group. The protein expression of eNOS (32%*) and nNOS (36%*) were reduced in the MRA of OUA group. Co-treatment with ASA and NID prevented the increase in BP and in reactivity to NOR in MRA of SHR treated with OUA, suggesting that, vascular and pressure changes are mediated by products of COX-2. This increase in contractile response of the NOR in MRA of OUA treated SHR is due to a reduction in the nitrergic modulation, through reduction of NO synthesis; and an increase in vasoconstriction mediated by TXA₂ via COX-2. Thus, increased blood pressure observed in SHR treated with ouabain for five weeks is due to the impairment of endothelial modulation in MRA.

Keywords: Hypertension. Ouabain. Vascular endothelium. Endothelial dysfunction. Mesenteric resistance arteries.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados ($\geq 140/90$ mmHg) e sustentados da pressão arterial. O diagnóstico da hipertensão arterial é realizado quando a média de duas ou mais medidas da pressão arterial diastólica é $\geq$ a 90 mmHg ou quando a média de múltiplas medidas da pressão arterial sistólica é consistentemente ≥ 140 mmHg. Atualmente, a pressão arterial humana é classificada como: Normal ($<120/80$ mmHg); Pré-hipertensão ($120-139/80-89$ mmHg); Hipertensão Estágio 1 ($140-159/90-99$ mmHg) e Hipertensão Estágio 2 ($\geq 160/\geq 100$ mmHg) (U.S. Department of Health and Human Services, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde a maior proporção de mortes por doenças não transmissíveis, dentre elas a hipertensão arterial, é causada pelas doenças cardiovasculares (48%). Projeta-se que o número de mortes por esse tipo de doença irá aumentar de 17 milhões em 2008 para 25 milhões em 2030. Associado a esse fato, dentre os fatores de risco mundiais para mortalidade, a pressão arterial elevada ou hipertensão arterial representa a maior porcentagem de mortes (12,8%). Estima-se que esta doença seja responsável por 51% das mortes por acidente vascular cerebral e 45% das mortes por doença coronária (World Health Organization, 2012).

No Brasil, a hipertensão arterial é a doença de maior prevalência (23,3%). E as doenças do aparelho circulatório, como a hipertensão arterial, representam a maior causa de mortalidade ($\sim 30\%$). A hipertensão arterial é o maior fator de risco para outras doenças cardiovasculares. Nesse sentido, a taxa de internação por doenças hipertensivas (6,91%), doenças isquêmicas do coração (11,63%) e acidente vascular cerebral (8,8%) somam aproximadamente 27% de todas as internações realizadas em hospitais do SUS (Ministério da Saúde, 2011).

Dentre os pacientes hipertensos, a hipertensão arterial essencial ou primária abrange aproximadamente 90% dos indivíduos; sua etiologia ainda é desconhecida (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010) e apesar dos importantes avanços no diagnóstico e tratamento, essa doença continua sendo um dos fatores de risco mais importantes para outras doenças cardiovasculares como o infarto do

miocárdio, a insuficiência cardíaca, o acidente vascular cerebral, dentre outras (Kaplan, 1998).

É importante ressaltar que, a hipertensão arterial essencial humana e os vários modelos animais de hipertensão arterial apresentam resistência vascular periférica elevada (Lund-Johansen, 1983; Shepherd, 1990). A resistência periférica é determinada principalmente pela região distal da vasculatura arterial: os vasos de resistência. Eles consistem das pequenas artérias, com diâmetro inferior a 300 μm , e das arteríolas que possuem diâmetro menor que 30 a 50 μm (Mulvany, Aalkjær, 1990).

Assim, na hipertensão arterial, os principais fatores que contribuem para diminuição no diâmetro dos vasos de resistência são: as alterações estruturais (remodelamento muscular e alterações mecânicas da parede arterial) e funcionais (modificações no tônus do músculo liso vascular) da parede arterial (Schiffrin, 1997). Nesta doença, o tônus do músculo liso vascular pode aumentar em decorrência da disfunção endotelial; uma condição que corresponde a um desequilíbrio entre os fatores endoteliais vasodilatadores (óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e vasoconstritores (endotelina-1, prostanoídes derivados do ácido araquidônico, angiotensina II, espécies reativas de oxigênio, dentre outros) em favor do aumento da resposta contrátil (Silva et al., 2012; Tang, Vanhoutte, 2010; Virdis et al., 2010).

O estudo da função vascular preconiza a avaliação das funções vasodilatadora e vasoconstritora. Nesse sentido, a disfunção endotelial na doença vascular hipertensiva apresenta, geralmente, um prejuízo da resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina e pela bradicinina (Briones et al., 2003; Giachini et al., 2009; Lüscher, Vanhoutte, 1986; Mori et al., 2006; Panza et al., 1995; Taddei et al., 1997; Virdis et al., 2009); assim como, observa-se um aumento da resposta contrátil e da sensibilidade do músculo liso vascular a agonistas vasoconstritores (Dohi et al., 1996; Lograno et al., 1989; Mulvany et al., 1980; Mulvany, Halpern, 1977).

Na hipertensão arterial, a redução na função vasodilatadora dependente do endotélio resulta geralmente de uma menor biodisponibilidade do óxido nítrico. Esse fator encontra-se reduzido devido a uma menor produção, ou inativação pela maior produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (Fulton et al., 1999; Li et al., 2006; Varizi et al., 1998). No entanto, na hipertensão arterial também se observa

uma maior produção de substâncias vasoconstritoras, dentre elas, destacam-se os prostanóides vasoconstritores produzidos pela enzima ciclooxygenase (COX) endotelial, especialmente o tromboxano A₂ (TXA₂) e a prostaglandina H₂ (PGH₂) (Alvarez et al., 2005; Tang et al., 2007). Além disso, a COX endotelial está envolvida na produção de espécies reativas derivadas do oxigênio, que também agem como um fator contrátil produzido pelo endotélio (Auch-Schwelk et al., 1989; Katusic, Vanhoutte, 1989; Viridis et al., 2013; Yang et al., 2002).

A hipertensão arterial também modifica a atividade da Na⁺K⁺-ATPase do músculo liso vascular (Blaustein, 1993; Bohr, Webb, 1984; dos Santos et al., 2003; Folkow, 1982; Liu, Songu-Mize, 1997; Marín, Redondo, 1999; Rossoni et al., 2003). Cabe ressaltar que, a inibição da atividade dessa enzima por compostos digitálicos está relacionada ao aumento do tônus vascular em vários leitos vasculares (Marín et al., 1988; Sato, Aoki, 1988; Toda, 1980; Wallick et al., 1982).

1.1.1 Ouabaína

Há aproximadamente 35 anos foi descoberto que um inibidor endógeno da Na⁺K⁺-ATPase poderia inibir a reabsorção renal de Na⁺ e promover natriurese (Haddy, Overbeck, 1976). E esse inibidor ou *ouabain like compound* (OLC) também poderia aumentar o tônus vascular (de Wardener, MacGregor, 1980), elevar a pressão arterial e produzir hipertensão arterial (Blaustein 1977; MacGregor et al., 1981). O OLC foi purificado no plasma e no hipotálamo humanos e em adrenais bovinas, e uma análise apurada revelou que esse componente era a ouabaína (Hamlyn et al., 1991; Kawamura et al., 1999; Schneider et al., 1998).

A inibição da Na⁺K⁺-ATPase pelos compostos digitálicos, dentre eles a ouabaína, produz um aumento na concentração intracelular de Na⁺ (Blaustein, 1988; Goto et al., 1992); esse íon inibe a atividade do trocador Na⁺/Ca⁺², aumentando a concentração intracelular de Ca⁺² e a sua recaptação para o retículo sarcoplasmático (Blaustein, 1993; Borin et al., 1994). A maior concentração de Ca⁺² no retículo sarcoplasmático disponibiliza maior quantidade desse íon durante a contração vascular contribuindo para elevação do tônus vascular. Trabalhos demonstraram que as subunidades α2/α3 da Na⁺K⁺-ATPase e o trocador Na⁺/Ca⁺² estão em um microdomínio específico da membrana cuja sinalização permite as baixas concentrações de ouabaína promoverem sinalização para o Ca⁺² (Arnon et

al., 2000; Golovina et al., 2003a,b; Juhaszova, Blaustein 1997; Moore et al., 1993; Zhang et al., 2005). Esta sinalização caracteriza-se como oscilações de Ca^{+2} com diferentes frequências. Mais importante, as oscilações de Ca^{+2} de baixa frequência ativam a via do NF- κ B protetora de apoptose celular (Aizman et al., 2001; Zhang et al., 2006).

Atualmente sabe-se que a Na^+K^+ -ATPase além de transportador iônico, é um receptor transdutor de sinal para cardiotônicos esteróides endógenos e exógenos, e uma proteína de ancoramento capaz de organizar microdomínios específicos de sinalização celular (Blanco, Mercer 1998; Haas et al., 2000; Huang et al., 1997; Xie, Askari 2002; Xie, Cai 2003). Os cardiotônicos esteróides em concentrações que não causam inibição significativa da atividade de bomba, são capazes de ativar o complexo receptor caveolar Na^+K^+ -ATPase/Src e diferentes vias de sinalização, relacionadas a hipertrofia muscular, proliferação, diferenciação e hipertensão arterial (Dong et al., 2004; Gao et al., 2002; Huang et al., 1997; Liu et al., 2007; Wang et al., 2004; Zhu et al., 1996). No hipocampo e no cerebelo, baixas concentrações de ouabaína ativam o NF- κ B, aumentam a produção dos genes alvos desse fator de transcrição, em parte, via ação modulatória do receptor NMDA sobre a Na^+K^+ -ATPase (de Sá Lima et al., 2013; Kawamoto et al., 2012).

A administração aguda de ouabaína pode aumentar o tônus simpático (Ralevic, Burnstock, 1996; Zhang, Leenen, 2001) e/ou agir diretamente sobre o sistema vascular aumentando a resistência periférica total ou sensibilizando o leito vascular a substâncias vasopressoras (Baker et al., 2001; Ceron, Bendhack, 1997; Davel et al., 2000; Marín et al., 1988; Padilha et al., 2004; Ponte et al., 1996; Rodríguez-Mañas et al., 1992; Rossoni et al., 1999, 2001, 2003; Sánchez-Ferrer et al., 1992; Songu-Mize et al., 1995; Vassallo et al., 1997). Além da vasoconstrição, a inibição aguda da Na^+K^+ -ATPase pela ouabaína possibilita uma modulação do endotélio vascular sobre a resposta contrátil. Historicamente, foi descrito que as células endoteliais liberam um fator que pode modular e se contrapor à ação da ouabaína sobre o músculo liso vascular (Redondo et al., 1995); de forma que a remoção do endotélio potencializa as contrações induzidas pela ouabaína em veias e artérias de placenta humana (Sanchez-Ferrer et al., 1992) e na artéria carótida de cobaia (Rodríguez-Mañas et al., 1992). Os efeitos da ouabaína sobre o endotélio vascular dependem da linhagem estudada. No rato normotenso, a ouabaína promove a liberação de um fator endotelial que inibe a contração produzida pela

ouabaína, enquanto que no hipertenso ocorre a liberação de uma substância que favorece a contração. (Ponte et al., 1996).

Fatores semelhantes à ouabaína foram encontrados em concentrações pico e nanomolares no plasma de mamíferos (Ferrandi et al., 1997). A ouabaína foi identificada como o principal fator *digitalis-like* encontrado no plasma de ratos e humanos (Hamlyn et al., 1991), que exerce importantes funções de controle do tônus vascular e da homeostase de sódio (Nesher et al., 2009). Posteriormente, verificou-se que existe uma forte correlação positiva entre os níveis pressóricos e as concentrações plasmáticas de ouabaína em humanos e roedores (Hamlyn et al., 1982; Sagnella et al., 1986), sugerindo que este hormônio participaria da gênese da hipertensão arterial.

A produção de ouabaína endógena ocorre no córtex da supra-renal (Laredo et al., 1995; Ludens et al., 1992), no hipotálamo (de Wardener, Clarson, 1985) e na região anteroventral do terceiro ventrículo (Pamnani et al., 1981; Songu-Mize et al., 1982). Essa produção pode ser estimulada pelo aumento da concentração plasmática de sódio, pela expansão de volume extracelular (Blaustein, 1993; Manunta et al., 2006a; Yamada et al., 1997), pelo hormônio adrenocorticotrófico (Balzan et al., 2005; Sophocleous et al., 2003), pela angiotensina II (Laredo et al., 1997; Shah et al., 1999) e por catecolaminas (Bauer et al., 2005).

A hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com ouabaína foi demonstrada pela primeira vez por Yuan et al., (1993). No entanto, esse modelo experimental foi inicialmente caracterizado por Manunta et al., (1994). Esses autores observaram que doses diárias crescentes de ouabaína (3, 10 e 30 µg/kg), administradas por cinco semanas, em três distintos grupos de animais, elevavam de forma dependente da dose a concentração plasmática de ouabaína, assim como, a pressão arterial sistólica de ratos previamente normotensos. Esse trabalho sugeriu uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de ouabaína e os valores de pressão arterial mensurados. Além disso, ao final da quinta semana de tratamento, a dose diária de 30 µg/kg, aumentou a concentração plasmática de ouabaína para 5 nM; e esses valores foram significativamente diferentes dos valores observados no controle normotenso (1 nM).

Nos roedores a hipertensão induzida pela ouabaína é mediada pela ligação da ouabaína na isoforma $\alpha 2$ da Na^+K^+ -ATPase (Dostanic et al., 2005; Van

Van Huysse et al., 2011). Isto porque os roedores expressam Na^+K^+ -ATPase com isoforma $\alpha 1$ que é resistente a ouabaína e Na^+K^+ -ATPase com isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ que são sensíveis a ouabaína (Berrebi-Bertrand et al., 1990); diferentemente dos humanos e outros mamíferos que apresentam a subunidade $\alpha 1$ sensível a ouabaína (Blanco, Mercer 1998; Crambert et al., 2000). A ouabaína administrada em concentrações subnanomolares, que bloqueia somente a isoforma $\alpha 2$ da Na^+K^+ -ATPase, aumenta a sinalização do Ca^{+2} , o tônus miogênico, a vasoconstrição mediada por agonistas e a resistência periférica total (Dostanic et al., 2005; Golovina et al., 2003a,b; Zhang et al., 2005).

A hipertensão arterial induzida pela ouabaína tem um componente central. Além da hipertensão arterial, o tratamento com ouabaína por duas semanas resulta em aumento no conteúdo de ouabaína no hipotálamo e nas adrenais (Huang et al., 1994; Manunta et al., 1994; Veerasingham, Leenen 1999). Os efeitos centrais da ouabaína envolvem a hiperatividade simpática e a participação do sistema renina-angiotensina (Huang, Leenen 1999). A hipertensão arterial e a hiperatividade simpática causada pela hipertensão arterial induzida pela ouabaína ou pela infusão de líquido cefalorraquidiano rico em Na^+ são revertidas com o tratamento com um antagonista do receptor AT_1 (Zhang, Leenen 2001) comprovando a participação do sistema renina angiotensina nesse modelo experimental. A administração de ouabaína subcutânea, por duas semanas, aumenta o conteúdo de angiotensina II e reduz a densidade da enzima conversora de angiotensina e do receptor AT_1 no hipotálamo (Cheung et al., 2006).

A hipertensão arterial induzida pela ouabaína também ativa componentes centrais e periféricos do sistema da endotelina, de modo que, o tratamento com um bloqueador do receptor ET_A da endotelina previne o desenvolvimento da hipertensão arterial induzida pelo tratamento com ouabaína por cinco semanas (Xavier et al., 2004c). Centralmente, o tratamento com ouabaína por quatro semanas aumenta o conteúdo cerebral de endotelina-1, diminui o RNA mensageiro do receptor ET_A , e promove efeitos hemodinâmicos, tais como: aumento da resistência vascular renal e da pressão arterial (Di Filippo et al., 2003). Em relação aos vasos, o tratamento com ouabaína aumenta em aorta (Cargnelli et al. 2000) e artérias mesentéricas de resistência (Pulgar et al., 2013) a sensibilidade à endotelina-1 e a expressão do receptor ET_A e não modifica a expressão do receptor ET_B (Xavier et al., 2004c).

Além de induzir uma elevação significativa da pressão arterial em ratos *Wistar*, periféricamente, o tratamento por cinco semanas com ouabaína produz alterações na reatividade vascular à fenilefrina em artérias de condutância de acordo com o leito vascular estudado. Em anéis de aorta o tratamento crônico com ouabaína, promoveu redução tanto da resposta máxima como da sensibilidade à fenilefrina; em anéis de artéria mesentérica superior houve uma redução somente da resposta máxima, enquanto que na artéria caudal nenhuma alteração foi observada (Rossoni et al., 2002a). A redução da resposta contrátil em anéis de aorta foi causada por uma maior modulação endotelial. E esta modulação resultava de um aumento na expressão protéica das isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) da sintase de óxido nítrico, sugerindo um aumento da liberação de óxido nítrico, assim como, de um abridor de canais para potássio (Rossoni et al., 2002b). Por sua vez, em artérias de resistência desses animais, não houve alteração na reatividade vascular à estimulação α_1 -adrenérgica, uma vez que, apesar do efeito modulatório do óxido nítrico sobre a resposta contrátil encontrar-se aumentado, o efeito modulatório do fator hiperpolarizante derivado do endotélio estava reduzido (Xavier et al., 2004b).

Wenceslau et al. (2011) estudaram o efeito do tratamento com ouabaína por vinte semanas sobre a pressão arterial e a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar*. Os resultados demonstraram que esse tempo de tratamento aumentava a pressão arterial dos animais tratados com ouabaína até a sexta semana e depois a pressão permanecia constante até a vigésima semana. A artéria mesentérica de resistência dos animais tratados com ouabaína apresentou um aumento da resposta à noradrenalina quando comparado aos controles, somente após vinte semanas de tratamento. Esse aumento da resposta contrátil devia-se a menor modulação nitrérgica e maior participação de prostanoídes vasoconstritores e de espécies reativas derivadas do oxigênio provenientes da COX-2. Por sua vez, o tratamento durante oito semanas com ouabaína aumenta a sensibilidade ao KCl e a endotelina-1 em artérias mesentéricas de resistência de ratos hipertensos tratados com ouabaína (Pulgar et al., 2013).

A administração aguda de ouabaína em doses nanomolares, similares às encontradas no plasma de pacientes e animais hipertensos pode aumentar a resistência vascular por sensibilizar o músculo liso a agentes vasopressores (Baker et al., 2001; Davel et al., 2000; Rossoni et al., 1999, 2001, 2003; Padilha et al.,

2004). Por outro lado, existem evidências de que ratos hipertensos são mais sensíveis aos efeitos pressor e potencializador da vasoconstrição induzida pela administração aguda de ouabaína (Ceron, Bendhack, 1997; Overbeck, 1984; Padilha et al., 2004; Ponte et al., 1996; Rossoni et al., 1999, 2001, 2003; Siman et al., 2010; Vassallo et al., 1997). Além disso, os níveis plasmáticos de ouabaína também estão elevados em modelos de hipertensão arterial como o desoxicorticosterona acetato (DOCA)-sal, reduzida massa renal, Milan e na hipertensão arterial induzida pelo hormônio adenocorticotrófico (Ferrandi et al., 1997; Krep et al., 1995; Rossi et al., 1995; Takata et al., 1998). Nos modelos de hipertensão arterial com níveis elevados de ouabaína, a administração do anticorpo específico (Digibind) (Kaide et al., 1999; Krep et al., 1995) ou do antagonista da ouabaína (Rostafuroxina) previne a hipertensão arterial ou abaixa a pressão arterial (Manunta et al., 2006b).

Como relatado anteriormente, níveis plasmáticos elevados de um fator *digitalis-like* têm sido encontrados em pacientes com hipertensão arterial essencial (Hamlyn et al., 1982; Manunta et al., 2005, 2011; Pierdomenico et al., 2001; Poston et al., 1981; Tripodi et al., 2009). Além disso, 45% dos pacientes com hipertensão arterial essencial apresentam concentrações plasmáticas e teciduais elevadas de ouabaína endógena e, por sua vez, já possuem alterações na reatividade vascular (Rossi et al., 1995). Por isso, torna-se extremamente importante investigar os efeitos do tratamento crônico com ouabaína em um modelo experimental que é análogo a hipertensão essencial humana e que apresenta alterações na reatividade vascular para posteriormente ou concomitantemente ter as concentrações plasmáticas de ouabaína elevadas. Para tanto, foi utilizado como modelo experimental os ratos espontaneamente hipertensos.

1.1.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Os SHR foram primeiramente descritos por Okamoto e Aoki (1963). Essa linhagem foi obtida a partir do acasalamento de um rato, da linhagem Wistar-Kyoto, com hipertensão arterial persistente por mais de um mês (150 a 175 mmHg), com uma fêmea da mesma linhagem com pressão arterial levemente acima da média (130 a 140 mmHg). Após acasalamentos sucessivos, foi obtida na terceira geração, uma prole com 100% de animais que desenvolveram hipertensão arterial entre a 10^a e a 15^a semana de vida.

Os mecanismos genéticos da hipertensão no SHR envolvem alterações neurais, renais e vasculares. Os SHR apresentam aumento da atividade simpática neural e da produção de catecolaminas e de enzimas sintetizadoras de catecolaminas no tronco encefálico e no hipotálamo, quando comparado a ratos normotensos (Judy et al., 1976; Reja et al., 2002; Takeda, Buñag 1980; Winternitz et al., 1980; Wijnen et al., 1977). O aumento da atividade simpática poderia causar elevação da pressão arterial via vasoconstrição direta e/ou por aumento na frequência e força de contração do coração. Além disso, a atividade simpática renal aumentada acarretaria maior secreção de renina que ativaria o sistema renina-angiotensina ocasionando vasoconstrição e antinatriurese decorrentes da ação da angiotensina II (Ganten et al., 1975; Norman, Dzielak 1982; Schelling et al., 1982).

Nos SHR o ganho do reflexo barorreceptor (Gonzalez et al., 1983; Morrison, Whitehorn 1982) está diminuído, resultando em um prejuízo do controle barorreflexo da frequência cardíaca e da atividade simpática. O prejuízo na função barorreflexa parece preceder o desenvolvimento da hipertensão arterial (Hayashi et al., 1988). E a atividade simpática aumentada parece preceder as hipertrofias cardíaca e vascular, e estas, o aumento da pressão arterial (Adams et al., 1989). Nesses animais observa-se ainda um aumento da expressão e da atividade dos componentes endócrinos e teciduais do sistema renina-angiotensina, especialmente a angiotensina II (Berecek et al., 1987).

No entanto, os níveis elevados da pressão arterial e da resistência periférica não são unicamente sustentados por um tônus neural vasoconstritor (Touw et al., 1980). Paralelo ao aumento da atividade simpática, os SHR apresentam, maior resistência periférica total a partir dos cinquenta dias de vida quando comparado a ratos normotensos (Albrecht, 1974). A maior resistência observada nos SHR é decorrente de modificações estruturais e funcionais nas pequenas artérias de resistência. As artérias de resistência desses roedores apresentam aumento da resposta contrátil (Bund 2000; Mulvany, Halpern 1977) e da sensibilidade a agonistas vasoconstritores como a noradrenalina, na idade de seis semanas quando os animais ainda se encontram no estágio pré-hipertensivo (Mulvany et al., 1980). A maior resposta contrátil dos vasos de resistência dos SHR é decorrente do estreitamento do lúmen ocasionado pelo espessamento da camada média e pelo aumento do número de camadas de células de músculo liso vascular (Mulvany et al., 1978). Já a maior sensibilidade à noradrenalina é decorrente do aumento da

permeabilidade das células de músculo liso vascular ao Ca^{2+} (Mulvany, Nyborg 1980).

No SHR o relaxamento dependente do endotélio está prejudicado em aorta, artérias femorais e artérias mesentéricas de resistência (Bernatova et al., 2009; Konishi, Su 1983; Koller, Huang, 1994; Lüscher et al., 1990; Mori et al., 2006). A disfunção endotelial em aorta de SHR está relacionada ao aumento da expressão protéica da sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS), das superóxido dismutases (SODs) e da nicotinamida adenina dinucleotideo fosfatase (NADPH) oxidase (p22-phox) resultando em um estado de estresse oxidativo (Ülker et al., 2003; Zalba et al., 2000). O prejuízo no relaxamento dependente do endotélio nesses animais, também pode ser decorrente da maior liberação de fatores contráteis derivados do endotélio e produzidos pela ciclooxigenase (Ge et al., 1995; Gluais et al., 2005; Tang et al., 2007). A maior geração de prostanoídes contráteis pelas células endoteliais das artérias de resistência de SHR está associada à maior expressão da COX-2 (Alvarez et al., 2005; Blanco-Rivero et al., 2005; Viridis et al., 2009; Xavier et al., 2008).

O plasma de SHR apresenta concentrações elevadas de um inibidor da Na^+K^+ -ATPase (Wauquier et al., 1988). A concentração desse inibidor é aumentada no hipotálamo, quando comparado a ratos normotensos (Millett et al., 1986). Por sua vez, apesar de representarem o modelo experimental da hipertensão essencial humana, sabe-se que os SHR não possuem aumento das concentrações plasmáticas de ouabaína, quando comparados a ratos normotensos (Doris, 1994). Mesmo não apresentando aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína, os SHR são mais sensíveis aos efeitos desse hormônio. Anéis de aorta desses roedores apresentam maior sensibilidade e resposta contrátil ao Ca^{2+} , na presença de ouabaína (1 mM). Esse efeito deve-se a um aumento na entrada de Ca^{2+} via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Shibata et al., 1990). Adicionalmente, a ouabaína produz maior liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos no leito mesentérico de SHR quando comparado ao mesmo leito de animais normotensos (Tsuda et al., 1988).

Aortas de SHR apresentam maior sensibilidade e resposta contrátil quando submetidas a concentrações crescentes (10^{-8} a 10^{-3} M) de ouabaína, se comparadas com aortas de ratos normotensos (Moreland et al., 1986). Isto ocorre porque esse hormônio promove a liberação de um fator endotelial que facilita a resposta contrátil à ouabaína (Ponte et al., 1996). Na presença da ouabaína, o leito

caudal de SHR é mais sensível à ação da fenilefrina, quando comparado ao leito caudal de ratos normotensos (Vassallo et al., 1997). Esse aumento é mediado pela ativação, induzida pela ouabaína, da enzima conversora de angiotensina, a qual promove a formação de angiotensina II local, que sensibiliza o músculo liso desse animal às ações vasoconstritoras da fenilefrina (Padilha et al., 2004).

Os efeitos do tratamento crônico com ouabaína sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de SHR foram estudados pela primeira vez por Xavier et al., (2009). Os resultados deste trabalho demonstraram que concentrações nanomolares de ouabaína foram capazes de exacerbar o desenvolvimento de hipertensão arterial nesses animais e de modificar a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de artéria caudal. Os segmentos de artéria caudal dos animais tratados com ouabaína apresentaram um aumento da sensibilidade a esse agonista α -adrenérgico quando comparados aos respectivos controles, tratados com veículo. Além disso, a potencialização da resposta vasoconstritora à fenilefrina, nas artérias caudais, estava associada à redução da vasodilatação induzida pelo óxido nítrico e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio; e ao aumento da modulação vasoconstritora induzida pelo $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$, a qual estava associada a um aumento da expressão protéica da COX-2 (Xavier et al., 2009). Assim, até o presente momento, sabe-se que o tratamento crônico com ouabaína potencializa a hipertensão arterial dos SHR e em artéria caudal, prejudica a função endotelial e potencializa o efeito vasoconstritor à fenilefrina.

Assim, sabendo que SHR são mais sensíveis aos efeitos vasculares produzidos pela administração aguda de ouabaína, quando comparado aos ratos normotensos; que por sua vez, artérias caudais de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, apresentam aumento da resposta contrátil a agonistas α -adrenérgicos; e considerando a importância dos vasos de resistência para a regulação da pressão arterial; a hipótese do presente estudo foi que artérias mesentéricas de resistência de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas apresentariam uma potencialização da resposta contrátil à noradrenalina, por meio de um prejuízo na modulação endotelial via produtos da COX-2. Essas alterações iriam contribuir para o incremento e manutenção dos níveis pressóricos e para as mudanças de reatividade vascular induzidas pelo tratamento crônico com ouabaína.

1.2 Objetivo

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a elevação da pressão arterial observada em SHR após o tratamento com ouabaína, durante cinco semanas, está associada a mudanças na reatividade vascular em artérias de resistência. Também foi objetivo do presente estudo investigar as vias envolvidas nesse ajuste.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que o aumento da pressão arterial observado em SHR tratados com ouabaína por cinco semanas é decorrente do prejuízo da modulação endotelial em artérias mesentéricas de resistência. A elevação das concentrações plasmáticas de ouabaína, nos SHR tratados com esse digitálico, aumenta o estado contrátil de artérias mesentéricas de resistência, e esse mecanismo da ouabaína, agindo periféricamente, contribui para o incremento e manutenção da hipertensão arterial nesses animais.

REFERÊNCIAS*

Abdelrahman AM, Al Suleimani YM. Four-week administration of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, improves endothelial dysfunction in the hindlimb vasculature of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharm Res.* 2008;31(12):1584-89.

Adams MA, Bobik A, Korner PI. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension.* 1989;14(2):191-202.

Aizman O, Uhlén P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(23):13420-24.

Al Suleimani YM, Abdelrahman AM, AlMahruqi AS, Alhseini IS, Tageldin MH, Mansour ME, Ali BH. Interaction of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, with cisplatin in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(1):139-44.

Albrecht I. The hemodynamics of early stages of spontaneous hypertension in rats. Part I: Male study. *Jpn Circ J.* 1974;38(11):985-90.

Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 2005;23:767-77.

Aras-Lopes R, Blanco-Rivero J, Hernanz R, Briones A, Rossoni LV, Ferrer M, Salaices M, Balfagón G. Chronic ouabain treatment increases the contribution of nitric oxide to endothelium dependent relaxation. *J Physiol Biochem.* 2008;64(2):115-26.

Arnon A, Hamlyn JM, Blaustein MP. Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^{+} . *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(2):H679-91.

Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2005;23(5):1025-36.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1989;13(6 Pt 2):859-64.

Barker LA, Rossoni LV, Vassallo DV. Acute pressor actions of ouabain do not enhance the actions of phenylephrine or norepinephrine in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37:339-48.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Balzan S, Nicolini G, Iervasi A, Di Cecco P, Fommei E. Endogenous ouabain and acute salt loading in low-renin hypertension. *Am J Hypertens*. 2005;18(7):906-09.

Bauer N, Müller-Ehmsen J, Krämer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RH, Neu H, Kirch U, Grünbaum EG, Schoner W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 2005;45(5):1024-28.

Berrebi-Bertrand I, Maixent JM, Christe G, Lelièvre LG. Two active Na⁺/K⁺-ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1021(2):148-56.

Berecek KH, Kirk KA, Nagahama S, Oparil S. Sympathetic function in spontaneously hypertensive rats after chronic administration of captopril. *Am J Physiol*. 1987;252(4 Pt 2):H796-806.

Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2005;46(1):107-12.

Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*. 1998;275(5 Pt 2):F633-50.

Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am J Physiol*. 1977;232(5):C165-73.

Blaustein, MP. Sodium/ Calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12:S56-S68.

Blaustein, MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am J Physiol*. 1993;264:C1367-87.

Bernatova I, Conde MV, Kopincova J, González MC, Puzserova A, Arribas SM. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. *J Hypertens Suppl*. 2009;27(6):S27-31.

Bohr DF, Webb RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. *Am J Med*. 1984;77:3-16.

Briones AM, Gonzalez JM, Somoza B, Giraldo J, Daly C. J, Vila E, Gonzalez MC, McGrath JC, Arribas SM. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodeling. *J Physiol*. 2003;552:185-95.

Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, Gonzalez MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salaices M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain induced hypertensive rats. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H193-201.

Briones AM, Padilha AS, Cogolludo AL, Alonso MJ, Vassallo DV, Pérez-Vizcaino F, Salaices M. Activation of BKCa channels by nitric oxide prevents coronary artery endothelial dysfunction in ouabain-induced hypertensive rats. *J Hypertens*. 2009;27(1):83-91.

Boric MP, Figueroa XF, Donoso MV, Paredes A, Poblete I, Huidobro-Toro JP. Rise in endothelium-derived NO after stimulation of rat perivascular sympathetic mesenteric nerves. *Am J Physiol*. 1999;277(3 Pt 2):H1027-35.

Borin, ML; Tribe, RM; Blaustein, MP. Increased intracellular Na⁺ augments mobilization of Ca²⁺ from SR in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1994;266 (35):C311-17.

Bulut D, Liaghat S, Hanefeld C, Koll R, Miebach T, Mügge A. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with parecoxib acutely impairs endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(9):1663-67.

Bund SJ. Contractility of resistance arteries of spontaneously hypertensive rats related to their media: lumen ratio. *J Hypertens*. 2000;18(9):1223-31.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-44.

Cargnelli G, Trevisi L, Debetto P, Luciani S, Bova S. Effect of long-term ouabain treatment on contractile responses of rat aortae. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:538-42.

Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D, Oliveira MA, Scivoletto R. The role of thromboxane A₂ in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one-clip hypertension. *Endothelium*. 1997;5(3):167-78.

Ceron PI, Bendhack LM. Increased contractile response induced with ouabain is abolished by thapsigargin in aorta of renal hypertensive rats. *General Pharmacol*. 1997;29(5):707-12.

Cheung WJ, Kent MA, El-Shahat E, Wang H, Tan J, White R, Leenen FH. Central and peripheral renin-angiotensin systems in ouabain-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H624-30.

Cordellini S, Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990;8(1):53-60.

Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelièvre L, Geering K. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J Biol Chem*. 2000;275(3):1976-86.

Davel AP, Rossoni LV, Vassallo DV. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2000;406(3):419-27.

de Sá Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AM, Curi R, Rossoni LV, Avellar MC, Scavone C. Ouabain activates NF κ B through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology.* 2013;73C:327-36.

de Wardener HE, Clarkson EM. Concept of natriuretic hormone. *Physiol Rev.* 1985;65:658-759.

de Wardener HE, MacGregor GA. Dahl's hypothesis that a saluretic substance may be responsible for a sustained rise in arterial pressure: its possible role in essential hypertension. *Kidney Int.* 1980;18(1):1-9.

Di Filippo C, Filippelli A, Rinaldi B, Piegari E, Esposito F, Rossi F, D'Amico M. Chronic peripheral ouabain treatment affects the brain endothelin system of rats. *J Hypertens.* 2003;21:747-53.

Dohi, Y; Kojima, M; Sato, K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension*, 1996;28:732-37.

Dong XH, Komiyama Y, Nishimura N, Masuda M, Takahashi H. Nanomolar level of ouabain increases intracellular calcium to produce nitric oxide in rat aortic endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(5-6):276-83.

Doris P. Ouabain in plasma from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994;266(35):H360-64.

dos Santos L, Xavier FE, Vassallo DV, Rossoni LV. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sci.* 2003;74(5):613-27.

Dostanic I, Paul RJ, Lorenz JN, Theriault S, Van Huysse JW, Lingrel JB. The α 2-isoform of Na⁺K⁺-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(2):H477-85.

El-Mas M, Daabees T, El-Gowell H, Abdel-Galil A. Enhanced endothelial nitric oxide activity contributes to the reduced responsiveness of vascular α 1-adrenoceptors following aortic barodenervation. *Eur J Pharmacol.* 1997;337:235-43.

Eva A, Kirch U, Scheiner-Bobis G. Signaling pathways involving the sodium pump stimulate NO production in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(11):1809-14.

Félétou M, Vanhoutte PM, Verbeuren TJ. The thromboxane/endoperoxide receptor (TP): the common villain. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(4):317-32.

Ferrandi M, Manunta P, Balzan S, Hamlyn JM, Bianchi G, Ferrari P. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. *Hypertension*. 1997;30(4):886-96.

Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*. 1982;62:347-504.

Fortes ZB, Nigro D, Scivoletto R, de Carvalho MH. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor released in arterioles of deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990;8(11):1043-48.

Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Scivoletto R, de Oliveira MA, de Carvalho MH. Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1992;316:75-89.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601.

Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1992;70(4):660-69.

Ganten D, Hutchinson JS, Schelling P. The intrinsic brain iso-renin--angiotensin system in the rat: its possible role in central mechanisms of blood pressure regulation. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1975;2:265s-68s.

Gao J, Wymore RS, Wang Y, Gaudette GR, Krukenkamp IB, Cohen IS, Mathias RT. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J Gen Physiol*. 2002;119(4):297-312.

Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res*. 1995;76(6):1003-10.

Gelosa P, Ballerio R, Banfi C, Nobili E, Gianella A, Pignieri A, Brioschi M, Guerrini U, Castiglioni L, Blanc-Guillemaud V, Lerond L, Tremoli E, Sironi L. Terutroban, a thromboxane/ prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, increases survival in stroke-prone rats by preventing systemic inflammation and endothelial dysfunction: comparison with aspirin and rosuvastatin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(1):199-205.

Giachini FR, Carneiro FS, Lima VV, Carneiro ZN, Dorrance A, Webb RC, Tostes RC. Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Transl Res*. 2009;154(4):183-93.

Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 2005;146:834–45.

Golovina VA, Song H, James PF, Lingrel JB, Blaustein MP. Na⁺ pump alpha 2-subunit expression modulates Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003a;284(2):C475-86.

Golovina V, Song H, James P, Lingrel J, Blaustein M. Regulation of Ca²⁺ signaling by Na⁺ pump alpha-2 subunit expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2003b;986:509-13.

Gonick HC, Ding Y, Vaziri ND, Bagrov AY, Fedorova OV. Simultaneous measurement of marinobufagenin, ouabain, and hypertension-associated protein in various disease states. *Clin Exp Hypertens*. 1998;20(5-6):617-27.

Goto K, Fujii K, Kansui Y, Iida M. Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(9):650-55.

Goto A, Yamada K, Yagi N, Yoshioka M, Sugumoto T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. *Pharmacol Rev*. 1992;44: 377-99.

Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1992;86(2):420-25.

Gonzalez ER, Krieger AJ, Sapru HN. Central resetting of baroreflex in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1983;5(3):346-52.

Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 2000;275(36):27832-37.

Hamlyn JM, Ringel R, Schaefmsfer J, Levinson PD, Hamilton BP, Kowarski AA, Blaustein MP. A circulating inhibitor of Na⁺K⁺-ATPase associated with essential hypertension. *Nature*. 1982;300:650-52.

Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6259-63.

Hamlyn JM, Manunta P. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1992;10(7):S99-111.

Haddy FJ, Overbeck HW. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. *Life Sci*. 1976;19:935-47.

Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol*. 1997;20(11 Suppl 2):II11-7.

Hayashi J, Takeda K, Kawasaki S, Nakamura Y, Oguro M, Nakata T, Tanabe S, Lee LC, Sasaki S, Nakagawa M. Central attenuation of baroreflex by angiotensin II in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1988;1(3 Pt 3):15S-22S.

Hernanz R, Briones AM, Martín A, Beltrán AE, Tejerina T, Salaices M, Alonso MJ. Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. *J Hypertens*. 2008;26(10):1944-54.

Höcherl K, Endemann D, Kammerl MC, Grobecker HF, Kurtz A. Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br J Pharmacol*. 2002;136(8):1117-26.

Huang BS, Huang X, Harmsen E, Leenen FH. Chronic central versus peripheral ouabain blood pressure and sympathetic activity in rats. *Hypertens*. 1994;23(2):1087-90.

Huang BS, Leenen FH. Brain renin-angiotensin system and ouabain induced sympathetic hyperactivity and hypertension in Wistar rats. *Hypertens*. 1999;34:107-12.

Huang L, Kometiani P, Xie Z. Differential regulation of Na/K-ATPase alpha-subunit isoform gene expressions in cardiac myocytes by ouabain and other hypertrophic stimuli. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(11):3157-67.

Jain S, Gupta M, Malhotra S, Pandhi P. Effect of rofecoxib on antihypertensive effects of candesartan in experimental models of hypertension. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2005;27(1):11-6.

Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR Jr, Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 1976;38(6 Suppl 2):21-9.

Juhaszova M, Blaustein MP. Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(5):1800-5.

Kaide J, Ura N, Torii T, Nakagawa M, Takada T, Shimamoto K. Effects of digoxin-specific antibody Fab fragment (Digibind) on blood pressure and renal water-sodium metabolism in 5/6 reduced renal mass hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1999;12(6):611-9.

Kajikawa M, Fujimoto S, Tsuura Y, Mukai E, Takeda T, Hamamoto Y, Takehiro M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y. Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets. *Diabetes*. 2002;51(8):2522-9.

Kaplan N.M. *Clinical Hypertension*. 7. ed. Pennsylvania: Williams & Wikins. 1998; 444p.

Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. 1989;257:H33–H37.

Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amara FG, Pestana RR, Orellana AM, Cipolla-Neto J, Britto LR, Avellar MC, Rossoni LV, Scavone. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor- κ B in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*. 2012;90(1):213-28.

Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert GT Jr, Magil S, Gallagher RT, Berova N, Nakanishi K. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):6654-9.

Kimura K, Manunta P, Hamilton BP, Hamlyn JM. Different effects of in vivo ouabain and digoxin on renal artery function and blood pressure in the rat. *Hypertens Res*. 2000;23:S67–76.

Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994;74(3):416-21.

Konishi M, Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*. 1983;5(6):881-6.

Krep H, Price DA, Soszynski P, Tao QF, Graves SW, Hollenberg NK. Volume sensitive hypertension and the digoxin-like factor. Reversal by a Fab directed against digoxin in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1995;8(9):921-7.

Laredo J, Shah JR, Lu ZR, Hamilton BP, Hamlyn JM. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*. 1997;29(part2):401-7.

Li J, Zhou Z, Jiang DJ, Li D, Tan B, Liu H, Li YJ. Reduction of NO- and EDHF-mediated vasodilatation in hypertension: role of asymmetric dimethylarginine. *Clin Exp Hypertens*. 2007;29(7):489-501.

Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T, Förstermann U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(12):2536-44.

Liu X, Songu-Mize E. Alterations in alpha subunit expression of cardiac Na⁺,K⁺-ATPase in spontaneously hypertensive rats: effect of antihypertensive therapy. *Eur J Pharmacol*. 1997; 327(2-3):151-6.

Liu XL, Miyakawa A, Aperia A, Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *Neuroreport*. 2007;18(6):597-600.

Lograno MD, Daniele E, Galli C. Changes of vascular smooth muscle reactivity in hypertensive rats. *Pharmacol Res*. 1989;21(6):719-28.

Ludens JH, Clark MA, Robinson FG, DuCharme DW. Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabain-like compound. *Hypertension*. 1992;19:721-4.

Lund-Johansen P. Haemodynamics in early essential hypertension-still an area of controversy. *J Hypertens*. 1983;1:209-13.

Lüscher T, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986;8:344-8.

Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 1990;3(1):55-8.

MacGregor GA, Fenton S, Alaghband-Zadeh J, Markandu N, Roulston JE, de Wardener HE. Evidence for a raised concentration of a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981;283(6303):1355-7.

Manunta P, Evans G, Hamilton BP, Gann D, Resau J, Hamlyn JM. A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor. *J Hypertens* 1992;10:S27.

Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J Hypertens*. 1994;12:549-60.

Manunta P, Hamilton J, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. *Hypertens Res*. 2000;23Suppl:S77-85.

Manunta P, Iacoviello M, Forleo C, Messaggio E, Hamlyn JM, Lucarelli K, Guida P, Romito R, De Tommasi E, Bianchi G, Rizzon P, Pitzalis MV. High circulating levels of endogenous ouabain in the offspring of hypertensive and normotensive individuals. *J Hypertens*. 2005;23(9):1677-81.

Manunta P, Hamilton BP, Hamlyn JM. Salt intake and depletion increase circulating levels of endogenous ouabain in normal men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006a;290(3):R553-9.

Manunta P, Ferrandi M, Messaggio E, Ferrari P. A new antihypertensive agent that antagonizes the prohypertensive effect of endogenous ouabain and adducin. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2006b;4(1):61-6.

Manunta P, Maillard M, Tantardini C, Simonini M, Lanzani C, Citterio L, Stella P, CAASmassima N, Burnier M, Hamlyn JM, Bianchi G. Relationships among endogenous ouabain, alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in primary hypertension. *J Hypertens*. 2008;26(5):914-20.

Manunta P, Messaggio E, Casamassima N, Gatti G, Carpini SD, Zagato L, Hamlyn JM. Endogenous ouabain in renal Na(+) handling and related diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(12):1214-8.

Manunta P, Hamlyn JM, Simonini M, Messaggio E, Lanzani C, Bracale M, Argiolas G, Casamassima N, Brioni E, Glorioso N, Bianchi G. Endogenous ouabain and the renin-angiotensin-aldosterone system: distinct effects on Na handling and blood pressure in human hypertension. *J Hypertens*. 2011;29(2):349-56.

Marín J, Redondo J. Vascular Sodium Pump: Endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacol Ther*. 1999;84:249-71.

Marín J, Sánchez-Ferrer CF, Salaices M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol*. 1988;93:43-52.

Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986;237:529-38.

Michel FS, Man GS, Man RY, Vanhoutte PM. Hypertension and the absence of EDHF-mediated responses favour endothelium-dependent contractions in renal arteries of the rat. *Br J Pharmacol*. 2008;155(2):217-26.

Mokuno S, Ito T, Numaguchi Y, Matsui H, Toki Y, Okumura K, Hayakawa T. Impaired nitric oxide production and enhanced autoregulation of coronary circulation in young spontaneously hypertensive rats at prehypertensive stage. *Hypertens Res*. 2001;24(4):395-401.

Moreland R, Major T, Webb R. Contractile responses to ouabain and K⁺-free solution in aorta from hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1986;250(19):H612-9.

Millett JA, Holland SM, Alagband-Zadeh J, de Wardener HE. Na-K-ATPase-inhibiting and glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating activity of plasma and hypothalamus of the Okamoto spontaneously hypertensive rat. *J Endocrinol*. 1986;108(1):69-73.

Ministério da Saúde. Indicadores e Dados Básicos – Brasil. 2011. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2011/matriz.htm>. Acesso em: 22 agosto 2013.

Moore ED, Etter EF, Philipson KD, Carrington WA, Fogarty KE, Lifshitz LM, Fay FS. Coupling of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, Na⁺/K⁺ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature*. 1993;365(6447):657-60.

Mori Y, Ohyanagi M, Koida S, Ueda A, Ishiko K, Iwasaki T. Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2006;29(3):187-95.

Morrison SF, Whitehorn D. Baroreceptor reflex gain is not diminished in spontaneous hypertension. *Am J Physiol*. 1982;243(5):R500-5.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41:19-26.

Mulvany MJ, Hansen OK, Aalkjaer 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.* 1978;43:854-64.

Mulvany MJ, Aalkjaer C, Christensen J. Changes in noradrenaline sensitivity and morphology of arterial resistance vessels during development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1980;2(5):664-71.

Mulvany MJ, Nyborg N. An increased calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1980;71(2):585-96.

Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990;70(4):921-61.

Muscará MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliott SN, Asfaha S, Wallace JL. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Br J Pharmacol.* 2000;129(7):1423-30.

Nagakawa M, Takamatsu H, Toyoda T, Sawada S, Tsuji H, Ijichi H. Effect of inhibition of Na⁺K⁺-ATPase on the prostacyclin generation of cultured human vascular endothelial cells. *Life Sci.* 1987;40:351-57.

Nesher M, Dvela M, Igbokwe VU, Rosen H, Lichtstein D. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(6):H2026-34.

Norman RA Jr, Dzielak DJ. Role of renal nerves in onset and maintenance of spontaneous hypertension. *Am J Physiol.* 1982;243(2):H284-88.

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

Okumura T, Hayashi I, Ikezawa T, Yamanaka M, Takata T, Fujita Y, Saigenji K, Yamashina S, Majima M. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate increased blood pressure in renovascular hypertensive models, but not in deoxycorticosterone-salt hypertension. *Hypertens Res.* 2002;25(6):927-38.

Overbeck HW. Effect of ouabain on arteriolar responses to norepinephrine in chronic benign volume-expanded hypertension. *Hypertension.* 1984;6(Suppl 1):I82-7.

Pacheco ME, Marin J, Manso AM, Rodríguez-Martínez MA, Briones AM, Salaices M, Redondo J. Nitric oxide synthase induction by ouabain in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000;18:877-84.

Panza JA, Garcia CE, Kilcoyno CM, Quyyumi AA, Cannon RO. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*. 1995;91:1732-38.

Padilha A, Rossoni LV, Xavier FE, Vassallo DV. Ouabain at nanomolar concentration promotes the synthesis and release of angiotensin II from the endothelium of the tail vascular bed of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:372-80.

Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Alonso MJ, Salaices M. Ouabain treatment changes the role of endothelial factors in rat resistance arteries. *Eur J Pharmacol*. 2008;600(1-3):110-6.

Pamnani M, Huot S, Buggy J, Clough D, Haddy FJ. Demonstration of a humoral inhibitor of the Na⁺-K⁺ pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*. 1981;3(Suppl II):II96-101.

Pierdomenico SD, Bucci A, Manunta P, Rivera R, Ferrandi M, Hamlyn JM, Lapenna D, Cuccurullo F, Mezzetti A. Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2001;14(1):44-50.

Ponte A, Marín J, Arribas S, González S, Barrús M.T, Salaices M, Sánchez-Ferrer CF. Endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in aortas of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res*. 1996;33:164-74.

Poston L, Sewell RB, Wilkison SP, Richardson PJ, Williams R, Clarkson EM, MacGregor GA, de Wardener HE. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *Br Med J*. 1981;282:847-9.

Pulgar VM, Jeffers AB, Rashad HM, Diz DI, Aileru AA. Increased Constrictor Tone Induced by Ouabain-Treatment in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62(2):174-83.

Pulina M, Zulian A, Berra-Romani R, Beskina O, Mazzocco-Spezia A, Baryshnikov G, Papparella I, Hamlyn J, Blaustein M, Golovina V. Upregulation of Na⁺ and Ca²⁺ transporters in arterial smooth muscle from ouabain-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H263-74.

Quilley CP, Chiba S, Quilley J, McGiff JC. Aspirin enhances the antihypertensive effect of captopril in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1987;10(3):294-302.

Reja V, Goodchild AK, Pilowsky PM. Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. *Hypertension*. 2002;40(3):342-7.

Ralevic V, Burnstock G. Effects of short- and long-term sympathectomy on vasoconstrictor responses of the rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol*. 1996;119(7):1347-54.

Redondo J, Peiró C, Rodríguez-Mañas L, Salaices M, Marín J, Sánchez-Ferrer CF. Endothelial stimulation of sodium pump in cultured vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1995;26(1):177-85.

Richter CM, Godes M, Wagner C, Maser-Gluth C, Herzfeld S, Dorn M, Priem F, Slowinski T, Bauer C, Schneider W, Neumayer HH, Kurtz A, Hofer B. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. *J Hypertens*. 2004;22(1):191-8.

Rodríguez-Mañas L, Pareja A, Sánchez-Ferrer CF, CAASdo MA, Salaices M, Marín J. Endothelial role in ouabain-induced contractions in guinea pig carotid arteries. *Hypertension*. 1992;20(5):674-81.

Rossi G, Manunta P, Hamlyn JM, Pavan E, De Toni R, Semplicini A, Pessina AC. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels. *J Hypertens*. 1995;13(10):1181-91.

Rossoni LV, Cunha V, Franca A, Vassallo DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34(6):887-92.

Rossoni LV, Pinto VD, Vassallo DV. Effects of small doses of ouabain on arterial blood pressure of anesthetized hypertensive and normotensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(8):1065-77.

Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contraction and the vascular expression of Na⁺K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. *Br J Pharmacol*. 2002a;135(3):771-81.

Rossoni LV, Salaices M, Miguel M, Briones AM, Barker LA, Vassallo DV, Alonso MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol*. 2002b;283(5):H2110-8.

Rossoni LV, dos Santos L, Barker LA, Vassallo DV. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41(1):105-16.

Rossoni LV, Xavier FE, Moreira CM, Falcochio D, Amanso AM, Tanoue CU, Carvalho CR, Vassallo DV. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Sci*. 2006;76 (16):1537-45.

Sagnella GA, Jones JC, Shore AC, Markandu ND, MacGregor GA. Evidence for increased levels of a circulating ouabainlike factor in essential hypertension. *Hypertension*. 1986;8(5):433-7.

Sánchez-Ferrer CF, Fernández-Alfonso MS, Ponte A, Casado MA, González R, Rodríguez-Mañas L, Pareja A, Marín J. Endothelial modulation of the ouabain-induced contraction in human placental vessels. *Circ Res*. 1992;71(4):943-50.

Sato K, Aoki K. Biphasic contraction induced by ouabain in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol.* 1988;158:299-302.

Schelling P, Meyer D, Loos HE, Speck G, Phillips MI, Johnson AK, Ganten D. A micromethod for the measurement of renin in brain nuclei: its application in spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology.* 1982;21(5):455-63.

Schiffrin EL. Resistance arteries as endpoints in hypertension. *Blood Press.* 1997;2(Suppl) 24-30.

Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, Schoner W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem.* 1998;273(2):784-92.

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.* 1993;109(4):900-1.

Shah JR, Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM. Effects of angiotensin II on sodium potassium pumps, endogenous ouabain, and aldosterone in bovine zona glomerulosa cells. *Hypertension.* 1999;33(1 Pt 2):373-7.

Shepherd JT. Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. *J Hypertens.* 1990;8(Suppl 7):S15-S17.

Shibata R, Morita S, Nagai K, Miyata S, Iwasaki T. Calcium dependence of ouabain-induced contraction in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1990;190(1-2):147-57.

Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol.* 2012;3:441.

Siman FD, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. A low concentration of ouabain (0.18microg/kg) enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats by inhibiting the Na⁺ pump and activating the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(8):767-76.

Sociedade Brasileira de Cardiologia/ Sociedade Brasileira de Hipertensão/ Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010;95(1 supl.1):1-51.

Songu-Mize E, Bealer SL, Caldwell W. Effect of AV3V Lesions on development of DOCA-Salt hypertension and vascular Na⁺-Pump activity. *Hypertension.* 1982;4:575-80.

Songu-Mize E, Vassallo DV, Rashed SM, Varner KJ. Ouabain amplifies contractile responses to phenylephrine in rat tail arteries in hypertension. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1995;6:309-19.

Sophocleous A, Elmatzoglou I, Souvatzoglou A. Circulating endogenous digitalis-like factor(s) (EDLF) in man is derived from the adrenals and its secretion is ACTH-dependent. *J Endocrinol Invest*. 2003;26(7):668-74.

Sunano S, Watanabe H, Tanaka S, Sekiguchi F, Shimamura K. Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol*. 1999;126(3):709-16.

Tabernero A, Giraldo J, Vila E. Modelling the changes due to the endothelium and hypertension in the alpha-adrenoreceptor-mediated responses of rat aorta. *J Auton Pharmacol*. 1999;19(4):219-28.

Tang EH, Ku DD, Tipoe GL, Feletou M, Man RY, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions occur in the aorta of wild-type and COX2-/- knockout but not COX1-/- knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46(6):761-5.

Tang EH, Leung FP, Huang Y, Feletou M, So KF, Man RY, Vanhoutte PM. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br J Pharmacol*. 2007;151, 15-23.

Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*. 2008;19;32(3):409-18.

Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch*. 2010;459(6):995-1004.

Tang EH, Jensen BL, Skott O, Leung GP, Feletou M, Man RY, Vanhoutte PM. The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2008;78(1):130-8.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*. 1997;29(Pt 2):274-79.

Takada T, Nakagawa M, Ura N, Kaide J, Yoshida H, Shimamoto K. Endogenous immunoreactive ouabain-like and digoxin-like factors in reduced renal mass hypertensive rats. *Hypertens Res*. 1998;21(3):193-9.

Takeda K, Buñag RD. Chronic propranolol treatment inhibits sympathetic nerve activity and keeps blood pressure from rising in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1980;2(2):228-35.

Toda N. Mechanism of ouabain-induced arterial muscle contraction. *Am J Physiol*. 1980;239:H404-11.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44(3):248-52.

Touw KB, Haywood JR, Shaffer RA, Brody MJ. Contribution of the sympathetic nervous system to vascular resistance in conscious young and adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1980;2(4):408-18.

Tripodi G, Citterio L, Kouznetsova T, Lanzani C, Florio M, Modica R, Messaggio E, Hamlyn JM, Zagato L, Bianchi G, Staessen JA, Manunta P. Steroid biosynthesis and renal excretion in human essential hypertension: association with blood pressure and endogenous ouabain. *Am J Hypertens*. 2009;22(4):357-63.

Tuttle RS, Yager J, Northrup N. Age and the antihypertensive effect of aspirin in rats. *Br J Pharmacol*. 1988;94(3):755-8.

Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Masuyama Y. Effects of ouabain on adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1988;52(1):53-9.

Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res*. 2003;59(2):488-500.

U.S. Department of Health and Human Services. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. 2004. (JNC 7). Acesso em: 22 agosto 2013. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/jnc7full.pdf>.

Van Huysse JW, Dostanic I, Lingrel JB, Hou X, Wu H. Hypertension from chronic central sodium chloride in mice is mediated by the ouabain-binding site on the Na,K-ATPase α_2 -isoform. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H2147-53.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;31(6):1248-54.

Vassallo DV, Songu-Mize E, Rossoni LV, Amaral SM. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:545-52.

Veerasingham SJ, Leenen FH. Ouabain and central sodium-induced hypertension depend on the ventral anteroventral third ventricle region. *Am J Physiol*. 1999;276(45):H63-70.

Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension*. 2009;53(6):1008-16.

Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):1015-23.

Virdis A, Bacca A, Colucci R, Duranti E, Fornai M, Materazzi G, Ippolito C, Bernardini N, Blandizzi C, Bernini G, Taddei S. Endothelial Dysfunction in Small Arteries of

Essential Hypertensive Patients: Role of Cyclooxygenase-2 in Oxidative Stress Generation. *Hypertension*. 2013;62(2):337-44.

Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17250-9.

Wallick ET, Adams RJ, Fondacaro JD, Jacobson ED. Na⁺/K⁺-ATPase of the canine mesenteric artery. *Fed Proc*. 1982;41:2101-05.

Wauquier I, Pernollet MG, Grichois ML, Lacour B, Meyer P, Devynck MA. Endogenous digitalislike circulating substances in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1988;12(2):108-16.

Wenceslau CF, Davel AP, Xavier, FE, Rossoni, LV. Long-term ouabain-treatment impairs vascular function in resistance arteries. *J Vasc Res*. 2011;48(4):316-26.

Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, Maxwell C, Palmisano J, Keaney JF Jr, Morrow JD, Vita JA. Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension*. 2003;42(3):310-5.

Wijnen HJ, Versteeg DH, Palkovits M, De Jong W. Increased adrenaline content of individual nuclei of the hypothalamus and the medulla oblongata of genetically hypertensive ralamus and the medulla oblongata of genetically hypertensive rats. *Brain Res*. 1977;135(1):180-5.

Winternitz SR, Katholi RE, Oparil S. Role of the renal sympathetic nerves in the development and maintenance of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest*. 1980;66(5):971-8.

World Health Organization. World health statistics 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44844/1/9789241564441_eng.pdf. Acesso em: 22 agosto 2013.

Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2002;105(3):387-92.

Wu R, Laplante MA, de Champlain J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension*. 2005;45(6):1139-44.

Yamada K, Goto A, Nagoshi H, Terano Y, Omata M. Elevation of ouabainlike compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. *Hypertension*. 1997;30(1):94-8.

Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to

acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2002;136:104–110.

Yuan CM, Manunta P, Hamlyn JM, Chen S, Bohen E, Yeun J, Haddy FJ, Pamnani M.B. Long-term ouabain administration produces hypertension in rats. *Hypertension.* 1993;22:178-87.

Xavier FE, Salaices M, Marquez-Rodas I, Alonso MJ, Rossoni LV, Vassallo DV, Balfagon G. Neurogenic nitric oxide release increases in mesenteric arteries from ouabain hypertensive rats. *J Hypertens.* 2004a;2(5):949-57.

Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagon G, Vassallo DV, Salaices M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2004b;143:215-25.

Xavier FE, Yogi A, Callera GE, Tostes RC, Alvarez Y, Salaices M, Alonso MJ, Rossoni LV. Contribution of the endothelin and renin-angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. *Br J Pharmacol.* 2004c.143:794-802.

Xavier FE, Aras-Lopes R, Arroyo-Villa I, del Campo L, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M, Balfagón G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2008;154:1225-35.

Xavier FE, Davel AP, Fukuda LE, Rossoni LV. Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: role of vascular mechanisms. *J Hypertens.* 2009;27:1233-42.

Xie Z, Kometiani P, Liu J, Li J, Shapiro JI, Askari A. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(27):19323-8.

Xie Z, Askari A. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* 2002;269(10):2434-9.

Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* 2003;3(3):157-68.

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000;35(5):1055-61.

Zhang J, Leenen FH. AT(1) receptor blockers prevent sympathetic hyperactivity and hypertension by chronic ouabain and hypertonic saline. *Am J Physiol.* 2001;280:H1318-23.

Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, Wier WG, Blaustein MP.

Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J Physiol*. 2005;569(Pt 1):243-56.

Zhang S, Malmersjö S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlén P, Mikoshiba K, Aperia A. Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. *J Biol Chem*. 2006;281(31):21954-62.

Zhang J, Hamlyn JM, Karashima E, Raina H, Mauban JR, Izuka M, Berra-Romani R, Zulian A, Wier WG, Blaustein MP. Low-dose ouabain constricts small arteries from ouabain-hypertensive rats: implications for sustained elevation of vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(3):H1140-50.

Zhu Z, Tepel M, Neusser M, Zidek W. Low concentrations of ouabain increase cytosolic free calcium concentration in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond)*. 1996;90(1):9-12.