

CAROLINE APARECIDA TOMAZELLI

Avaliação das vias envolvidas no efeito do antagonismo da ouabaína endógena sobre o remodelamento de artérias mesentéricas de resistência de ratos com hipertensão DOCA-sal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Luciana Venturini Rossoni

Versão corrigida

São Paulo

2018

RESUMO

Tomazelli CA. Avaliação das vias envolvidas no efeito do antagonismo da ouabaína endógena sobre o remodelamento de artérias mesentéricas de resistência de ratos com hipertensão DOCA-sal. [Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Inibidores da Na^+/K^+ ATPase, como a ouabaína (OUA), estão associados à gênese/manutenção da hipertensão arterial (HA). Ratos tratados com OUA ficam hipertensos e suas artérias mesentéricas de resistência (AMR) apresentam disfunção vascular, estresse oxidativo e remodelamento estrutural e mecânico. Modelos de HA dependente de volume, como o DOCA-sal, têm aumento da concentração plasmática de OUA. Interagindo com a Na^+/K^+ ATPase, a OUA ativa vias de proliferação e fibrose, como a via MAPK, ativada quando da fosforilação da c-Src e do EGFR. A rostafuroxina, antagonista da OUA, reduz a pressão arterial (PA) e melhora a disfunção endotelial em AMR de ratos DOCA-sal. Dados do laboratório (não publicados) mostram que a rostafuroxina reverte o remodelamento mecânico e restaura parcialmente o remodelamento estrutural das AMR de ratos DOCA-sal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de sinalização celular envolvidos nas mudanças estruturais e mecânicas das AMR de ratos DOCA-sal tratados com rostafuroxina. Ratos Wistar, uninefrectomizados, foram tratados com injeções subcutâneas de DOCA (em mg/kg/semana: 20 na primeira; 12 na segunda e terceira; 6 da quarta ao fim do experimento) e ingeriram água com NaCl (1%) e KCl (0,2%). Cinco semanas após o início do tratamento, um subgrupo passou a ser tratado, concomitantemente, com rostafuroxina (gavagem, 1mg/kg/dia) por 3 semanas. Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados, mortos, as AMR dissecadas e fixadas em paraformaldeído (4%) para as análises histológicas ou armazenadas para *Western Blot*. Análise estatística aplicada: ANOVA uma ou duas vias. Avaliado por meio da plestismografia de cauda, o tratamento com DOCA-sal aumentou a PA; a rostafuroxina reduziu, mas não normalizou a mesma aos valores do grupo SHAM. A razão de colágeno I/III e a expressão proteica dos mediadores fibróticos $\text{TGF}\beta 1$ e CTGF foi maior nas AMR dos DOCA, alterações restauradas após tratamento com rostafuroxina. Além do mais, houve aumento da espessura da lâmina elástica interna das AMR dos DOCA, o que foi revertido pela rostafuroxina. A expressão de endotelina-1 foi maior nas AMR dos DOCA tratados ou não com rostafuroxina; a expressão do receptor ET_A foi reduzida nas AMR de ambos os grupos; já a expressão do receptor ET_B foi maior nas AMR dos DOCA quando comparados aos SHAM, sendo normalizada pela rostafuroxina. A expressão de c-Src^{Tyr418} e EGFR, bem como das enzimas c-RAF, ERK 1/2, p-ERK 1/2 e p38MAPK foi maior nas AMR dos DOCA, sendo restauradas com a rostafuroxina. O remodelamento das AMR do grupo DOCA estava associado ao espessamento da LEI e ao aumento da deposição de colágeno e da expressão de fatores fibróticos, de componentes da via da MAPK, da Src^{Tyr418} e do EGFR, alterações revertidas pela rostafuroxina. Com relação ao sistema endotelina, a rostafuroxina normalizou a reduzida expressão dos receptores ET_B , mas não teve efeito nem sobre a expressão do receptor ET_A nem da própria endotelina-1.

Palavras-chave: Hipertensão arterial. Ouabaína. DOCA-sal. Rostafuroxina. Remodelamento vascular.

ABSTRACT

Tomazelli CA. Evaluation of the pathways involved in the effect of endogenous ouabain antagonism on the remodeling of mesenteric resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. [Dissertation (Human Physiology Master Degree)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2018.

Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors, such as ouabain (OUA), are associated with genesis/maintenance of hypertension. Rats treated with OUA are hypertensive and their mesenteric resistance arteries (MRA) exhibit vascular dysfunction, oxidative stress and structural and mechanical remodeling. Volume-dependent hypertensive models, as DOCA-salt, have increased plasmatic OUA levels. Interacting with Na⁺/K⁺ ATPase, OUA activates proliferation and fibrosis pathways, such as MAPK pathway, which is activated from c-Src and EGFR phosphorylation. Rostafuroxin, an OUA antagonist, reduces arterial pressure (AP) and improves endothelial dysfunction in MRA of DOCA-salt rats. Unpublished data of our laboratory have shown that rostafuroxin reverses the mechanical and partially restores the structural remodeling of MRA of DOCA-salt rats. Thus, the aim of this study was to evaluate the cellular signaling mechanisms involved in the structural and mechanical changes in MRA of DOCA-salt rats treated with rostafuroxin. Male Wistar rats, uninephrectomized, were treated with subcutaneous injections of DOCA (mg/kg/week: 20 in the 1st; 12 in the 2nd and 3rd; 6 from 4th to the end of the experiment) and drunk water with NaCl (1%) and KCl (0,2%). After 5 weeks of treatment, a subgroup started being treated, concomitantly, with rostafuroxin (gavage, 1mg/kg/day) for 3 weeks. At the end of the protocol, animals were anesthetized, killed, the MRA dissected out and fixed in paraformaldehyde (4%) to histological analyses or stored to Western Blot. Statistical analysis applied: ANOVA one- or two-way. Evaluated by pletismography, the DOCA-salt treatment raised the AP levels; rostafuroxin reduced it, but did not normalized to the values of SHAM group. Collagen I/III ratio and protein expression of fibrosis mediators TGFβ1 and CTGF was higher in MRA of DOCA and rostafuroxin restored these parameters. In addition, an increment in the thickness of inner elastic lamina was observed in MRA of DOCA, which was reversed by rostafuroxin treatment. Endothelin-1 expression was higher in MRA of both DOCA and rostafuroxin treated rats; ET_A receptor was less expressed in both groups. On the other hand, ET_B was more expressed in MRA from DOCA and normalized to SHAM levels by rostafuroxin treatment. The expression of c-Src^{Tyr418} and EGFR, as well as of the enzymes c-RAF, ERK 1/2, p-ERK 1/2 and p38MAPK was higher in MRA of DOCA when compared to SHAM, being restores with rostafuroxin. MRA vascular remodelling in DOCA group is followed by the enlargement of IEL and increase in collagen deposition and expression of fibrotic factors, MAPK pathway components, Src^{Tyr418} and EGRF, alterations reversed by rostafuroxin. In relation to endothelin system, rostafuroxin normalized ET_B receptors expression, but did not have any effect neither in the ET_A receptor nor in endothelin-1 expression.

Key words: Hypertension. Ouabain. DOCA-salt. Rostafuroxin. Vascular remodeling

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial: definição, classificação e causas

A pressão de um líquido é definida como a relação entre a força que este exerce sobre o compartimento onde está armazenado e sua respectiva área de distribuição. Fisiologicamente, a pressão sanguínea pode ser entendida como a força exercida pelo sangue na parede dos vasos, sendo o produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica (RVP) (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001; GUYTON, 1981). Portanto, fatores que influenciem estes dois parâmetros alteram de forma direta os níveis pressóricos, podendo, em muitos casos, levar ao surgimento da hipertensão arterial (HA) (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001; GUYTON, 1981).

A HA caracteriza-se pelo aumento progressivo e sustentado das cifras de pressão arterial (PA), podendo ser acompanhada de lesão em órgãos alvos, como rins, encéfalo, coração e vasos sanguíneos (BRASIL, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Atualizações do *American College of Cardiology* e da *American Heart Association* definiram novos valores para a categorização da PA, conforme mostrado na Tabela 1: a partir dessa nova diretriz, os pacientes passam a ser considerados hipertensos quando atingem valores pressóricos iguais ou superiores a 130-139 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS) e/ou 80-89 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD) (WHELTON et al., 2017). Segundo esta nova diretriz, de acordo com os valores pressóricos, a HA pode ser dividida em estágio 1, cuja PAS varia entre 130-139 mmHg e a PAD entre 80-89 mmHg, e estágio 2, no qual a PAS é maior ou igual a 140 mmHg e a PAD varia entre 80-89 mmHg (WHELTON et al., 2017).

A HA é um dos problemas de saúde pública mais graves no Brasil, e, ao lado de outras doenças do aparelho circulatório, representa a primeira causa de morte no país (BRASIL, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Tabela 1 – Categorização da pressão arterial (PA) em adultos segundo o *American College of Cardiology* e a *American Heart Association*

Categoria da PA	Pressão arterial sistólica (PAS)	Pressão arterial diastólica (PAD)
Normal	< 120 mmHg	< 80
Elevada	120-129	< 80
Hipertensão arterial		
Estágio 1	130-139	80-89
Estágio 2	≥ 140	80-89

Adaptado de WHELTON et al., 2017

A HA é classificada, de acordo com sua(s) base(s) etiológica(s), em duas categorias: HA primária ou secundária. A HA primária afeta 95% dos pacientes (BRASIL, 2013) e não tem suas causas claramente conhecidas e definidas. Sabe-se, contudo, que seu surgimento está associado a fatores genéticos e ambientais (BRASIL, 2013). Já a HA secundária acomete, aproximadamente, 5% dos pacientes, e ocorre em virtude de um problema de base identificável (BRASIL, 2013) que, caso seja adequadamente removido e/ou tratado, pode resultar na reversão do quadro hipertensivo. As principais doenças que levam ao surgimento da HA secundária são: feocromocitoma, síndrome de Cushing, coartação da aorta, estreitamento da artéria renal, doença renal crônica e disfunções da tireoide (BRASIL, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Embora as causas da HA primária não sejam completamente conhecidas, sabe-se que alguns agentes endógenos circulantes inibidores da Na⁺/K⁺ ATPase, como a ouabaína (OUA), estão relacionados à origem e/ou manutenção da doença. Tal afirmação é fundamentada em resultados provenientes de estudos realizados em humanos e em animais. Por exemplo, ratos normotensos cronicamente tratados com OUA desenvolvem HA (MANUNTA et al., 1994; ROSSONI et al., 2002a, 2002b; YUAN et al., 1993) e alguns modelos animais de HA apresentam aumento da concentração endógena de OUA (DOSTANIC-LARSON et al., 2005; HAMLIN, 1989; NAKAMURA

et al., 1987). Trabalhos com humanos mostram que pacientes tanto com HA primária (POSTON et al., 1981; ROSSI et al., 1995; TENTORI et al., 2016) quanto com HA secundária (ROSSI et al., 1995; MASUGI et al., 1986) apresentam aumento plasmático de OUA. Além do mais, pacientes normotensos cujos pais apresentam HA primária também têm maior concentração de OUA circulante (MANUNTA et al., 2005).

1.2 *Ouabaína: descoberta, síntese, liberação e mecanismos de ação*

Fatores endógenos que controlam as concentrações de sódio (Na^+) no organismo e, conseqüentemente, o volume plasmático, têm sido alvos de estudo de diferentes grupos de pesquisa ao longo das últimas décadas. Em 1961, de Wardener e colaboradores demonstraram que a infusão de solução salina levava ao aumento da excreção renal de Na^+ , mesmo que a perfusão renal e a taxa de filtração glomerular permanecessem inalteradas (DE WARDENER et al., 1961). O chamado "*terceiro fator*", substância responsável pelo elo entre expansão de volume e natriurese independente de alterações na hemodinâmica renal, foi alvo de grande interesse de pesquisadores durante os anos 1960 e 1970. Em 1980, demonstrou-se, pela primeira vez, que o "*terceiro fator*" associado à natriurese causada pela expansão de volume era um componente ao qual se ligavam anticorpos anti-digoxina (GRUBER; WHITAKER; JR, 1980). Mais tarde, em 1991, este mediador foi isolado do plasma humano, teve sua estrutura química caracterizada e passou a ser chamado de OUA endógena (HAMLIN et al., 1991).

A OUA é um glicosídeo que foi isolado, inicialmente, de plantas (WRAY; EISNER; ALLEN, 1985), classificado como esteroide cardiotônico, pertencente ao subgrupo dos cardenolídeos (HAMLIN et al., 1991). Em mamíferos, é produzida nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo e na zona glomerulosa do córtex da glândula suprarrenal (LAREDO; HAMILTON; HAMLIN, 1994; TAKAHASHI et al., 1994; TYMIK et al., 1993; YAMADA et al., 1992).

Os precursores da produção da OUA são os mesmos necessários para a síntese dos hormônios esteroides: hidroxicolesterol, pregnenolona e progesterona (HAMLIN et al., 1998). O primeiro passo na síntese da OUA é a clivagem da cadeia lateral do colesterol (LICHTSTEIN et al., 1998) pelo citocromo P450_{scc} (TRIPODI et

al., 2009), formando, assim, pregnenolona; essa é clivada à progesterona por ação da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase. A inibição do citocromo P450_{sc} e da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase aumenta as concentrações de colesterol e pregnenolona, respectivamente, além de reduzir a concentração de compostos digitálicos (como a OUA) no sobrenadante do meio de cultura de células adrenais, o que sugere que as enzimas que iniciam a síntese dos hormônios esteroides também são essenciais para o início da produção dos digitálicos (LICHTSTEIN et al., 1998).

A produção e liberação de OUA são estimuladas por vários mediadores, como o hormônio adrenocorticotrófico (LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1994), a angiotensina II (LAREDO et al., 1997; LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1994), a vasopressina e a fenilefrina (LAREDO et al., 2000). Seções de exercício agudo (BAUER et al., 2005) e condições de hipóxia (DE ANGELIS; HAUPERT JR., 1998) também elevam a concentração deste hormônio. Da mesma forma, a expansão de volume, seja em indivíduos e animais saudáveis, normotensos, (GRUBER; WHITAKER; JR, 1980; HAMLYN, 1989; VAKKURI et al., 2000), seja em hipertensos (HAMLYN, 1989; NAKAMURA et al., 1987) causa maior liberação de OUA.

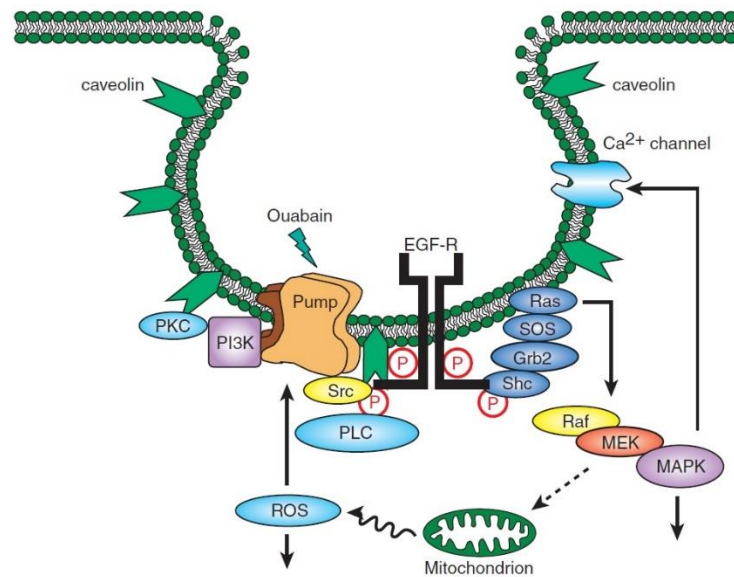
A OUA age na Na⁺/K⁺ ATPase, proteína integral de membrana presente em todas as células, cuja estrutura molecular foi descrita em 1957 (SKOU, 1957). A função primária desta enzima é transportar 3 íons Na⁺ para o líquido extracelular (LEC) em troca de 2 íons K⁺ para o líquido intracelular (LIC), sendo, portanto, eletrogênica (SKOU, 1957). O transporte ocorre contra o gradiente de concentração de ambos os íons. Assim, o funcionamento da Na⁺/K⁺ ATPase depende da energia da hidrólise do ATP (SKOU, 1957). Quando a OUA se liga à subunidade α da Na⁺/K⁺ ATPase, a atividade enzimática é inibida (LINGREL et al., 1997), levando ao acúmulo de Na⁺ no LIC, o que reduz a cinética do trocador Na⁺/Ca⁺² (BLAUSTEIN, 1977; GLITSCH; REUTER; SCHOLZ, 1970), o qual promove o efluxo de 1 íon Ca⁺² em troca do influxo de 3 íons Na⁺ (BLAUSTEIN, 1977). Uma vez que as concentrações de Na⁺ aumentem devido a inibição da Na⁺/K⁺ ATPase, menos Ca⁺² sai da célula pelo trocador, o que aumenta sua concentração no citosol. O Ca⁺² do citosol é sequestrado para o interior do retículo sarcoplasmático, por ação da bomba de Ca⁺² do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando o estoque iônico. No caso dos miócitos, quando esses recebem estímulo contrátil, mais Ca⁺² é mobilizado para o citosol e, como a contração é diretamente proporcional à disponibilidade de Ca⁺², a resposta observada é

amplificada (BLAUSTEIN; JUHASZOVA; GOLOVINA, 1998; HIBBERD; JEWELL, 1982).

O aumento do Na^+ e, conseqüentemente, do Ca^{+2} , não ocorre em todo o citosol, mas restringe-se a um pequeno domínio celular, o *PLasmERosome* (BLAUSTEIN; JUHASZOVA; GOLOVINA, 1998), sítio da membrana plasmática onde predominam as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na^+/K^+ ATPase e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$; o *PLasmERosome* está em íntimo contato com o retículo sarcoplasmático, permitindo o fino controle das alterações iônicas que ocorrem quando a OUA ou outros agentes digitálicos endógenos inibem a atividade da Na^+/K^+ ATPase (BLAUSTEIN; JUHASZOVA; GOLOVINA, 1998).

A interação da OUA com a Na^+/K^+ ATPase ativa também vias de proliferação, hipertrofia e apoptose, que independem da sua atividade enzimática (ABRAMOWITZ et al., 2003; AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; HAAS et al., 2002; HAAS; ASKARI; XIE, 2000; KOMETIANI et al., 1998). Nestas situações, a Na^+/K^+ ATPase ativa a c-Src (AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; FERRANDI et al., 2004; HAAS et al., 2002), proteína tirosina quinase que interage fisicamente com a Na^+/K^+ ATPase (TIAN et al., 2006). Quando fosforilada no resíduo tirosina⁴¹⁸, a c-Src assume a forma ativa (THOMAS; BRUGGE, 1997), levando à fosforilação de uma cascata de proteínas pertencentes à via da Ras-Raf-MEK-ERK (AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; HAAS et al., 2002; KOMETIANI et al., 1998; LI; LÉVESQUE; ANAND-SRIVASTAVA, 2010) a qual ativa a transcrição de genes relacionados à proliferação e hipertrofia celular (KOMETIANI et al., 1998). Ao conjunto de receptores e enzimas que são modulados pela interação da OUA com a Na^+/K^+ ATPase, dá-se o nome de *signalosome* (XIE; CAI, 2003) e essas são exemplificadas na figura 1.

Figura 1- Modelo do *signalosome*



Modelo do *signalosome*. Conforme esquematizado, ao interagir com a Na⁺/K⁺ ATPase, a OUA ativa diferentes proteínas do complexo do *signalosome*, as quais estão envolvidas com eventos de proliferação e fibrose. EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal; PKC: proteína quinase C; PI3K: fosfoinositídeo 3 quinase; Grb2: receptor do fator de crescimento ligado à proteína 2; Sos: *son of sevenless*; Shc: proteína tipo colágeno homóloga à Src; PLC: fosfolipase C; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; ROS: espécies reativas de oxigênio. Fonte: (XIE; CAI, 2003).

Além de ativar a c-Src, a OUA pode transativar o EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; HAAS et al., 2002), receptor com uma porção extracelular, uma única alça que atravessa a membrana plasmática e um domínio intracelular com atividade tirosina quinase (SCHREIER; GEKLE; GROSSMANN, 2014). Quando estimulado, seja por ligante, seja por transativação, forma um dímero (SCHREIER; GEKLE; GROSSMANN, 2014) que ativa a Ras e, a seguir, a via de sinalização intracelular da MAPK (AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; BOKEMEYER; SCHMITZ; KRAMER, 2000; HAAS et al., 2002; JOHNS et al., 2000; YING; SANDERS, 2005). Células do músculo liso vascular (MLV) expressam o EGFR (NORTHCOTT et al., 2001; SALTIS et al., 1995) e, quando o perfil dessas muda de contrátil para proliferativo, a densidade desse receptor aumenta significativamente (SALTIS et al., 1995).

O EGFR pode ser transativado quando as células são estimuladas por OUA (AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; HAAS et al., 2002), angiotensina

II (BOKEMEYER; SCHMITZ; KRAMER, 2000; LI; LÉVESQUE; ANAND-SRIVASTAVA, 2010), endotelina-1 (DAUB et al., 1996; LI; LÉVESQUE; ANAND-SRIVASTAVA, 2010), ácido lipofosfatídico e trombina (DAUB et al., 1996). A fosforilação do EGFR pela OUA é dependente da ação da c-Src, o que fica evidente quando a inibição ou deleção dessa enzima impossibilita a transativação do receptor pelo glicosídeo (AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; BOKEMEYER; SCHMITZ; KRAMER, 2000; HAAS et al., 2002; LI; LÉVESQUE; ANAND-SRIVASTAVA, 2010).

Modelos de HA apresentam modificações na expressão gênica e proteica do EGFR. Por exemplo, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos Lyon observa-se aumento da expressão e da atividade do EGFR na membrana de células renais (SWAMINATHAN et al., 1996) e vasculares (SCOTT-BURDEN et al., 1989; SWAMINATHAN et al., 1996). As arteríolas aferentes e eferentes, assim como a aorta de ratos hipertensos Dahl/Rapp, sensíveis ao sal, também apresentam maior expressão gênica e proteica do EGFR (YING; SANDERS, 2005). Do mesmo modo, em cavéolas da membrana plasmática de células renais de ratos com HA induzida pelo tratamento crônico com OUA, também observa-se aumento da expressão proteica deste receptor (FERRANDI et al., 2004).

1.3 Ouabaína e hipertensão arterial

Como já descrito acima, a expansão de volume (GRUBER; WHITAKER; JR, 1980; HAMLIN, 1989) e a sobrecarga salina (HAMLIN, 1989; NAKAMURA et al., 1987) aumentam a concentração plasmática de OUA tanto em indivíduos normotensos quanto hipertensos. A hipótese é que, inicialmente, o aumento da OUA seja um mecanismo de escape por meio do qual os rins tentam manter a excreção renal de Na⁺ e água adequadas (HAMLIN, 1989). Este fato, associado à menor atividade da renina plasmática observada quando há aumento da volemia, tende a levar à normalização do volume e osmolaridade plasmáticos.

Contudo, além de inibir a Na⁺/K⁺ ATPase dos túbulos renais, a OUA inibe essa enzima em outros tecidos, como no MLV e nas terminações nervosas (KARAKI; OZAKI; URAKAWA, 1978; MARÍN; SÁNCHEZ-FERRER; SALICES, 1988). Inibindo

a enzima no sarcolema do MLV, a OUA aumenta o tônus vascular, a RVP e, conseqüentemente, a PA (BLAUSTEIN, 1977), pelo mecanismo de ação do *PLasmERosome* proposto por Blaustein e colaboradores (BLAUSTEIN; JUHASZOVA; GOLOVINA, 1998) e descrito no item 1.2 desta introdução. A inibição da Na^+/K^+ ATPase nas terminações nervosas, por sua vez, aumenta a liberação de neurotransmissores, como a noradrenalina, na região perivascular (MARÍN et al., 1986). Ao agir em receptores α -adrenérgicos, a noradrenalina estimula a vasoconstrição, contribuindo, em última análise, para o aumento da PA (VANHOUTTE; LORENZ, 1984). Portanto, embora a princípio a OUA induza aumento na excreção renal de Na^+ , mecanismo que busca normalizar as cifras de PA após sobrecarga salina e aumento da volemia, a manutenção da concentração plasmática de OUA elevada pode contribuir com a HA tanto por aumentar o tônus vascular de forma direta quanto por aumentar a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas perivasculares, o que aumenta o tônus vascular de forma indireta.

Outro mecanismo pelo qual a OUA favorece a origem e/ou manutenção da HA é por meio das alterações na reatividade vascular, as quais variam a depender do leito vascular e do período de tratamento estudados, conforme descrito a seguir.

As artérias aorta e mesentérica superior de animais com HA pelo tratamento crônico com OUA contraem menos à fenilefrina em comparação às dos normotensos; na artéria caudal, por outro lado, a resposta é igual entre os grupos (ROSSONI et al., 2002a, 2002b, XAVIER et al., 2004a, 2004b). A remoção do endotélio potencializa a contração nestas artérias, sendo tal potencialização maior nas artérias dos hipertensos do que dos normotensos, sugerindo que durante o tratamento crônico com OUA, o endotélio passa a ter papel mais significativo na atenuação do efeito contrátil da fenilefrina (ROSSONI et al., 2002b). Analisando os fatores derivados do endotélio envolvidos na redução da contração descrita acima, nota-se que na aorta dos animais OUA há aumento tanto da expressão quanto da atividade da Na^+/K^+ ATPase (ROSSONI 2002b). As enzimas eNOS e da nNOS estão mais expressas e suas inibições aumentam a contração à fenilefrina; o mesmo acontece quando os canais para K^+ são bloqueados neste vaso (ROSSONI et al., 2002a). Na artéria caudal, por outro lado, apenas o bloqueio dos canais para K^+ , mas não a inibição da síntese de NO, aumenta a contração (ROSSONI et al., 2002a). Estes resultados mostram que a amortização da resposta contrátil se deve a maior liberação de NO

e/ou EDHF. Já na artéria mesentérica superior, a redução da contração está associada tanto ao aumento da liberação de NO, mesmo que não haja modificação na expressão proteica da eNOS, quanto ao prejuízo na liberação de vasoconstritores derivados da COX (XAVIER et al., 2004a).

O sistema endotelina e o sistema renina-angiotensina também contribuem para o papel hipertensivo da OUA. O tratamento com losartana reduz a PA tanto nos animais VHE quanto nos animais tratados com OUA (XAVIER et al., 2004a, 2004b), sem, contudo, modificar as alterações vasculares observadas na aorta dos animais OUA (ROSSONI et al., 2002b; XAVIER et al., 2004b). Ou seja, a contração à fenilefrina permanece reduzida e a expressão da eNOS aumentada nas aortas dos animais OUA quando comparados aos controle (XAVIER et al., 2004b). Por outro lado, o antagonismo dos receptores ET_A previne o desenvolvimento da HA em animais tratados cronicamente com OUA, o que é acompanhado da normalização da contração da aorta à fenilefrina e da expressão proteica de eNOS (XAVIER et al., 2004b). Juntos, os achados do trabalho de Xavier e colaboradores mostram que, embora tanto a endotelina-1 quanto a angiotensina II contribuam para a origem da HA causada pela OUA, somente a endotelina-1 está associada às alterações vasculares na aorta destes animais.

Até esse momento, as alterações na reatividade vascular causadas pela OUA foram discutidas apenas em relação aos vasos de condutância. Contudo, vale ressaltar que os vasos de resistência, os quais são os principais controladores vasculares da PA, também sofrem modificação da resposta após o tratamento crônico com esse hormônio. Por exemplo, as artérias mesentéricas de resistência (AMR) e as artérias basílicas de ratos tratados por cinco semanas com OUA não apresentam diferença na contração à noradrenalina e à serotonina, respectivamente (HERNANZ et al., 2008; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004a). Nas AMR, esta resposta é acompanhada do aumento da biodisponibilidade de NO, mesmo que não haja diferença na expressão proteica da eNOS (XAVIER et al., 2004a). Nas artérias cerebrais dos animais OUA, a produção basal de NO também está aumentada, apesar de não haver aumento na expressão proteica das isoformas neuronal e endotelial da NOS nesses vasos (HERNANZ et al., 2008). Há, também, redução da produção de ânion superóxido nas artérias cerebrais destes animais, fato que pode contribuir para que a biodisponibilidade de NO esteja aumentada (HERNANZ et al., 2008).

O prolongamento do tratamento com OUA por vinte semanas causa alterações adicionais na resposta vascular. Após este período, a contração à noradrenalina das AMR dos animais hipertensos aumenta em relação aos animais controle, evento acompanhado do prejuízo da capacidade do endotélio em reduzir a contração, bem como ao aumento da produção de ânion superóxido nesse vaso (WENCESLAU et al., 2011). Há aumento da expressão proteica da COX-2 e da participação de seus derivados prostanóides na contração vascular, assim como aumento da expressão de mediadores inflamatórios (IL-6 e TNF α) nas AMR dos animais hipertensos (WENCESLAU et al., 2011).

Além das alterações na função endotelial descritas acima, o tratamento durante cinco semanas com OUA causa remodelamento hipotrófico para dentro nas AMR (redução do diâmetro interno e da área de secção transversa), acompanhado do aumento da deposição de colágeno na camada média e, conseqüentemente, aumento na rigidez vascular (BRIONES et al., 2006), resultados que sugerem que as alterações funcionais e/ou estruturais dos vasos sanguíneos são uma possível via pela qual a OUA contribui para a gênese e manutenção da HA.

Considerando a participação da OUA no desenvolvimento da HA, pode-se supor que contrapor os seus efeitos seja uma forma de atenuar ou impedir o aparecimento da doença. Nesta perspectiva, foi sintetizada a rostafuroxina, molécula que interage seletivamente com a Na⁺/K⁺ ATPase, deslocando a OUA e antagonizando seus efeitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FERRARI et al., 1998). Já foi demonstrado que a rostafuroxina reduz a PA em animais tratados cronicamente com OUA (FERRANDI et al., 2004; FERRARI et al., 1998), no modelo DOCA-sal (WENCESLAU; ROSSONI, 2014) e em animais com pré-disposição genética ao desenvolvimento da doença, como é o caso dos ratos hipertensos de Milão (MHS) (FERRARI et al., 2006). De forma interessante, a rostafuroxina não interage com outros receptores associados ao controle da PA, como os adrenérgicos, serotoninérgicos e muscarínicos, por exemplo (FERRARI et al., 1998). Além disso, efeitos colaterais comuns após o uso de hidroclorotiazida (diurético amplamente empregado no tratamento da HA), como aumento de glicemia e uremia, diminuição dos eletrólitos plasmáticos e ativação do sistema renina-angiotensina, não são observados em animais tratados com rostafuroxina (FERRANDI et al., 2002). Seus efeitos anti-hipertensivos requerem o uso contínuo, uma vez que a suspensão do

tratamento faz com que os animais voltem a apresentar aumento nas cifras pressóricas (FERRARI et al., 1998, 1999).

A redução da PA em ratos hipertensos DOCA-sal tratados com rostafuroxina é acompanhada da melhora da resposta vasodilatadora das AMR à acetilcolina, o que está associado a maior biodisponibilidade de NO e menor produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase e pela COX-2, bem como à diminuição da fosforilação da c-Src^{Tyr418} (WENCESLAU; ROSSONI, 2014), proteína que ativa uma das vias do *signalosome*, descrita no item 1.2 desta introdução. A atividade da Na⁺/K⁺ ATPase não é modificada pelo tratamento com rostafuroxina, reforçando a afirmação de que este composto, de fato, não é um inibidor enzimático, mas sim um antagonista da OUA (WENCESLAU; ROSSONI, 2014).

1.4 Remodelamento vascular: estrutura e mecânica

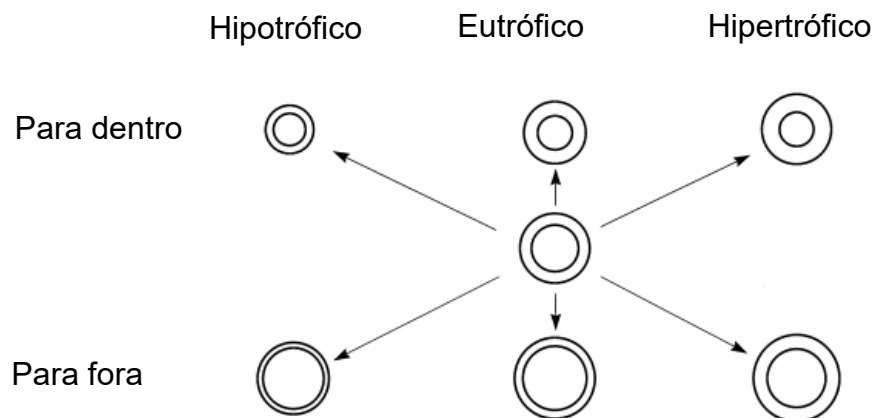
Embora mudanças na reatividade vascular contribuam para o desenvolvimento e manutenção da HA, alterações da estrutura e mecânica vascular, principalmente nas artérias de resistência, também são de grande importância para o estabelecimento e manutenção da doença (MULVANY, 1999). Os vasos de resistência, cujo diâmetro interno é menor ou igual a 300 µm (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001; MULVANY, 2002), controlam a PA por meio da resistência que oferecem ao fluxo sanguíneo (MULVANY, 1999). A resistência é inversamente proporcional ao raio do vaso à quarta potência, segundo a Lei de Poiseuille ($R = 8.\eta.L/\pi.r^4$), o que significa que pequenas alterações no diâmetro vascular levam à mudanças significativas da PA.

Os determinantes do diâmetro dos vasos são suas propriedades ativas e passivas (MULVANY, 1999). A propriedade passiva é analisada por meio da relação entre pressão intravascular e diâmetro vascular em condições onde os miócitos estão completamente relaxados (MULVANY, 1999). Já as propriedades ativas refletem o nível de ativação das células do MLV, bem como a quantidade e arranjo destas células (MULVANY, 1999). As propriedades ativas podem ser correlacionadas à lei de Laplace ($T = P.r/2h$). Por exemplo, quando o vaso é distendido pelo aumento da

pressão transmural, este gera força contrátil, que diminui o raio vascular e opõem-se ao estiramento inicial promovido pela elevação da PA; tal força contrátil é proporcional à espessura da camada média vascular. Ou seja, quanto mais espessa a parede vascular, maior a força de contração gerada (MULVANY, 1999).

Na HA ocorre um fenômeno conhecido como remodelamento vascular (BAUMBACH et al., 1988; BAUMBACH; HEISTAD, 1989; FOLKOW, 1982; FOLKOW; GRIYBY; THULESIUS., 1958; HEAGERTY et al., 1993; INTENGAN et al., 1999a, 1999b; KORSGAARD; MULVANY, 1988; MULVANY, 1999; SHORT, 1966), que pode estar associado à mudanças na espessura da parede vascular ou apenas a um rearranjo dos componentes estruturais dessa camada, sem que haja, necessariamente, aumento ou diminuição da camada média dos vasos (HEAGERTY et al., 1993). No que diz respeito ao diâmetro vascular, caso este aumente, o remodelamento é dito para fora; se houver diminuição, o remodelamento é para dentro (HEAGERTY et al., 1993; MULVANY, 1999). Com relação à área de secção transversa, o remodelamento pode ser seguido do aumento, diminuição ou apenas rearranjo da área da artéria estudada, sendo assim classificado como hipertrófico, hipotrófico ou eutrófico, respectivamente (HEAGERTY et al., 1993; MULVANY, 1999). Os tipos de remodelamento vascular estão exemplificados na figura 2.

Figura 2 - Tipos de remodelamento vascular



O remodelamento vascular é classificado de acordo com as alterações no diâmetro interno e na área de secção transversa. A depender do diâmetro interno, o remodelamento pode ser para dentro (redução do diâmetro interno) ou para fora (aumento do diâmetro interno). A depender da área de secção transversa, o remodelamento pode ser hipertrófico (aumento da área de secção transversa), hipotrófico (diminuição da área de secção transversa) ou eutrófico (sem modificação no tamanho, apenas rearranjo dos elementos da área de secção transversa). Modificado de Mulvany, 1999.

Além das alterações estruturais, os vasos podem sofrer alterações mecânicas, que também contribuem com a HA (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). A mecânica vascular depende diretamente da composição da matriz extracelular (MEC), cujos dois principais constituintes são o colágeno e a elastina (DOBRIN, 1978; HOEFER; DEN ADEL; DAEMEN, 2013; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). A HA primária tem duas características típicas: redução do diâmetro interno e aumento da rigidez vascular, as quais contribuem para o aumento da RVP e comprometimento da complacência vascular, respectivamente (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006). Trabalhos apontam que o aumento da rigidez de vasos como a AMR, está, geralmente, acompanhado do aumento da deposição de colágeno (BRIONES et al., 2006; INTENGAN et al., 1999b, 1999a; QUEK et al., 2016).

O colágeno é uma proteína estrutural formada a partir da interação de três cadeias polipeptídicas secretadas na MEC (JACOB et al., 2001; KADLER et al., 2007) que, quando agrupadas, formam uma estrutura relativamente rígida, sendo tal rigidez fundamental para a função biológica da proteína (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995). Pelo menos vinte e oito subtipos de colágeno já foram identificados nos vertebrados

(KADLER et al., 2007), dentre os quais os dois principais encontrados na parede vascular são os subtipos I e III (GILLIGAN; SPECTOR, 1984; JACOB et al., 2001; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995). A principal função do colágeno nos vasos é limitar a distensão vascular (BRIONES; ARRIBAS; SALICES, 2010). Em condições fisiológicas, a porcentagem de colágeno em artérias de humanos é de, aproximadamente, 70% de fibras tipo III e 30% de fibras tipo I (MCCULLAGH; BALIAN, 1975). Em doenças, como a aterosclerose, por exemplo, há mudança do perfil de distribuição e o colágeno tipo I, mais rígido, passa a ser mais abundante (MCCULLAGH; BALIAN, 1975; MORTON; BARNES, 1982).

Um dos estimuladores da síntese de colágeno é o TGF β (BORDER; NOBLE, 1994; ROBERTS et al., 1986), fator de crescimento que foi primeiramente isolado de células tumorais (ROBERTS et al., 1980) e, a seguir, de células não tumorais (ROBERTS et al., 1981). É secretado na MEC na forma latente e, quando clivado, é ativado e passa a exercer seus efeitos proliferativos (ANNES; MUNGER; RIFKIN, 2003).

Em mamíferos, o TGF β é sintetizado em três isoformas: TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3, sendo a isoforma β 1 a mais relacionada aos eventos de fibrose (BORDER; NOBLE, 1994). O TGF β interage com dois subtipos de receptores: receptor para TGF β tipo I e receptor para TGF β tipo II (RUIZ-ORTEGA et al., 2007). A via canônica pela qual o TGF β modula a produção de componentes da MEC é a via das Smad (HAYASHIDA; DECAESTECKER; SCHNAPER, 2003; KHUMAN et al., 2016). A interação do TGF β com seus receptores forma um complexo que é internalizado para o citoplasma, onde fosforila proteínas Smad, em especial as Smad 2/3, que migram para o núcleo e controlam a transcrição de genes como os do pró-colágeno, fibronectina e CTGF (*connective tissue growth factor*), aumentando suas expressões (RUIZ-ORTEGA et al., 2007). A Smad 7, ao contrário das 2/3, é um contrarregulador das funções do TGF β (RUIZ-ORTEGA et al., 2007).

A ação proliferativa do TGF β 1 também é mediada pelo CTGF (GROTENDORST; OKOCHI; HAYASHI, 1996; IGARASHI et al., 1993). O CTGF foi isolado e caracterizado em células endoteliais da veia umbilical de humanos e representa, aproximadamente, 50% do total de fatores de crescimento liberados por essas células (BRADHAM et al., 1991). Estimula tanto a transcrição de DNA quanto a

síntese de proteínas da MEC, como o colágeno tipo I e a fibronectina, sendo seus efeitos proliferativos observados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FRAZIER et al., 1996).

Embora o CTGF seja constitutivamente expresso em diferentes tecidos (BRUNNER et al., 1991; OEMAR et al., 1997; OHNISHI et al., 1998), e desempenhe papel importante, por exemplo, durante processos de reparo tecidual (IGARASHI et al., 1993), sua expressão pode tornar-se exacerbada em doenças como aterosclerose (OEMAR et al., 1997) e HA (KHUMAN et al., 2016) e após lesões decorrentes do infarto agudo do miocárdio (OHNISHI et al., 1998), contribuindo para o aumento da deposição de colágeno e fibrose tecidual.

A degradação do colágeno é feita pelas enzimas da família das metaloproteinases de matriz (MMP), dentre as quais estão as colagenases (MMP-1) e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) (JACOB et al., 2001; WOJTOWICZ-PRAGA; DICKSON; HAWKINS, 1997). As MMP degradam tanto o colágeno em sua forma estrutural quanto na forma fibrilar (EISEN; JEFFREY; GROSS, 1968) e apresentam algumas características em comum: são secretadas na MEC em sua forma inativa (BAUER; STRICKLIN; JEFFREY, 1975; STRICKLIN et al., 1977); dependem do zinco para sua atividade catalítica; clivam um ou mais componentes da MEC e têm sua atividade controlada pelas TIMP (RAFFETTO; KHALIL, 2008; WOESSNER, 1991). As TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) são inibidores endógenos das MMP, identificadas, a princípio, como pequenas moléculas secretadas por fibroblastos de humanos (WOOLLEY; ROBERTS; EVANSON, 1975), tendo sido purificadas e caracterizadas em 1983 (STRICKLIN; WELGUS, 1983). Até o momento, quatro membros da família das TIMP foram identificados (TIMP 1-4) (AMALINEI; CARUNTU; BALAN, 2007). Embora as TIMP inibam todas as MMP, há especificidade na interação entre essas proteínas: enquanto as MMP-1 e -9 são inibidas principalmente pela TIMP-1, a MMP-2 é inibida por ação da TIMP-2 (HOPPS; PRESTI; CAIMI, 2017). Além de aumentar a deposição de colágeno, o TGF β , associado a outros fatores de crescimento, aumenta a expressão de TIMP e diminui a expressão de colagenases (EDWARDS et al., 1987). Ou seja, estimulando a síntese ou inibindo a degradação, o TGF β promove aumento da quantidade de colágeno na MEC.

A deposição de colágeno na parede vascular de humanos e de diferentes modelos animais de HA é maior do que a observada nos indivíduos normotensos, o que já foi constatado tanto em vasos periféricos (BRIONES et al., 2006; ERGUL et al.,

2004; FUKUMOTO et al., 1984; INTENGAN et al., 1999b, 1999a; IWATSUKI et al., 1977; NAKADA et al., 1996; OOSHIMA et al., 1974; RIZZONI et al., 2006), quanto em vasos do sistema nervoso central (BRAYDEN; HALPERN; BRANN, 1983; OOSHIMA A, 1975).

Chamando atenção para os ratos hipertensos DOCA-sal, nesses observa-se aumento da atividade da prolil-hidroxilase, da incorporação de prolina e do conteúdo de colágeno na aorta e na artéria mesentérica (IWATSUKI et al., 1977). De forma interessante, nas veias cava e mesentérica destes animais não há diferença nos marcadores da produção de colágeno, o que sugere que o aumento da proteína em casos de HA se restringe aos leitos onde há aumento da PA, como é o caso das artérias, mas não das veias (IWATSUKI et al., 1977).

A elastina, outra proteína da MEC, é um polímero constituído de monômeros de tropoelastina (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006; DEBELLE; ALIX, 1999; DEBELLE; TAMBURRO, 1999). Tem meia vida longa, sendo sua síntese mais intensa no período fetal e início do período pós-natal (ARRIBAS; HINEK; GONZÁLEZ, 2006). Nas artérias de resistência, a elastina é encontrada apenas nas lâminas elásticas interna e externa (JACOB et al., 2001). Além de conferir distensibilidade aos vasos (BRIONES et al., 2003), a elastina auxilia na manutenção da geometria vascular, afirmação fundamentada em estudos que mostram que a degradação da elastina por ação da elastase altera a estrutura vascular, aumentando o diâmetro interno e a área de secção transversa e diminuindo a razão parede/luz em AMR de ratos WKY e SHR (BRIONES et al., 2003).

Embora a elastina tenha um baixo *turnover*, sua síntese pode ser estimulada em casos de estiramento das células do MLV (SUTCLIFFE; DAVIDSON, 1990) ou de aumento da PA (KEELEY; JOHNSON, 1986). Contudo, as modificações da lâmina elástica variam a depender do leito vascular estudado. As arteríolas cerebrais de SHRSP são mais distensíveis do que a dos WKY (BAUMBACH et al., 1988), devido a maior deposição de elastina nesses vasos (BAUMBACH; WALMSLEY; HART, 1988). Por outro lado, as AMR dos SHR são mais rígidas do que as dos WKY, devido a modificações na organização, mas não na quantidade da elastina (BRIONES et al., 2003). Neste caso, o que ocorre é a diminuição do número de fenestras nas AMR dos animais hipertensos quando comparados aos controles (BRIONES et al., 2003). A redução no número de fenestras leva à redução das unidades lamelares, pontos onde

a elastina interage com o MLV e exerce seus efeitos de distensibilidade. Como consequência, há aumento da rigidez. Em ratos com doença renal crônica, a densidade de elastina na aorta é reduzida, devido à maior fragmentação dessa proteína (AMEER et al., 2016) e, ainda, há redução da espessura das fibras elásticas remanescentes (AMEER et al., 2016).

Tomados em conjunto, os dados acima nos mostram que tão importante quanto o papel mecânico, é o papel estrutural da elastina. Alterações na composição e/ou organização desta proteína, associada à alteração na deposição de colágeno, modificam a rigidez e estrutura vascular, o que pode ser um dos fatores associados ao desenvolvimento ou manutenção da HA.

1.5 *Ouabaína, endotelina-1 e remodelamento vascular*

Levando em consideração que o tratamento durante cinco semanas com OUA cursa com remodelamento vascular de artérias de resistência (BRIONES et al., 2006; DE-FRANÇA-NETO, 2016) pode-se inferir que, em modelos onde há aumento da produção endógena desse hormônio, como é o caso do DOCA-sal, o mesmo deva ocorrer. De fato, diferentes leitos vasculares de ratos DOCA-sal sofrem remodelamento, como visto nas artérias aorta, coronária, renal, femoral e mesentérica (LI; TURGEON; SCHIFFRIN, 1998; LI; LARIVIÈRE; SCHIFFRIN, 1994; SCHIFFRIN et al., 1996; DENG, 1992).

O remodelamento vascular é desencadeado por diversos mediadores (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004), dentre eles a angiotensina II e produtos derivados da COX. A angiotensina II, cuja liberação pode ser estimulada, inclusive, pela OUA (PADILHA et al., 2004), induz remodelamento por meio de sua ação nos receptores AT₁ (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004; VIRDIS et al., 2012). A OUA aumenta, ainda, a expressão da enzima COX-2 (PADILHA et al., 2008; WENCESLAU et al., 2011), que contribui para os processos de remodelamento em artérias de animais hipertensos (AVENDAÑO et al., 2016; VIRDIS et al., 2012). Contudo, no modelo DOCA-sal, que cursa com aumento da concentração tecidual de endotelina-1 em artérias de condutância (LARIVIÈRE; THIBAUT; SCHIFFRIN, 1993; LI et al., 2003; LIU et al.,

2012) e de resistência (LARIVIÈRE; THIBAUT; SCHIFFRIN, 1993), esse peptídeo também se torna importante nos eventos de remodelamento vascular.

A endotelina (ET) é uma proteína formada por 21 aminoácidos que foi clonada e caracterizada em células endoteliais (YANAGISAWA et al., 1988). Deriva de uma proteína maior, a pré-pró-endotelina, que é clivada pela furina convertase, formando *big*-endotelina, a qual é convertida a ET por ação da enzima conversora de endotelina (GAO; CHEN; RAJ, 2016; KHIMJI; ROCKEY, 2010). Além de ser constitutivamente secretada pelas células endoteliais, a ET pode ser secretada por células do MLV, quando essas são estimuladas por agentes como vasopressina, angiotensina II, fatores de crescimento e a própria ET (HAHN et al., 1990). Três isopeptídeos de ET são produzidos nos mamíferos: ET-1, ET-2 e ET-3 e, dentre eles, o principal sintetizado pelas células vasculares é a ET-1 (KHIMJI; ROCKEY, 2010; SCHIFFRIN, 2005). Este peptídeo age em dois receptores, ET_A e ET_B, que estão localizados tanto nas células endoteliais quanto no MLV (BATRA et al., 1993; DENG; LI; SCHIFFRIN, 1995; IHARA et al., 1991).

Além do potente efeito vasoconstritor, fisiologicamente, a ET-1 também induz mitogênese. Células de MLV incubadas com ET-1 têm aumento da proliferação (HIRATA et al., 1989; KOIDE et al., 1992; WHELCHER; EVANS; POSADA, 1997; YAMBOLIEV; HRUBY; GERTHO, 1998) e a via que conduz à tal resposta é dependente do aumento da fosforilação e atividade das proteínas Ras, c-RAF, ERK 1/2 e p38 MAPK (WHELCHER; EVANS; POSADA, 1997; YAMBOLIEV; HRUBY; GERTHO, 1998; YOGI et al., 2007), todas proteínas da via da MAPK. É interessante citar que toda a ativação da via MAPK pela ET-1 ocorre de forma independente da participação da c-Src (YOGI et al., 2007).

Em modelos de HA maligna e DOCA-sal, a bosentana, antagonista dos receptores ET_A e ET_B, atenua o aumento da PA, o que é acompanhado da prevenção total ou parcial de alterações estruturais em diferentes leitos vasculares (LI; LARIVIÈRE; SCHIFFRIN, 1994; LI; SCHURCH; SCHIFFRIN, 1996). As alterações estruturais em artérias coronária, renal e AMR de ratos DOCA-sal são atenuadas ou prevenidas pelo tratamento com bosentana: deixam de existir variações do diâmetro interno e da área de secção transversa, e os aumentos da espessura da parede e da razão parede/luz são menores do que nos animais hipertensos não tratados (LI; LARIVIÈRE; SCHIFFRIN, 1994; LI; SCHURCH; SCHIFFRIN, 1996). Além disso, a

bosentana previne a necrose fibrinóide em vasos renais (LI; SCHURCH; SCHIFFRIN, 1996). Quando os receptores ET_A são seletivamente antagonizados, a prevenção do remodelamento vascular nestes mesmos vasos ainda é observada, porém, em magnitude um pouco menor do que quando se utiliza o antagonista não seletivo, sugerindo que ambos os receptores, ET_A e ET_B, contribuem para o remodelamento vascular (LI; TURGEON; SCHIFFRIN, 1998).

A ET-1 também coopera para modificações da composição da MEC, visto que aumenta a deposição dos subtipos I e III de colágeno (GUARDA et al., 1993), reduz a atividade das colagenases (GUARDA et al., 1993) e, via receptor ET_A e ativação da via da MAPK, aumenta a expressão gênica e proteica de CTGF em células do MLV (RODRIGUEZ-VITA et al., 2005). Quando o CTGF é antagonizado, a deposição de colágeno tipo I e fibronectina mediada pela ET-1 é atenuada, indicando que o CTGF é o responsável pelos efeitos fibróticos do peptídeo (RODRIGUEZ-VITA et al., 2005). Embora o TGFβ1 seja um clássico ativador do CTGF, os resultados de Rodriguez-Vita e colaboradores mostram que a ET-1 é capaz de ativar o CTGF de uma maneira que independe da participação do TGFβ1 (RODRIGUEZ-VITA et al., 2005).

A contribuição da ET-1 na fibrose é reforçada quando, ao se antagonizar o receptor ET_A, observa-se a diminuição a expressão de TGFβ1 e mRNA do pró-colágeno tipo I, bem como da deposição de colágeno e fibronectina em animais hipertensos DOCA-sal, SHRSP e tratados com aldosterona (AMMARGUELLAT; LAROCHE; SCHIFFRIN, 2001; PU et al., 2003; TOSTES et al., 2002). Ainda, animais nocaute para o gene da ET-1, especificamente nas células endoteliais, apresentam menor fibrose no tecido cutâneo do que os animais selvagens, evento acompanhado tanto da menor expressão de mRNA para colágeno I e TGFβ1, quanto da menor deposição de colágeno tecidual (MAKINO et al., 2014).

Compilados, os dados acima mostram que a ET-1, via receptores ET_A e ET_B, é capaz de ativar a via da MAPK e induzir mitogênese, evento que, diferente da OUA, ocorre de forma independente da fosforilação da c-Src. Além disso, a ET-1 também está associada com eventos de remodelamento da MEC, como a alteração na deposição das fibras de colágeno, por exemplo. Assim, é possível inferir que a ET-1, a qual tem expressão tecidual aumentada em animais do modelo DOCA-sal, possa agir em sinergia com a OUA para promover as alterações estruturais e mecânicas

observadas nas AMR dos ratos DOCA-sal descritas a seguir, no item 1.6 da introdução.

1.6 Hipertensão DOCA-sal, antagonismo da ouabaína endógena e remodelamento vascular

Resultados do laboratório de Fisiologia Vascular, ainda não publicados (ISHIKAWA et al., 2017), avaliaram o antagonismo da OUA endógena, utilizando a rostafuroxina, sobre a estrutura e mecânica de AMR de ratos DOCA-sal. Observou-se que as AMR dos ratos DOCA-sal têm redução do diâmetro interno quando comparadas as artérias dos animais unifrectomizados controle (SHAM) e o tratamento com rostafuroxina reverte essa alteração, restabelecendo o diâmetro interno ao que é observado nas AMR dos SHAM. Por sua vez, as AMR dos DOCA-sal apresentam área de secção transversa maior que a dos animais SHAM, alteração que é parcialmente reduzida após tratamento com rostafuroxina. O aumento da razão parede/luz que é observado nas AMR dos animais DOCA-sal também é parcialmente reduzido após tratamento com rostafuroxina, trazendo essa variável para valores próximos aos observados nas AMR dos SHAM. Por sua vez, as AMR dos DOCA-sal são menos distensíveis e mais rígidas do que a dos animais SHAM, alterações essas que são atenuadas e revertidas, respectivamente, pelo tratamento com rostafuroxina.

Agrupados, estes resultados mostraram que as AMR de animais hipertensos DOCA-sal apresentam remodelamento hipertrófico para dentro, acompanhado de redução de distensibilidade e aumento da rigidez vascular. A rostafuroxina restaura o diâmetro interno e a rigidez e atenua o aumento na AST e a redução da distensibilidade, contribuindo para a redução da razão parede/luz nas AMR e da PA nos ratos DOCA-sal (ISHIKAWA et al., 2017).

1.7 Hipótese e objetivo

Em conjunto, os dados apresentados acima permitem levantar a hipótese de que as alterações estruturais e mecânicas das AMR dos animais hipertensos DOCA-

sal envolvem a participação da OUA endógena, e que a mesma se deve tanto a ativação do complexo Na^+/K^+ ATPase-Scr-MAPK quanto da via de crescimento celular induzida pela ET-1. Dessa forma, o **objetivo** desta dissertação foi avaliar os mecanismos de sinalização celular envolvidos nas mudanças estruturais e mecânicas das AMR de ratos DOCA-sal tratados com rostafuroxina, mais especificamente, nas vias envolvidas com a deposição e expressão de agentes pró-fibróticos, bem como na via da MAPK e de alguns mediadores capazes de ativá-la.

5 CONCLUSÃO

O remodelamento vascular observado nas AMR dos animais hipertensos DOCA-sal é acompanhado do aumento da razão de colágenos I/III, do espessamento da LEI e da maior expressão proteica de fatores pró-fibróticos, da c-Src^{Tyr418}, do EGFR e de componentes da MAPK, alterações revertidas por meio do tratamento com rostafuroxina. Com relação ao sistema endotelina, a rostafuroxina normalizou a aumentada expressão dos receptores ET_B observada nas AMR dos animais hipertensos DOCA-sal, sem alterações significativas na expressão nem de ET-1 nem dos receptores ET_A.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- 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.
- AMALINEI, C.; CARUNTU, I.-D.; BALAN, R. A. Biology of metalloproteinases. **Romanian Journal of Morphology and Embriology**, v. 48, n. 4, p. 323–334, 2007.
- AMEER, O. Z. et al. Long-Term Angiotensin II Receptor Blockade Limits Hypertension , Aortic Dysfunction , and Structural Remodeling in a Rat Model of Chronic. **Journal of Vascular Research**, v. 53, p. 216–229, 2016.
- AMMARGUELLAT, F.; LAROUCHE, I.; SCHIFFRIN, E. L. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats. Effect of endothelin ETA receptor antagonism. **Circulation**, v. 103, p. 319–324, 2001.
- ANNES, J. P.; MUNGER, J. S.; RIFKIN, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 217–224, 2003.
- ARRIBAS, S. M.; HINEK, A.; GONZÁLEZ, M. C. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 111, p. 771–791, 2006.
- AVENDAÑO, M. S. et al. Role of COX-2-derived PGE2 on vascular stiffness and function in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, p. 1541–1555, 2016.
- AYDEMIR-KOKSOY, A.; ABRAMOWITZ, J.; ALLEN, J. C. Ouabain-induced Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46605–46611, 2001.
- BATRA, V. K. et al. ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. 479–484, 1993.
- BAUER, E. A.; STRICKLIN, GEORGE P.; JEFFREY, J. J. Collagenase production by human skin fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 64, p. 232–240, 1975.
- BAUER, N. et al. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: Effects of β -blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v. 45, p. 1024–1028, 2005.
- BAUMBACH, G. L. et al. Mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. **American Journal of Pathology**, v. 133, n. 3, p. 464–471, 1988.
- BAUMBACH, G. L.; HEISTAD, D. D. Remodeling of Cerebral Arterioles in Chronic Hypertension. **Hypertension**, v. 13, p. 968–972, 1989.
- BAUMBACH, G. L.; WALMSLEY, J. G.; HART, M. N. Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. **American Journal of Pathology**, v. 133, n. 1, p. 464–471, 1988.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BERTHON, N. et al. Effect of magnesium on mRNA expression and production of endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 24–31, 2003.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium Ions, Calcium-Ions, Blood-Pressure Regulation, and Hypertension - Reassessment and a Hypothesis. **American Journal of Physiology**, v. 232, p. 165–173, 1977.

BLAUSTEIN, M. P.; JUHASZOVA, M.; GOLOVINA, V. A. The cellular mechanisms of action of cardiotoxic steroids: a new hypothesis. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 20, p. 691–703, 1998.

BOKEMEYER, D.; SCHMITZ, U.; KRAMER, H. J. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. **Kidney International**, v. 58, n. 2, p. 549–558, 2000.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 10, p. 1286–1292, 1994.

BRADHAM, D. M. et al. Connective Tissue Growth Factor: a Cysteine-rich Mitogen Secreted by Human Vascular Endothelial Cells Is Related to the SRC-induced Immediate Early Gene Product CEF10. **The Journal of Cell Biology**, v. 114, n. 6, p. 1285–1294, 1991.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, nº 37. Hipertensão Arterial Sistêmica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRAYDEN, J. E.; HALPERN, W.; BRANN, L. R. Biochemical and mechanical properties of resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 5, p. 17–25, 1983.

BRIONES, A. M. et al. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 185–95, 2003.

BRIONES, A. M. et al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 1, p. 193–201, 2006.

BRIONES, A. M.; ARRIBAS, S. M.; SALAICES, M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 19, p. 187–194, 2010.

BRUNNER, A. et al. Identification of Gene Family Regulated Transforming Growth Factor- β . **DNA and Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 293–300, 1991.

CALLERA, G. E. et al. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 4 II, p. 811–817, 2003.

CARNEIRO, F. S. **Papel do fator de necrose tumoral (TNF- α) na fisiopatologia da disfunção erétil**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

CHRISTENSEN, K. L.; MULVANY, M. J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2001.

DAUB, H. et al. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 557–560, 1996.

DAVID, F. L. et al. Gender differences in vascular expression of endothelin and ETA/ETB receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1061–1068, 2002.

DE-FRANÇA-NETO, A. **Estudo dos mecanismos envolvidos no remodelamento de artérias de resistência de ratos hipertensos induzidos pelo tratamento com ouabaína.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

DE ANGELIS, C.; HAUPERT JR., G. T. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase from midbrain and adrenal. **American Physiological Society**, v. 274, p. 182–188, 1998.

DE WARDENER, H. E. et al. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. **Clinical Science**, v. 21, p. 249–258, 1961.

DEBELLE, L.; ALIX, A. J. E. The structure of elastins and their function. **Biochemie**, v. 81, p. 981–994, 1999.

DEBELLE, L.; TAMBURRO, A. M. Elastin: molecular description and function. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 31, p. 261–272, 1999.

DENG L.Y., SCHIFFRIN E.L. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, n^o 262, p. 1782-1787, 1992

DENG, L.-Y.; LI, J.-S.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelin receptor subtypes in resistance arteries from humans and rats. **Cardiovascular Research**, v. 29, p. 532–535, 1995.

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

DONG, F. et al. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ET B receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, p. 323–333, 2005.

DOSTANIC-LARSON, I. et al. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 44, p. 15845–15850, 2005.

DRUMMOND, C. A. et al. Na/K-ATPase signaling regulates collagen synthesis through microRNA-29b-3p in cardiac fibroblasts. **Physiological Genomics**, v. 48, n. 3, p. 220–229, 2016.

EDWARDS, D. R. et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 7, p. 1899–1904, 1987.

EISEN, A. Z.; JEFFREY, J. J.; GROSS, J. Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 151, p. 637–645, 1968.

ERGUL, A. et al. Downregulation of Vascular Matrix Metalloproteinase Inducer and Activator Proteins in Hypertensive Patients. **American Journal of Hypertension**, v. 17, p. 775–782, 2004.

FAREH, J. et al. Altered cardiac endothelin receptors and protein kinase C in deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 4, p. 665–676, 2000.

FAVERO, G. et al. Changes in extracellular matrix in subcutaneous small resistance arteries of patients with essential hypertension. **Blood Pressure**, v. 7051, p. 1–9, 2018.

FERRANDI, M. et al. PST 2238: a new antihypertensive compound that modulates renal Na-K pump function without diuretic activity in Milan hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 881–889, 2002.

FERRANDI, M. et al. Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33306–33314, 2004.

FERRARI, P. et al. PST2238: a new antihypertensive compound that antagonizes the long-term pressor effect of ouabain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, n. 1, p. 83–94, 1998.

FERRARI, P. et al. PST 2238: A new antihypertensive compound that modulates Na,K-ATPase in genetic hypertension. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 3, p. 1074–1083, 1999.

FERRARI, P. et al. Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na⁺-K⁺-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. **American Journal of Physiology**, v. 290, n. 3, p. 529–535, 2006.

FOLKOW, B. Physiological Aspects of Primary Hypertension. **The American Physiological Society**, v. 62, n. 2, p. 347–504, 1982.

FOLKOW, B.; GRIYBY, G.; THULESIUS., O. Adaptive Structural Changes of the Vascular Walls in Hypertension and their Relation to the Control of the Peripheral Resistance. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 44, n. 3–4, p. 255–272, 1958.

FRAZIER, K. et al. Stimulation of Fibroblast Cell Growth, Matrix Production, and Granulation Tissue Formation by connective Tissue Growth factor. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, p. 404–411, 1996.

FUKUMOTO, M. et al. Effects of prolyl hydroxylase inhibition on arterial collagen synthesis and blood pressure in hypertensive rats. **Pharmacology**, v. 29, p. 255–263, 1984.

GAO, Y.; CHEN, T.; RAJ, J. U. Endothelial and smooth muscle cell interactions in the pathobiology of pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 4, p. 451–460, 2016.

GILLIGAN, J. P.; SPECTOR, S. Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. **Hypertension**, v. 6, p. 44–49, 1984.

GLITSCH, B. Y. H. G.; REUTER, H.; SCHOLZ, H. The internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. **Journal of Physiology**, v. 209, p. 25–43, 1970.

GROTENDORST, G.; OKOCHI, H.; HAYASHI, N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor

- gene. **Cell Growth & Differentiation**, v. 7, p. 469–480, 1996.
- GRUBER, K. A.; WHITAKER, J. M.; JR, V. M. B. Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs. **Nature**, v. 287, n. 23, p. 743–745, 1980.
- GUARDA, E. et al. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. **Cardiovascular Research**, v. 27, p. 2130–2134, 1993.
- GUYTON, A. C. The relationship of cardiac output and arterial pressure control. **Circulation**, v. 64, n. 6, p. 1079–1088, 1981.
- 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18694–18702, 2002.
- HAAS, M.; ASKARI, A.; XIE, Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27832–27837, 2000.
- HAHN, A. W. A. et al. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. **Cell Regulation**, v. 1, p. 649–659, 1990.
- HAMLYN, J. M. Increased levels of a humoral digitalis-like factor in deoxycorticosterone acetate-induced hypertension in the pig. **Journal of Endocrinology**, v. 122, p. 409–420, 1989.
- HAMLYN, J. M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6259–6263, 1991.
- HAMLYN, J. M. et al. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 20, n. 5–6, p. 523–33, 1998.
- HAYASHIDA, T.; DECAESTECKER, M.; SCHNAPER, H. W. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad-signaling pathways enhances TGF- β dependent responses in human mesangial cells. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 11, p. 1576–1578, 2003.
- HEAGERTY, A. M. et al. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. **Hypertension**, v. 21, n. 4, p. 391–397, 1993.
- HERNANZ, R. et al. Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. **Journal of Hypertension**, v. 26, p. 1944–1954, 2008.
- HIBBERD, M. G.; JEWELL, B. R. Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. **Journal of Physiology**, v. 329, p. 527–540, 1982.
- HIRATA, Y. et al. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 78, p. 225–228, 1989.
- HOEFER, I. E.; DEN ADEL, B.; DAEMEN, M. J. A. P. Biomechanical factors as triggers of vascular growth. **Cardiovascular Research**, v. 99, p. 276–283, 2013.
- HOPPS, E.; PRESTI, R. LO; CAIMI, G. Matrix Metalloproteases in Arterial

Hypertension and their Trend after Antihypertensive Treatment. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, p. 347–357, 2017.

IGARASHI, A. et al. Regulation of Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Human Skin Fibroblasts and During Wound Repair. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 637–645, 1993.

IHARA, M. et al. Two endothelin receptor subtypes in porcine arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, p. 119–121, 1991.

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. 1000, 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. 312–8, 2000.

ISHIKAWA, FM., TOMAZELLI, CA., COUTO, GK., ROSSONI, LV. Tratamento com rostafuroxina reduz o remodelamento e a rigidez em artérias mesentéricas de resistência de ratos hipertensos DOCA-sal. Disponível em: http://fmsys.com.br/fmsys/fesbe/2/admin/trabalhos_exibe.php?id_area=2. Acesso em 23/07/2018

IWATSUKI, K. et al. Hypertension: Increase of Collagen Biosynthesis in Arteries but Not in Veins. **Science**, v. 198, n. 4315, p. 403–405, 1977.

JACOB, M. P. et al. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. **Pathologie Biologie**, v. 49, p. 326–332, 2001.

JOHNS, D. G. et al. Novel Signaling Pathways Contributing to Vascular Changes in Hypertension. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p. 431–443, 2000.

KADLER, K. E. et al. Collagens at a glance. **Journal of Cell**, v. 120, p. 1955–1958, 2007.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; URAKAWA, N. Effects of ouabain and potassium-free solution on the basal tone of the isolated vessels. **European Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 439–443, 1978.

KEELEY, F. W.; JOHNSON, D. J. The effect of developing hypertension on the synthesis and accumulation of elastin in the aorta of the rat. **Biochemistry and Cellular Biology**, v. 64, p. 38–43, 1986.

KHIMJI, A. KARIM; ROCKEY, D. C. Endothelin - Biology and disease. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 11, p. 1615–1625, 2010.

KHUMAN, M. W. et al. Candesartan ameliorates arsenic-induced hypertensive vascular remodeling by regularizing angiotensin II and TGF-beta signaling in rats. **Toxicology**, v. 374, p. 29–41, 2016.

KOIDE, M. et al. Endothelin-1 stimulates tyrosine phosphorylation and the activities of two mitogen-activated protein kinases in cultured vascular smooth muscle cell. **Journal of Hypertension**, v. 10, p. 1173–1182, 1992.

KOJIMA, I. Circulating digitalis-like substance is increased in DOCA-salt hypertension. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 122, n. 1, p. 129–136, 1984.

KOMETIANI, P. et al. Multiple Signal Transduction Pathways Link Na⁺/K⁺ -ATPase to Growth-related Genes in Cardiac Myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 24, p. 15249–15256, 1998.

KORSGAARD, N.; MULVANY, M. J. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. **Hypertension**, v. 12, p. 162–167, 1988.

KRAMER, F. et al. Plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and osteopontin reflect severity of heart failure in DOCA-salt hypertensive rat. **Biomarkers**, v. 13, n. 3, p. 270–281, 2008.

LANGE, D. L.; HAYWOOD, J. R.; HINOJOSA-LABORDE, C. Role of the adrenal medullae in male and female DOCA-salt hypertensive rats. **Hypertension**, v. 31, p. 403–408, 1998.

LAREDO, J. et al. Angiotensin-II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical-cells via angiotensin type-2 receptors. **Hypertension**, v. 29, p. 401–407, 1997.

LAREDO, J. et al. Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. **Na/K-ATPase and Related ATPases**, p. 671–679, 2000.

LAREDO, J.; HAMILTON, B. P.; HAMLIN, J. M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 794–797, 1994.

LARIVIÈRE, R.; THIBAUT, G.; SCHIFFRIN, E. L. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 21, n. 3, p. 294–300, 1993.

LI, J.-J. S. L.; TURGEON, A.; SCHIFFRIN, E. L. Effect of chronic treatment with two different ETA selective endothelin receptor antagonist on blood pressure and small artery structure of deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 11, p. 554–562, 1998.

LI, J. S.; LARIVIÈRE, R.; SCHIFFRIN, E. L. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. **Hypertension**, v. 24, n. 2, p. 183–188, 1994.

LI, J. S.; SCHURCH, W.; SCHIFFRIN, E. L. Renal and vascular effects of chronic endothelin receptor antagonism in malignant hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 9, p. 803–811, 1996.

LI, L. et al. Endothelin-1 Increases Vascular Superoxide via EndothelinA –NADPH Oxidase Pathway in Low-Renin Hypertension. **Circulation**, v. 107, p. 1053–1058, 2003.

- LI, Y.; LÉVESQUE, L.-O.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, p. 1959–1967, 2010.
- LICHTSTEIN, D. et al. Biosynthesis of digitalis-like compounds in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as a possible precursor. **Life Sciences**, v. 62, n. 23, p. 2109–2126, 1998.
- LINGREL, J. B. et al. Cation and cardiac glycoside binding sites of the Na,K-ATPase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, p. 194–206, 1997.
- LIU, X. et al. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates ouabain-induced vascular remodeling through regulation of endothelial function. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 5, p. 949–954, 2012.
- LU, M.-H. et al. Autocrine effects of endothelin on in vitro proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 28, p. 463–474, 2006.
- MAKINO, K. et al. Knockout of Endothelial Cell-Derived Endothelin-1 Attenuates Skin Fibrosis but Accelerates Cutaneous Wound Healing. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- MANUNTA P, ROGOWSKI AC, HAMILTON BP, HAMLIN JM. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. **Journal of Hypertension**, v. 12, p. 549-560, 1994
- MANUNTA, P. et al. High circulating levels of endogenous ouabain in the offspring of hypertensive and normotensive individuals. **Journal Of Hypertension**, v. 23, n. 9, p. 1677–1681, 2005.
- MARÍN, J. et al. Noradrenaline release induced by ouabain and vanadate in cat cerebral and peripheral arteries. **Gen. Pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 581–584, 1986.
- MARÍN, J.; SÁNCHEZ-FERRER, C. F.; SALAICES, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. **Brasilian Journal of Pharmacology**, v. 93, p. 43–52, 1988.
- MASUGI, F. et al. Circulating factor with ouabain-like immunoreactivity in patients with primary aldosteronism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 135, p. 41–45, 1986.
- MCCULLAGH, K. G.; BALIAN, G. Collagen characterisation and cell transformation in human atherosclerosis. **Nature**, v. 258, p. 73–75, 1975.
- MORTON, L. F.; BARNES, M. J. Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. **Atherosclerosis**, v. 42, p. 41–51, 1982.
- MULVANY, M. J. Vascular remodelling of resistance vessels can we define this? **Cardiovascular Research**, v. 41, p. 9–13, 1999.
- MULVANY, M. J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News in Physiological Sciences**, v. 17, p. 105–109, 2002.
- NAKADA, T. et al. Increased vascular collagen and noncollagenous protein synthesis contributes to sustain chronic phase of two-kidney, one-clip renovascular

hypertension. **Journal of Urology**, v. 156, n. 3, p. 1180–1185, 1996.

NAKAMURA, T. et al. Time-related alterations in an endogenous digitalis-like factor in the development of DOCA-salt hypertension. **Clin. and Exper. Theory and Practice**, v. 9, n. 11, p. 1733–1744, 1987.

NORTHCOTT, C. et al. Arterial epidermal growth factor receptor expression in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Hypertension**, v. 38, p. 1337–1341, 2001.

OEMAR, B. S. et al. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. **Circulation**, v. 95, p. 831–839, 1997.

OHNISHI, H. et al. Increased Expression of Connective Tissue Growth Factor in the Infarct Zone of Experimentally Induced Myocardial Infarction in Rats. **Journal of Molecular Cell Cardiology**, v. 30, p. 2411–2422, 1998.

OOSHIMA, A. et al. Increased collagen synthesis in blood vessels of hypertensive rats and its reversal by antihypertensive agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 8, p. 3019–3023, 1974.

OOSHIMA, A.; MIDORIKAWA, O. Increased lysil oxidase activity in blood vessels of hypertensive rats and effect of B-aminopropionitrile on arteriosclerosis. **Japanese Circulation Journal**, v. 41, p. 1337–1340, 1977.

OOSHIMA A. Collagen Biosynthesis in Blood Vessels of Brain and Other Tissues of the Hypertensive Rat. **Science**, v. 190, p. 898–900, 1975.

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. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 44, p. 372–380, 2004.

PADILHA, A. S. et al. Ouabain treatment changes the role of endothelial factors in rat resistance arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 600, p. 110–116, 2008.

POSTON, L. et al. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. **British Medical Journal**, v. 282, p. 847–849, 1981.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for therapy. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 64, p. 403–434, 1995.

PU, Q. et al. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. **Hypertension**, v. 42, p. 49–55, 2003.

PU, Q.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Comparison of angiotensin-converting enzyme (ACE), neutral endopeptidase (NEP) and dual ACE/NEP inhibition on blood pressure and resistance arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 20, p. 899–907, 2002.

QUEK, K. J. et al. Progressive vascular remodelling, endothelial dysfunction and stiffness in mesenteric resistance arteries in a rodent model of chronic kidney disease. **Vascular Pharmacology**, v. 81, p. 42–52, 2016.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 346–359, 2008.

RATHEE, J. S. et al. Mechanism of the anti-hypertensive property of the naturally occurring phenolic, malabaricone C in DOCA-salt rats. **Free Radical Research**, v. 50, p. 111–121, 2016.

RIZZONI, D. et al. Changes in extracellular matrix in subcutaneous small resistance arteries of patients with primary aldosteronism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 7, p. 2638–2642, 2006.

ROBERTS, A. B. et al. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 6, p. 3494–3498, 1980.

ROBERTS, A. B. et al. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 9, p. 5339–5343, 1981.

ROBERTS, A. B. et al. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 4167–4171, 1986.

RODRIGUEZ-VITA, J. et al. Endothelin-1, via ETA Receptor and Independently of Transforming Growth FactorBeta, Increases the Connective Tissue Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation Research**, v. 97, p. 125–134, 2005.

ROMERO-CALVO, I. et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 318–320, 2010.

ROQUE, F. R. et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 686–703, 2013.

ROSSI, G. et al. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels. **Journal of Hypertension**, v. 13, p. 1181–1191, 1995.

ROSSONI, L. V et al. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 5, p. H2110-2118, 2002a.

ROSSONI, L. V et al. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 771–781, 2002b.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. TGF- β signaling in vascular fibrosis. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 2, p. 196–206, 2007.

SALTIS, J. et al. Expression of growth factor receptors on arterial smooth muscle cells . Dependency on cell phenotype and serum factors. **Atherosclerosis**, v. 118, p. 77–87, 1995.

SANDOW, S. L.; GZIK, D. J.; LEE, R. M. K. W. Arterial internal elastic lamina holes: Relationship to function? **Journal of Anatomy**, v. 214, p. 258–266, 2009.

SCHIFFRIN, E. L. et al. Enhanced expression of the endothelin-1 gene in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats: correlation with vascular structure. **Journal**

of **Vascular Research**, v. 33, p. 235–248, 1996.

SCHIFFRIN, E. L. Vascular endothelin in hypertension. **Vascular Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 19–29, 2005.

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. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. 435–446, 2004.

SCHREIER, B.; GEKLE, M.; GROSSMANN, C. Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 23, p. 113–121, 2014.

SCOTT-BURDEN, T. et al. Epidermal growth factor responsiveness in smooth muscle cells from hypertensive and normotensive rats. **Hypertension**, v. 13, n. 4, p. 295–304, 1989.

SHORT, D. Morphology of the intestinal arterioles in chronic human hypertension. **British Heart Journal**, v. 28, n. 2, p. 184–92, 1966.

SKOU, J. C. The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 23, p. 394–401, 1957.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial**. Rio de Janeiro: Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2016. v. 107

STRICKLIN, G. P. et al. Human Skin Collagenase: Isolation of Precursor and Active Forms from Both Fibroblast and Organ Cultures. **Biochemistry**, v. 16, n. 8, p. 1607–1615, 1977.

STRICKLIN, G. P.; WELGUS, G. Human skin fibroblast collagenase inhibitor: purification and biochemical characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 20, p. 12252–12258, 1983.

SUTCLIFFE, M. C.; DAVIDSON, J. M. Effect of static stretching on elastin production by porcine aortic smooth muscle cells. **Matrix Collagen and Related Research**, v. 10, p. 148–153, 1990.

SWAMINATHAN, N. et al. Elevated epidermal growth factor receptor levels in hypertensive Lyon rat kidney and aorta. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 9, p. 793–796, 1996.

TAKAHASHI, H. et al. Ouabain-like immunoreactive substances exist in the hypothalamus and the adrenal medulla in rats. **Pathophysiology**, v. 1, p. 25–28, 1994.

TENTORI, S. et al. Endogenous ouabain and aldosterone are coelevated in the circulation of patients with essential hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 34, n. 10, p. 2074–2080, 2016.

THOMAS, S. M.; BRUGGE, J. S. Cellular Functions Regulated By Src Family Kinases. **Annual Reviews Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 513–609, 1997.

TIAN, J. et al. Binding of Src to Na⁺/K⁺ - ATPase forms a functional signaling complex. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 317–326, 2006.

TOSTES, R. C. A. et al. Endothelin A receptor blockade decreases expression of growth factors and collagen and improves matrix metalloproteinase-2 activity in kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 892–900, 2002.

TRIPODI, G. et al. Steroid Biosynthesis and Renal Excretion in Human Essential Hypertension: Association With Blood Pressure and Endogenous Ouabain. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 4, p. 357–363, 2009.

TYMIAK, A. A. et al. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8189–8193, 1993.

VAKKURI, O. et al. Radioimmunoassay of plasma ouabain in healthy and pregnant individuals. **Journal of Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 669–677, 2000.

VANHOUTTE, P. M.; LORENZ, R. R. Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors and the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 6, p. 88–94, 1984.

VIRDIS, A. et al. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused mice: Effects of cyclooxygenase-1 inhibition. **European Heart Journal**, v. 33, p. 2225–2234, 2012.

VOISIN, L. et al. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. **American Journal of Physiology**, v. 283, n. 2, p. 446–455, 2002.

WANG, Y.; WANG, D. Protective effect of TRPV1 against renal fibrosis via inhibition of TGF-beta/Smad signaling in DOCA-salt hypertension. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 11–12, p. 1204–1212, 2011.

WATTS, S. W. et al. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, p. 2438–48, 2007.

WENCESLAU, C. F. et al. Long-Term Ouabain Treatment Impairs Vascular Function in Resistance Arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 48, p. 316–326, 2011.

WENCESLAU, C. F. **Papel da ouabaína endógena sobre o sistema cardiovascular do modelo de hipertensão arterial DOCA-sal.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

WENCESLAU, C. F.; ROSSONI, L. V. Rostafuroxin ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in resistance arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 542–554, 2014.

WHELCHER, A.; EVANS, J.; POSADA, J. Inhibition of ERK activation attenuates endothelin-stimulated airway smooth muscle cell proliferation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 16, p. 589–596, 1997.

WHELTON, P. K. et al. **Guideline for the prevention, detection, evaluation and management of high blood pressure in adults.** [s.l.] Hypertension, 2017.

WHITESCARVER, S. A. et al. Nicotine impairs reflex renal nerve and respiratory

activity in deoxycorticosterone acetate-salt rats. **Hypertension**, v. 17, n. 2, p. 179–186, 1991.

WOESSNER, J. F. Matrix tissue metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB Journal**, v. 5, p. 2145–2154, 1991.

WOJTOWICZ-PRAGA, S. M.; DICKSON, R. B.; HAWKINS, M. J. Matrix Metalloproteinase Inhibitors. **Investigational New Drugs**, v. 15, p. 61–75, 1997.

WOOLLEY, D. E.; ROBERTS, D. R.; EVANSON, J. M. Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 66, n. 2, p. 747–754, 1975.

WRAY, S.; EISNER, D. A.; ALLEN, D. G. Two hundred years of the foxglove. **Medical History**, v. 5, p. 132–150, 1985.

XAVIER, F. E. et al. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 215–225, 2004a.

XAVIER, F. E. et al. Contribution of the endothelin and renin-angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 6, p. 794–802, 2004b.

XIE, Z.; CAI, T. Na⁺/K⁺ - ATPase mediated signal transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 3, p. 157–168, 2003.

YAMADA, H. et al. Histological study on ouabain immunoreactivities in the mammalian hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v. 141, n. 2, p. 143–146, 1992.

YAMADA, K. et al. Endogenous digitalis-like factor as a stimulator of endothelin secretion from endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 172, n. 1, p. 178–183, 1990.

YAMBOLIEV, I. A.; HRUBY, A.; GERTHO, W. T. Endothelin-1 Activates MAP Kinases and c-Jun in Pulmonary Artery Smooth Muscle. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 11, p. 205–208, 1998.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411–415, 1988.

YING, W. Z.; SANDERS, P. W. Enhanced expression of EGF receptor in a model of salt-sensitive hypertension. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 289, p. 314–321, 2005.

YOGI, A. et al. Endothelin-1, but not Ang II, Activates MAP Kinases Through c-Src – Independent Ras-Raf – Dependent Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 1960–1967, 2007.

YUAN, C. M. et al. Long-term Ouabain Administration Produces Hypertension in Rats. **Hypertension**, v. 22, p. 178–187, 1993.

ZHANG, J. et al. Low-dose ouabain constricts small arteries from ouabain-hypertensive rats: implications for sustained elevation of vascular resistance. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 3, p. H1140-50, 2009.

ZHENG, L. Y. et al. Deficiency of volume-regulated ClC-3 chloride channel attenuates cerebrovascular remodelling in DOCA-salt hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 100, n. 1, p. 134–142, 2013.