

**CAMILLA FERREIRA WENCESLAU**

**PAPEL DA OUABAÍNA ENDÓGENA SOBRE  
O SISTEMA CARDIOVASCULAR DO MODELO DE  
HIPERTENSÃO ARTERIAL DOCA-SAL**

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

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini  
Rossoni

Co-orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto  
Antunes

Versão Original

**SÃO PAULO  
2012**

## RESUMO

Wenceslau CF. Papel da ouabaína endógena sobre o sistema cardiovascular do modelo de hipertensão arterial DOCA-Sal. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Há pelo menos quatro décadas, tem sido demonstrado que alguns modelos de hipertensão arterial apresentam aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína, um fator inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Além disso, o tratamento crônico com ouabaína em ratos induz hipertensão arterial, a qual está associada à ativação de vias simpatoexcitatórias e mecanismos periféricos cardíacos, renais e vasculares. Sabe-se atualmente que a ouabaína além de inibir a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase interage com esta proteína levando a ativação da tirosina quinase não associada a receptor (c-SRC). Em 1998, Ferrari e colaboradores desenvolveram uma molécula denominada de rostafuroxina, a qual é capaz de antagonizar os efeitos da ouabaína. Dentro desse contexto, parece razoável sugerir que um anti-hipertensivo capaz de antagonizar os efeitos da ouabaína endógena possa representar uma nova e específica ferramenta farmacológica para o tratamento da hipertensão arterial. Assim, o presente estudo avaliou o papel da ouabaína endógena por meio do tratamento com rostafuroxina por 3 semanas em ratos DOCA-sal sobre: a pressão arterial pela técnica de pletismografia de cauda, a função vascular em artérias mesentéricas de resistência utilizando miógrafo para pequenos vasos e ensaio bioquímico, e a atividade simpática do nervo esplâncnico. Os resultados da presente tese demonstraram que os animais DOCA-sal tratados com rostafuroxina apresentaram redução significativa da pressão arterial sistólica e da hiperatividade simpática. Além disso, o tratamento com rostafuroxina melhorou a função vascular dos animais DOCA-sal via: (1) aumento do relaxamento à acetilcolina devido aumento da síntese e biodisponibilidade do óxido nítrico; (2) redução da geração de ânion superóxido via ativação da NAD(P)H oxidase e COX-2; (3) melhora na contração ao KCl; e (4) redução do influxo de Ca<sup>2+</sup>. Conclui-se que no modelo de hipertensão arterial DOCA-sal a ouabaína endógena promove estresse oxidativo, disfunção endotelial e hiperatividade simpática. Estas alterações em conjunto contribuem para a manutenção da elevada pressão arterial. Assim, sugere-se que a ouabaína seja um possível alvo para o tratamento da hipertensão arterial dependente de volume.

**Palavras-chave:** Hipertensão arterial. Ouabaína endógena. Artérias de resistência. Disfunção vascular. Estresse oxidativo. Hiperatividade simpática.

## ABSTRACT

Wenceslau CF. Role of endogenous ouabain on the cardiovascular system of DOCA-salt hypertensive rats. [thesis (Ph.D. Thesis)] Sao Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

It has been shown, in the last four decades, that some types of hypertension have increased plasma levels of ouabain, a factor inhibitor of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Previous studies showed that chronic treatment with ouabain induces hypertension in rats, which appears to be associated with activation of sympathetic outflow and cardiac, renal and vascular mechanisms. Besides the ouabain elicits an inhibition of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase it also interacts with this protein leading to activation of a signaling cascade via c-SRC. In 1998, Ferrari et al. developed a molecule called rostafuroxin that antagonizes the effects of ouabain. In this context, it seems reasonable to suggest that an antihypertensive capable of antagonizing the effects of endogenous ouabain might be a new and specific pharmacological tool for the treatment of hypertension. In so doing, the present study aimed to evaluate the role of endogenous ouabain by treatment with rostafuroxin for 3 weeks on blood pressure using tail-cuff method, vascular function in resistance arteries by wire myograph system and splanchnic nerve sympathetic activity of DOCA-salt rats. Our data have shown that the treatment with rostafuroxin decreased the systolic blood pressure and sympathetic activity of the DOCA-salt rats. Moreover, rostafuroxin treatment in DOCA-salt rats produced several changes in the vascular function of the resistance arteries, such as: (1) improvement in the relaxation to acetylcholine due to increase in synthesis and bioavailability of nitric oxide, (2) decrease the superoxide anion generation from NAD(P)H oxidase and COX-2, (3) improvement in the KCl induced-contraction and, (4) reduction in the Ca<sup>2+</sup> influx. Taken all the results together it is plausible to conclude that the endogenous ouabain in the DOCA-salt rats induces oxidative stress, vascular dysfunction and overactivity of the sympathetic outflow to maintain the elevated blood pressure in this hypertension model. Thus, it is suggested that ouabain is a putative target for the treatment of volume-dependent hypertension.

**Keywords:** Hypertension. Endogenous ouabain. Resistance arteries. Vascular dysfunction. Oxidative stress. Sympathetic hyperactivity.

# 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o último JNC VII (*The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*; 2004), a hipertensão arterial acomete até 1 bilhão de indivíduos com cerca de 7,1 milhões de mortes por ano em todo mundo.

O Brasil, desde a década de 40, vem passando por um processo de inversão das curvas de mortalidade, em que se observa um declínio na mortalidade por doenças infecciosas e um concomitante aumento na mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis. Conforme o Banco de dados do sistema único de saúde do Brasil (2011), as doenças cardiovasculares são responsáveis por 1.150.000 internações por ano, com um custo aproximado de 475 milhões de reais, onde a proporção de brasileiros com diagnóstico de hipertensão arterial aumentou de 21,5% em 2006 para 24,4% em 2009. Conforme dados do suplemento de saúde da Pesquisa Nacional de Amostras por Domicílio coletado em 2008 e divulgado em março de 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a hipertensão arterial foi apontada como a principal doença crônica diagnosticada na população brasileira. É digno de nota que, um número razoável dos pacientes hipertensos, aproximadamente 20-30%, apresenta a chamada hipertensão refratária ou resistente, a qual é formada por um subgrupo de pacientes onde a pressão sanguínea elevada é controlada apenas com o uso de três ou mais anti-hipertensivos de classes diferentes (Calhoun et al., 2008).

O JNC VII (2004) classificou a hipertensão arterial em adultos, conforme a tabela 1:

Tabela 1 - Valores de pressão arterial sistólica e diastólica

<b>CATEGORIA</b>	<b>PRESSÃO SISTÓLICA (mmHg)</b>	<b>PRESSÃO DIASTÓLICA (mmHg)</b>
<b>NORMAL</b>	<b>&lt;120</b>	<b>&lt;80</b>
<b>PRÉ-HIPERTENSÃO</b>	<b>120-139</b>	<b>80-89</b>
<b>HIPERTENSÃO ARTERIAL</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>ESTÁGIO 1</b>	<b>140-159</b>	<b>90-99</b>
<b>ESTÁGIO 2</b>	<b>≥160</b>	<b>≥100</b>

Fonte: Modificado de JNC VII (Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure), 2004.

Desta forma, segundo o JNC VII (2004), todo indivíduo que apresentar pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e diastólica  $\geq 90$  mmHg é considerado hipertenso.

A hipertensão arterial é dividida etiologicamente em dois grandes grupos: (1) primária ou essencial e (2) secundária. Na hipertensão arterial primária ou essencial a causa pela qual a pressão arterial eleva-se cronicamente é desconhecida. Porém, quando a causa que acarreta hipertensão arterial é conhecida denomina-se hipertensão arterial secundária. Assim, a insuficiência renal, o hiperaldosteronismo, a hipertensão gestacional, a síndrome de Cushing, entre outras, são exemplo de hipertensão arterial secundária (Kaplan, 2006).

Na hipertensão arterial ocorrem inúmeras alterações em órgãos vitais, como o encéfalo, os rins, o coração e os vasos sanguíneos. Nestes últimos, as alterações associadas à hipertensão arterial têm sido amplamente investigadas e tem-se buscado cada vez mais a elucidação de mecanismos que contribuam para sua gênese e/ou manutenção.

Independente da etiologia da hipertensão arterial, seja ela primária ou secundária, no cerne desta doença há elevada resistência vascular periférica. Não há dúvida que dentre as consequências da hipertensão arterial há alterações dos vasos de condutância. Entretanto, as alterações determinantes tanto para a gênese quando para a manutenção da hipertensão arterial, residem nas artérias de resistência (Kaplan, 2006; Mulvany, 2002), as quais possuem diâmetro menor que 300  $\mu\text{m}$  (Mulvany, 2002). Mudanças intrínsecas da parede vascular das artérias de resistência, tanto funcionais quanto estruturais, acometem as células endoteliais, as células musculares lisas e os componentes da matriz extracelular (Schiffirin, 2005; Shepherd, 1990). As alterações funcionais incluem aumento da contratilidade ou diminuição do relaxamento, as quais refletem modificações no acoplamento excitação-contração, propriedades elétricas alteradas das células do músculo liso vascular e/ou disfunção endotelial. Esta última designa anormalidades na habilidade do endotélio de realizar uma ou mais de suas funções na manutenção da homeostasia vascular, assim, compreende basicamente na síntese predominante de fatores vasoconstritores e/ou redução da síntese e/ou da biodisponibilidade de fatores de relaxamento derivados do endotélio (Lüscher e Vanhoutte, 1986; Rubanyi, 1993).

Um dos componentes responsáveis pela manutenção do tônus vascular é a atividade fisiológica da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, ou bomba de sódio e potássio, e têm-se demonstrado que sua atividade encontra-se modificada com a hipertensão arterial, podendo este ser mais um fator associado à hiperreatividade vascular (Blaustein, 1993; Dos Santos et al., 2003; Marín e Redondo, 1999).

Sabendo-se que a homeostasia celular de sódio e o potencial de membrana são fatores essenciais para o controle do tônus vascular e, conseqüentemente, para a regulação da pressão arterial, e que estas duas variáveis também são controladas pela atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, alguns trabalhos sugerem que alteração na atividade dessa bomba pode ser um fator envolvido na gênese e/ou manutenção do processo hipertensivo (Blaustein, 1993; Dostanic-Larson et al., 2005; Kaplan, 2005; Marín e Redondo, 1999; Songu-Mize et al., 1982). Neste sentido, um novo fator, inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, associado à gênese e a manutenção da hipertensão arterial foi identificado e purificado na circulação humana (Hamlym et al., 1989), o qual em 1991 foi caracterizado como ouabaína endógena (Bova et al., 1991).

### **1.1 Ouabaína, Hipertensão arterial e sua fina relação com o sal**

Os seres humanos consumiam cerca de 700 mg/dia de sódio no final do período Paleolítico e começou a usar sal regularmente para preservação de alimentos cerca de 10.000 anos atrás. Deste então, desenvolveu um gosto hedonístico para o sal (Rodriguez-Iturbe et al., 2007).

A associação entre a quantidade de sal na dieta e pressão arterial foi sugerida pela primeira vez em 1904 (Ambard e Beaujard, 1904) e amplamente reconhecida após Kempner em 1948 ter demonstrado que a dieta de arroz, a qual continha menos de 0,5 g de sal, reduzia a pressão arterial e o tamanho do coração (Kempner, 1948).

De forma pioneira, De Wardener et al. (1961) demonstraram que a infusão de salina e expansão aguda de volume em cachorros, denominados de animais doadores, era capaz de promover natriurese em outros cachorros, denominados de animais receptores, ou seja, os animais que recebiam o plasma dos animais doadores. Com tais dados, esses pesquisadores sugeriram a presença de um fator natriurético circulante o qual era liberado após a expansão aguda de volume extra

celular. Subsequente a este trabalho, Lewis Dahl (1969) foi um dos primeiros a inferir que a hipertensão arterial induzida pelo sal pode ser mediada por um fator humoral. Concomitante a esta sugestão, um trabalho apresentado no “*Proceedings of the Fourth International Congress of Nephrology*” em 1969 e intitulado como: “*Third Factor: Inhibitor of Na-K-ATPase?*” foi uma das primeiras referências a demonstrar que esse fator humoral natriurético era capaz de inibir a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Kramer et al., 1969).

Já na década de 80, Gruber et al. (1980) observaram que esse fator endógeno reagia com anticorpo anti-digoxina. Em 1989, Hamlyn et al. identificaram e purificaram o composto inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase na circulação humana e, em 1991, o mesmo passou a ser denominado como ouabaína endógena (Bova et al., 1991).

A ouabaína endógena é encontrada em concentrações nanomolares no plasma de mamíferos. Sua produção concentra-se no córtex da supra-renal (Hamlyn et al., 2003; Ludens et al., 1992; Nesher et al., 2009), no hipotálamo (De Wardener e Clarkson, 1985; Murrell et al., 2005) e na região anteroventral do terceiro ventrículo (Pamnani et al., 1981; Songu-Mize et al., 1982); e pode ser estimulada pelo aumento da concentração plasmática de sódio, pela expansão de volume extracelular (Blaustein, 1993; Yamada et al., 1997), pela ação dos hormônios adrenocorticotrófico e angiotensina II (Laredo et al., 1997), pelo exercício físico (Bauer et al., 2005) entre outros fatores.

Em humanos, algumas enfermidades apresentam aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína, como a hipertensão arterial essencial (Hamlyn et al., 1982; Pierdomenico et al., 2001), a insuficiência cardíaca congestiva (Gottlieb et al., 1992; Pitzalis et al., 2006), a insuficiência renal crônica (Hamlyn et al., 1996), o “ouabaínoma primário” ou adenoma cortical adrenal (Hamilton et al. 1994), entre outras.

Em modelos animais de hipertensão arterial, também foi demonstrado alteração na concentração plasmática de ouabaína, no entanto, esta é dependente do modelo experimental estudado. Deste modo, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), não foi demonstrado alterações na concentração plasmática de ouabaína quando comparado a ratos Wistar (Doris, 1994). Por outro lado, em outros modelos experimentais de hipertensão arterial dependentes de volume, como DOCA-sal e um rim um clipe (1R1C), foi demonstrado que a ouabaína plasmática

está aumentada (Kojima, 1984; Nakamura et al., 1987; Pamnani e Haddy, 1988; Park et al., 2004).

Recentemente, Neshar et al. (2009) demonstraram o papel fisiológico da ouabaína na ausência de condições que estimulam o aumento das concentrações plasmáticas de ouabaína, como o exercício físico (Bauer et al., 2005). Esses autores, demonstraram que ratos normais tratados cronicamente com anticorpo anti-ouabaína apresentam redução da natriurese e da contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos, sugerindo um papel da ouabaína na homeostase do sódio e do tônus vascular. Além disso, neste mesmo estudo (Neshar et al., 2009) foi evidenciado que a redução crônica das concentrações plasmáticas de ouabaína não afeta o crescimento do coração e do rim e a pressão arterial sistólica.

Até o início da década de 1990, especulava-se sobre a participação da ouabaína no processo hipertensivo, entretanto, nenhum trabalho havia demonstrado a capacidade desse digitalico em desenvolver hipertensão arterial. Assim, em 1993, Yuan et al. demonstraram, pela primeira vez na literatura, que o tratamento crônico com ouabaína era capaz de induzir hipertensão arterial em ratos. Posteriormente, Manunta et al. (1994) caracterizaram esse modelo de hipertensão arterial, e encontraram aumento das concentrações de ouabaína no plasma, rins, hipotálamo e pituitária anterior.

Atualmente já está bem estabelecido que o tratamento crônico com ouabaína em ratos induz o desenvolvimento de hipertensão arterial (Briones et al., 2006; Hernanz et al., 2008; Kimura et al., 2000; Manunta et al., 1994; Rossoni et al., 2002a,b, 2006; Padilha et al., 2008; Cao et al., 2009; Wenceslau et al., 2011; Xavier et al. 2004a,b,c; Yuan et al., 1993). O efeito hipertensinogênico tem sido associado com aumento do tônus simpático (Huang et al., 1994) devido a uma ativação de sistemas regulatórios centrais, como o sistema renina-angiotensina (Huang e Leenen, 1999) e endotelina (Di Filippo et al., 2003). Embora, o sistema nervoso central pareça ser o maior contribuinte para gênese do efeito pressor da ouabaína, alguns estudos demonstraram que os mecanismos periféricos cardíacos (Ferrandi et al., 2004; Rossoni et al., 2006; Skoumal et al., 2007), renais (Cao et al., 2009; Kurashina et al., 1996) e vasculares (Briones et al., 2006; Kimura et al., 2000; Rossoni et al., 2002a,b; Padilha et al., 2008; Wenceslau et al., 2011; Xavier et al. 2004a,b,c) também contribuem para a gênese e/ ou manutenção da hipertensão arterial induzida pela administração crônica de ouabaína.



## 1.2 Ouabaína, hipertensão arterial e o sistema vascular

Independente do tempo de administração de ouabaína seja ela aguda ou crônica, esse glicosídeo cardíaco promove alterações na função vascular, as quais são dependentes tanto da concentração de ouabaína quanto do leito vascular estudado (Briones et al., 2006; Hernaz et al., 2008; Rossoni et al., 1999, 2002a,b; Padilha et al., 2004, 2008; 2011; Wenceslau et al., 2011; Xavier et al. 2004a,b,c). As alterações observadas podem ser tanto ajustes compensatórios fundamentais para a manutenção da homeostasia do sistema como um todo, ou podem induzir uma desordem no sistema, às vezes irreversíveis, culminando desta forma na instalação de algumas enfermidades, dentre elas a hipertensão arterial.

Ouabaína administrada agudamente, em concentrações nanomolares, potencializa as ações de fenilefrina em preparações do leito vascular caudal (Rossoni et al., 1999). Já, em concentrações maiores (micromolar), a administração aguda de ouabaína induz contração por ação direta sobre o músculo liso vascular e/ou pela liberação de noradrenalina das terminações adrenérgicas (Aarhus et al., 1983; Rodríguez-Mañas et al., 1994).

Em alguns modelos de hipertensão arterial, como SHR (Padilha et al., 2004), DOCA-sal, um rim um clipe (1R1C) e hipertensão arterial induzida pelo tratamento com o inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (Rossoni et al., 2001, 2003), a administração aguda de ouabaína aumenta a pressão arterial. Siman et al. (2010), demonstraram que a administração (*i.v.*) de doses baixas (picomolar) de ouabaína em SHR aumenta a pressão arterial sistólica e a diastólica por mecanismo que parece depender da ativação do sistema renina-angiotensina. No entanto, o efeito da ouabaína sobre a pressão arterial diastólica não foi bloqueado por canrenona, sugerindo um mecanismo de ação independente da inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Siman et al., 2010).

Estudos prévios demonstraram que o tratamento por cinco semanas com ouabaína em ratos promove hipertensão arterial associada à redução da resposta vasoconstritora à agonista do receptor  $\alpha$ -adrenérgico em aorta e artéria mesentérica superior, aumento em artéria renal e não alteração em artéria caudal e em artéria mesentérica de resistência (Kimura et al., 2000; Rossoni et al., 2002a,b; Xavier et al. 2004a,b,c). Esta resposta é atribuída à modulação endotelial, devido a maior

produção do óxido nítrico, via ativação das isoformas endotelial e neuronal da sintase de óxido nítrico (Rossoni et al., 2002b; Xavier et al., 2004a).

Em artéria coronária de ratos hipertensos devido ao tratamento com ouabaína por 5 semanas, o relaxamento induzido pela acetilcolina nos segmentos arteriais pré-contraídos com KCl ou com bloqueadores de canais para potássio ativados por cálcio (BKCa) está prejudicado. Entretanto, quando estes segmentos são pré-contraídos com serotonina, não há diferenças do relaxamento induzido pela acetilcolina entre os grupos normotensos e hipertensos (Briones et al., 2009). Neste mesmo trabalho, os autores sugeriram que o tratamento crônico com ouabaína aumenta o fluxo iônico do canal BKCa em artérias coronárias e, conseqüentemente, preserva a função endotelial nessas artérias (Briones et al., 2009). Em artérias cerebrais do mesmo modelo de hipertensão arterial, tanto a contração ao KCl quanto a contração à serotonina não diferiram das artérias dos animais controle (Hernanz et al., 2008). Por outro lado, o relaxamento induzido por bradicinina e L-arginina foi de maior magnitude nos segmentos de artéria basilar dos animais hipertensos induzidos pela ouabaína (Hernanz et al., 2008), o qual era dependente da maior biodisponibilidade do óxido nítrico via redução do ânion superóxido. Estes pesquisadores sugeriram que este seria um ajuste das artérias cerebrais em relação ao aumento da pressão arterial (Hernanz et al., 2008). Também foi observada alteração nos vasos que perfundem a medula renal, como a vasa recta descendente, após o tratamento crônico com ouabaína (Cao et al., 2008). Nesse sentido, o influxo de cálcio nas células endoteliais proveniente dos segmentos de vasa recta dos animais tratados com ouabaína é reduzido tanto em resposta à acetilcolina quanto à bradicinina quando comparado ao controle (Cao et al., 2009).

Em artérias mesentéricas de resistência, as alterações funcionais observadas, após o tratamento com ouabaína, são dependentes do tempo de exposição a este glicosídeo. Em relação a este parâmetro, os resultados obtidos por Xavier et al. (2004b) e Wenceslau et al. (2011) sugerem que em períodos menores de tratamento, cinco e dez semanas, a resposta contrátil à noradrenalina não está alterada. Ao passo que, em período mais prolongado de tratamento, vinte semanas, ocorre redução na modulação nitrérgica sobre a resposta contrátil vascular, associada ao estresse oxidativo via ativação da COX-2, característicos de disfunção endotelial, acompanhada de aumento da resposta vasoconstritora (Wenceslau et al., 2011). Corroborando esses dados, Xavier et al. (2009) demonstraram que SHR

tratados com ouabaína por 5 semanas apresentam incremento da pressão arterial acompanhado de aumento da resposta à fenilefrina em pequenas artérias devido à maior liberação do tromboxano  $A_2$  e/ou prostaglandina  $H_2$  via COX-2 (Xavier et al., 2009). Além de alterações sobre a função vascular, também foi demonstrado que o tratamento durante cinco semanas com ouabaína é capaz de modificar a estrutura das artérias mesentéricas de resistência promovendo remodelamento para dentro. Essa alteração na estrutura vascular é devido à diminuição do número de células do músculo liso vascular e aumento na deposição de colágeno na camada média (Briones et al., 2006).

### 1.3 Ouabaína, hipertensão arterial e a $Na^+K^+$ -ATPase

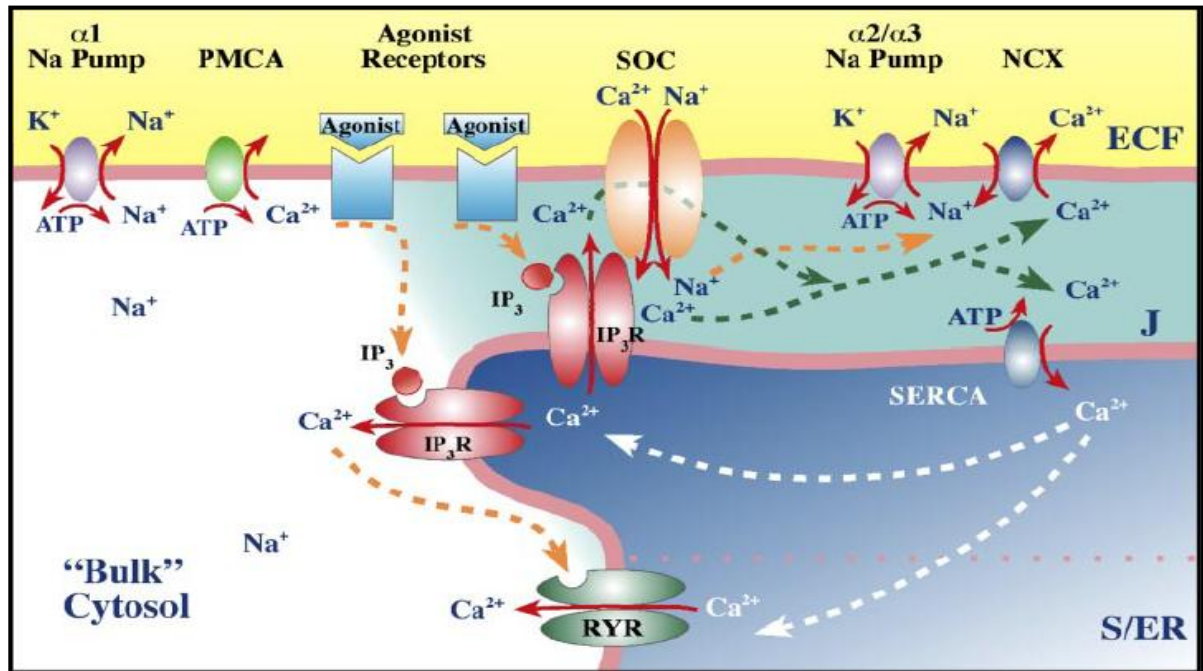
A identificação da  $Na^+K^+$ -ATPase, em 1957, conferiu aos pesquisadores Dr. Skou, Dr. Boyer e Dr. Walker o prêmio mais almejado do meio acadêmico e científico, o prêmio Nobel. Deste então a estrutura, o funcionamento e a regulação desta enzima têm sido caracterizados (Blanco e Mercer, 1998; Skou e Esmann, 1992; Sweadner, 1989; Xie e Cai, 2003).

A  $Na^+K^+$ -ATPase, ou bomba de sódio e potássio, é uma proteína integral de membrana e está presente na maioria das células eucarióticas. Esta enzima usa a energia da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) para realizar o transporte de sódio e potássio através da membrana plasmática (Skou e Esmann, 1992; Sweadner, 1989). É formada por três subunidades, a catalítica  $\alpha$  e as regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$  ou FXYD (Blanco e Mercer, 1998; Sweadner, 1989; Xie e Cai, 2003). A subunidade catalítica  $\alpha$  possui sítios de ligação para os íons  $Na^+$  e  $K^+$ , para o ATP e para os compostos digitálicos, dentre eles a ouabaína e a digoxina (Blanco e Mercer, 1998). Esta subunidade é composta de 6-7 domínios transmembrana e pode ser encontrada sob quatro isoformas distintas:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ , cuja expressão varia de acordo com o tecido estudado. Estas isoformas diferem pouco quanto ao seu peso molecular, mas são diferentes em relação à sensibilidade pelos compostos digitálicos em roedores. Desta forma, a isoforma que apresenta maior sensibilidade aos compostos digitálicos é a  $\alpha_3$ , seguida da  $\alpha_2$ , e por fim a  $\alpha_1$  (Blanco e Mercer, 1998). Cabe ressaltar que no músculo liso vascular e no endotélio foi descrita a presença das três isoformas da subunidade  $\alpha$ :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  (Sahin-Erdemli et al., 1994).

A subunidade  $\beta$  possui três isoformas distintas identificadas:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . A  $\beta_1$  está presente em quase todos os tecidos, porém é predominantemente renal; a  $\beta_2$  é encontrada no músculo esquelético, glândula pineal e sistema nervoso central; e a  $\beta_3$  está presente no testículo, retina, fígado e pulmão (Blanco e Mercer, 1998). Já a expressão da subunidade  $\gamma$  ou FX $\gamma$ D na fase embrionária do camundongo é importante para a formação do blastócito (Jones et al., 1997; Mobasher et al., 2000). Sabe-se também que a subunidade  $\gamma$  liga-se a aducina uma importante proteína do citoesqueleto (Ferrandi et al., 1999). Interessantemente, polimorfismos na sequência da aducina correlacionam-se com hipertensão arterial tanto em humanos quanto em ratos hipertensos de Milão (Ferrandi et al., 1999).

Em 1998 Blaustein et al. identificaram uma microrregião celular entre a membrana plasmática e a membrana do retículo sarcoplasmático, denominada por eles de plasmersome, onde estão localizados o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , o retículo sarcoplasmático e as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Figura 1). Nesta microrregião, os compostos digitálicos, como a ouabaína, possuem uma importante função sobre a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estes compostos digitálicos ao inibirem as subunidades  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase aumentam a concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular nesse microdomínio específico, o que resulta na redução da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e, conseqüente, aumento da concentração dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  livres no interior da célula. Esse  $\text{Ca}^{2+}$  é captado pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático e estocado no interior dessa organela citoplasmática. Desta forma, após o estímulo de um agonista vasoconstritor como a noradrenalina, a resposta contrátil resultante é amplificada em conseqüência de uma maior liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático. Esse mecanismo ajuda a explicar, em parte, como concentrações nanomolares de ouabaína podem amplificar a resposta a um agente vasoconstritor e representa um mecanismo adicional pelo qual a ouabaína endógena pode contribuir para o processo hipertensivo.

**Figura 1** - Modelo do *plasmersome* proposto por Blaustein e colaboradores



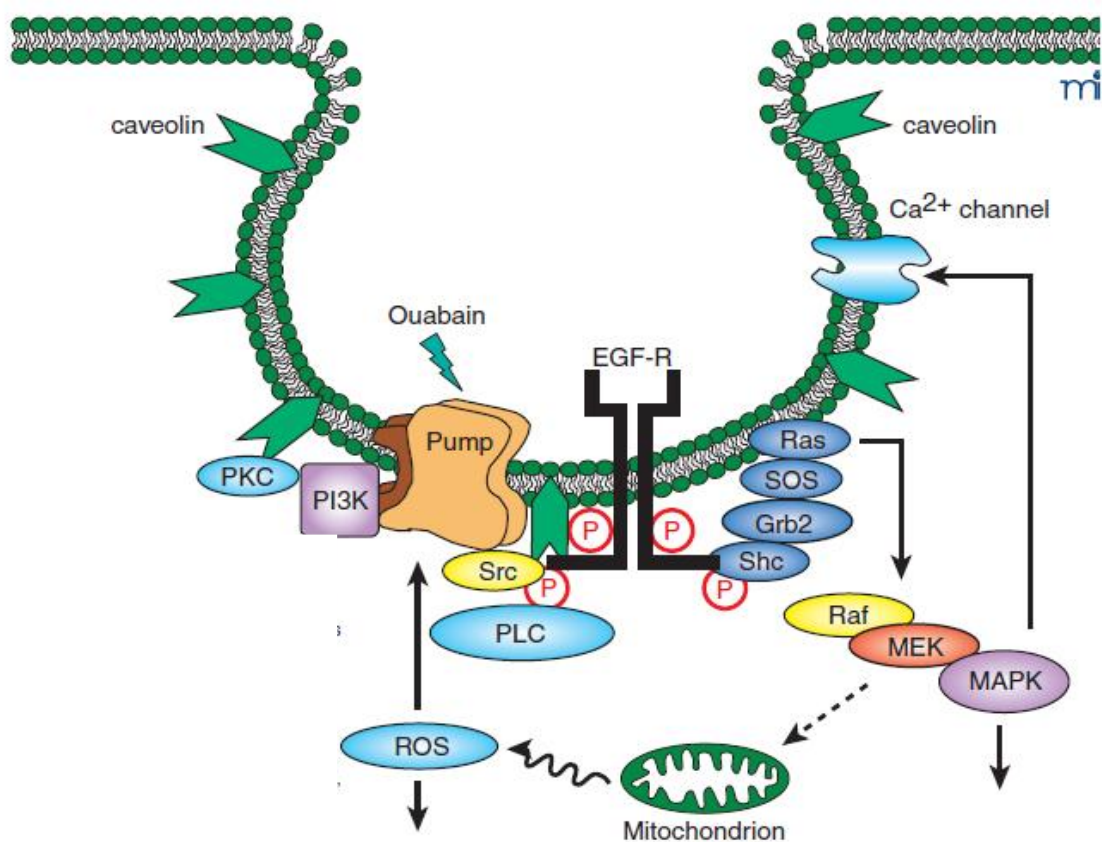
$\alpha_1$  Na pump: isoforma  $\alpha_1$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase; PMCA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da Membrana Plasmática; Agonist Receptor: Receptor para Agonista; SOC: Canal Operado por Estoque;  $\alpha_2/\alpha_3$  Na pump: isoformas  $\alpha_2/\alpha_3$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase; NCX: Trocaador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; ECF: Fluido do Meio Extracelular;  $\text{IP}_3$ : 1, 4, 5 Trifosfato Inositol;  $\text{IP}_3\text{R}$ : receptor para 1, 4, 5 Trifosfato Inositol; SERCA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do Retículo Sarcoplasmático; RYR: Receptor para Rianodina; S/ER: Retículo Endoplasmático/ sarcoplasmático; Bulk Cytosol: Massa Plasmática.  
Fonte: Blaustein et al. (2006).

Entretanto, trabalhos subsequentes (Xie et al., 1999, 2003) sugeriram uma função “binária” da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Esses autores observaram que além da função de transporte de íons, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase atua como um receptor, tendo como agonista a ouabaína. Uma vez que o receptor  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é ativado pela ouabaína, inicia-se uma cascata de sinalização e transdução de sinais via caminhos múltiplos. Baseado nesse fenômeno, Xie e Cai (2003) denominaram este mecanismo de transdução de sinais, via o complexo ouabaína-  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, de *signalosome* (Figura 2).

O *signalosome* ocorre em um compartimento específico da membrana, a cavéola, a qual transfere sinais para o interior da célula no momento em que a ouabaína está acoplada a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Figura 2). A interação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase com proteínas do citoesqueleto, como a aducina, parece ser essencial para a funcionalidade desta proteína e a transdução de sinais para o interior da célula (Ferrari et al., 2006).

Sabe-se que o complexo ouabaína- $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase leva à ativação das seguintes proteínas e moléculas: PI3-quinase; proteína quinase B (AKT); tirosina quinase não associada a receptor (cSrc); receptor para fator de crescimento epidermal (ERGF); ERK; espécies reativas derivadas do oxigênio, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); fosfolipase C (PLC) e NFkB (Figura 2) (Xie et al., 1999, Aizman et al., 2001; Xie, Cai, 2003).

**Figura 2** - Modelo do signalosome proposto por Xie e Cai (2003)



Pump:  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase; EGFR: receptor para fator de crescimento epitelial; PKC: proteína quinase C; PI3K: proteína quinase 3' fosfoinositídeo; Grb2: proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento; SOS: son of sevenless; PLC: fosfolipase C, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; ROS: espécies reativas derivadas do oxigênio.

Fonte: Modificado de Xie e Cai (2003).

### 1.3.1 Ouabaína, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e cSRC

A ligação da ouabaína com a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase causa rápida ativação da tirosina quinase da família cSRC em muitos tipos de células, incluindo miócito cardíaco, músculo liso vascular e epitélio renal (Aydemir-Koksoy et al., 2001; Xie e Cai, 2003).

As tirosinas quinases são importantes reguladoras da função celular, como: crescimento, proliferação, diferenciação, adesão, migração e sobrevivência (Thomas e Brugge, 1997). Elas são classificadas dentro de dois grupos: (1) tirosinas quinases associadas a receptores, como o receptor de fator de crescimento epidermal; e (2) tirosinas quinases não associadas a receptores, como a família da cSRC. A atividade catalítica da cSRC é controlada pela fosforilação em tirosina e interação proteína a proteína. Assim, a fosforilação cSRC<sup>Tyr529</sup> mantém esta quinase na conformação inativa, enquanto que a fosforilação da cSRC<sup>Tyr418</sup> ativa esta quinase (Thomas e Brugge, 1997).

A ouabaína quando acoplada a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase estimula a fosforilação da cSRC<sup>Tyr418</sup>, mas não tem efeito na cSRC<sup>Tyr529</sup> em diferentes tipos de células (Haas et al., 2002). Além disso, após a imunoprecipitação da subunidade  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase de células da linhagem LLC-PK1 (células epiteliais de rim de porco) tratadas agudamente com ouabaína, foi observado aumento da ligação da cSRC com a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Xie, 1999).

## 1.4 Ouabaína, hipertensão arterial e o sistema nervoso simpático (SNS)

A extensa inervação do sistema nervoso simpático (SNS) sobre os dois efeitores do sistema cardiovascular, o coração e os vasos sanguíneos, faz com que este sistema tenha papel imperativo na regulação minuto a minuto da pressão arterial, por alterar a frequência, mecânica cardíaca e o tônus vascular.

A relação entre o SNS e hipertensão arterial é foco de ampla pesquisa clínica e experimental visto que o aumento da atividade simpática está fortemente associado à piora no prognóstico de pacientes hipertensivos e altas taxas de mortalidade (Esler, 2000). Neste sentido, evidências extraídas de diversas fontes (Esler, 2000; Huang e Leenen, 1999; Jacob et al., 2005; Leenen, 2002; Mueller e Ertel; 1983; Yemane et al., 2009; Zhang e Leenen, 2001), utilizando técnicas

distintas, como eletrofisiologia e neuroquímica, fornecem informações convincentes de que a hiperatividade do sistema nervoso simpático está comumente presente em pacientes com enfermidades cardiovasculares, tais como hipertensão arterial e insuficiência cardíaca (Esler, 2000) e em modelos experimentais, como SHR (Mueller e Ertel; 1983), DOCA-sal (Jacob et al., 2005; Yemane et al., 2009), hipertensão dependente de ouabaína (Huang e Leenen, 1999; Zhang e Leenen, 2001), ratos Dahl sensíveis ao sal (Dahl-sal) (Leenen, 2002), entre outros.

As causas específicas do aumento da atividade simpática na hipertensão arterial são ainda desconhecidas, embora influências genéticas e fatores comportamentais e estilo de vida, como sedentarismo, tabagismo e hábitos alimentares, parecem estar envolvidos (Esler, 2000). Todavia, pesquisadores têm obtido cada vez mais dados sugerindo uma correlação positiva entre o aumento de ouabaína plasmática e/ ou tecidual e o aumento da atividade simpática na hipertensão arterial (D'Amico et al., 2003; Huang et al., 1994; Leenen, 2002). Assim, há grandes possibilidades desse glicosídeo ser um forte candidato, ao menos em parte, para a gênese e/ ou manutenção da simpatoexcitação observada na hipertensão arterial, visto que: (1) a administração aguda de ouabaína aumenta o tônus simpático (D'Amico et al., 2003; Leenen, 2002); (2) a administração intracerebroventricular de anticorpo anti-ouabaína abole a hiperatividade do nervo simpático renal em ratos sensíveis ao sal e em SHR, ambos expostos a alta dieta de sal (Leenen, 2002; Van Huysse, 2007); (3) ouabaína injetada intracerebroventricular promove resposta vasopressora dependente da dose e taquicardia acompanhada de aumento na atividade simpática do nervo lombar em DOCA-sal (Takahashi et al., 1987).

Também de maneira interessante, foi sugerido que o aumento da concentração de ouabaína central, concomitante à hiperatividade simpática, depende do influxo de sódio através de canais para sódio sensíveis a amilorida/ benzamil (Leenen, 2002). Além disso, em modelos genéticos de hipertensão arterial sensíveis ao sal, como o Dahl-sal sensível, o controle do sódio no líquido cefalorraquidiano está alterado associado à ativação da ouabaína central, levando assim, à hiperatividade simpática e hipertensão arterial, aparentemente independente do genótipo renal (Leenen, 2002).

A administração aguda, dependente da dose, de ouabaína em algumas regiões do sistema nervoso central, tais como o núcleo mediano préóptico



(Budzikowski e Leenen, 1997;2001) e bulbo rostral ventrolateral (Teruya et al., 1997), promove aumento da atividade nervosa simpática, pressão arterial e frequência cardíaca. A hiperatividade simpática induzida por ouabaína e o consequente aumento da pressão arterial parecem envolver o sistema renina-angiotensina central, visto que a administração do antagonista do receptor AT<sub>1</sub> (Budzikowski, Leenen, 2001) bloqueia esta hiperatividade simpática. Além disso, a elevação da pressão arterial induzida pela administração aguda de ouabaína é atenuada em ratos transgênicos deficientes de angiotensinogênio central (Huang et al., 2001). Cabe ressaltar que a infusão de aldosterona aumenta os níveis ouabaína no hipotálamo e bloqueadores de receptores de mineralocorticóides e ligantes que inibem as ações da ouabaína previnem aumento da atividade simpática e pressão arterial (Wang et al., 2003).

Destarte, por meio dos trabalhos citados acima, é possível presumir que a ouabaína tenha um papel significativo no desenvolvimento e/ou manutenção da hiperatividade simpática e, assim, no desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão arterial.

### **1.5 Ouabaína e o modelo de hipertensão DOCA-sal**

A desoxicorticosterona é um hormônio esteróide produzido pela glândula adrenal que possui atividade mineralocorticóide e atua como um precursor da aldosterona (Selye e Stone, 1946; Vinson, 2011). Na década de 30, a desoxicorticosterona foi isolada, estruturalmente identificada e sintetizada (Vinson, 2011). Selye et al. (1946;1957) foram os primeiros a demonstrarem que a administração de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) induz hipertensão arterial em ratos.

O modelo DOCA-sal é um modelo de hipertensão arterial dependente de volume, onde a administração de DOCA aumenta a reabsorção de sódio e água nos túbulos distais (Guyton et al. 1972; Selye e Stone, 1946; Vinson, 2011). Além disso, para induzir hipertensão arterial em ratos, concomitante a administração de DOCA, os animais são mantidos em uma dieta com níveis altos de NaCl e submetidos a redução da massa renal (devido indução de nefrectomia unilateral). Todos esses

fatores contribuem para a hipervolemia, levando a um quadro de hipertensão arterial maligna (Vinson, 2011).

Há evidências que a ouabaína está aumentada no plasma e encéfalo do modelo de hipertensão DOCA-sal (Kojima, 1984; Park et al., 2004; Ferrari et al., 2006).

Em 1981, após Pamnani et al. terem demonstrado que a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase estava reduzida em artérias de animais DOCA-sal, trabalhos subsequentes sugeriram a participação da ouabaína neste modelo de hipertensão arterial. Neste sentido, em 1982 Songu-Mize et al. demonstraram que ratos DOCA-sal com lesão na região AV3V apresentaram redução na pressão arterial que estava relacionada, ao menos em parte, com a interrupção da secreção, transporte ou síntese de uma substância humoral, a qual reduzia a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Neste mesmo período, corroborando os dados de Songu-Mize et al. (1982), Kojima et al. (1982) sugeriram que o fator inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase contribuía com a hipertensão arterial presente nos animais DOCA-sal, visto que estes autores observaram uma queda significativa na pressão arterial desses animais após a infusão do anticorpo antidigoxina, o qual inibe o fator *digitalis-like*. Posteriormente, comprovou-se que este fator era o glicosídeo ouabaína, e que estava presente em maiores concentrações tanto no hipotálamo quanto na glândula adrenal em animais DOCA-sal (Kojima, 1984; Park et al., 2004).

No modelo DOCA-sal há alterações tanto funcionais quanto estruturais no território vascular, o qual se questiona, no presente estudo, a plausível participação da ouabaína neste cenário.

Neste sentido, as mudanças observadas, em artérias dos animais DOCA-sal, são: (1) aumento da resposta vasoconstritora e/ ou redução da resposta vasodilatadora via prejuízo da síntese e/ ou biodisponibilidade do óxido nítrico (Cordellini et al., 1990; Ko et al., 2007; Lima et al., 2009; Nunes et al., 2000; Somers et al., 2000; White et al., 1996); (2) aumento do tônus miogênico, o qual é abolido na presença de um bloqueador de canal para  $\text{Ca}^{2+}$ , do inibidor da NADPH oxidase e do inibidor da COX (Glosh et al., 2004); (3) aumento de espécies reativas derivadas do oxigênio, principalmente o ânion superóxido (Callera et al., 2006), tendo como principais fontes a NADPH oxidase (Beswick et al., 2001), a xantina oxidase e/ ou a mitocôndria (Viel et al., 2008); (4) redução da atividade Cu/Zn SOD (Wu et al., 2001); (5) aumento de citocinas proinflamatórias, do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) e

infiltração de macrófago (Beswick et al., 2001; Ko et al., 2007; Schiffrin, 2005); e, (6) durante a fase maligna da hipertensão arterial, ocorre remodelamento hipertrófico das artérias de resistência (Ko et al., 2007; Yemane et al., 2009).

Além das alterações no território vascular, o modelo DOCA-sal apresenta hiperatividade simpática, visto que: (1) a desnervação renal reduz a elevação da pressão arterial e retenção de sódio (Katholi et al., 1980); (2) a aguda normalização dos níveis de NaCl no plasma dos animais DOCA-sal diminui a atividade do nervo simpático lombar (O'Donoghue e Brooks; 2006); e (3) há aumento das catecolaminas plasmáticas no estágio inicial da hipertensão arterial (Yemane et al., 2009).

Como mencionado no presente texto, sabendo que no modelo de hipertensão arterial induzido por ouabaína também ocorrem alterações funcionais e estruturais no território arterial e ativação do sistema nervoso simpático, comparáveis àquelas descritas na hipertensão arterial do modelo DOCA-sal, é cabível presumir que haja uma correlação positiva entre o aumento das concentrações plasmáticas e/ ou teciduais da ouabaína e as alterações da função vascular e da atividade simpática do modelo DOCA-sal.

## **1.6 Ouabaína: Um possível alvo para o tratamento da Hipertensão arterial?**

Visto que algumas enfermidades cursam com um aumento das concentrações plasmáticas de ouabaína, entre elas a hipertensão arterial, parece razoável sugerir que um anti-hipertensivo capaz de antagonizar os efeitos da ouabaína endógena possa representar uma nova e específica intervenção farmacológica para o tratamento dessa enfermidade.

De fato, Ferrari et al. (1998) desenvolveram uma nova molécula com estas características. Esta molécula denominada de rostafuroxina (PST 2238) ( $17\beta$ -(3-furil)- $5\beta$ -androstana- $3\beta$ , $14\beta$ , $17\alpha$ -triol) é um derivado de digitoxigenina que desloca *in vitro* a ligação específica da ouabaína com a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase com  $\text{IC}_{50}$  de  $2 \times 10^{-6}$  M e afeta a atividade enzimática em  $10^{-5}$  M (Ferrari et al., 2006; 2010). A toxicidade oral aguda da rostafuroxina em ratos é  $\text{LD}_{50} > 2.000$  mg/kg. Estudos toxicológicos crônicos, um e três meses de tratamento com rostafuroxina, realizados em ratos e macacos, indicam que o composto não induz mortalidade ou qualquer alteração

toxicológica em doses até 100 mg/kg (v.o.) para ratos e 180 mg/kg (v.o.) para macacos (Ferrari et al., 2000; 2006). A rostafuroxina não tem atividade diurética, não interage *in vitro* com outros receptores envolvidos no controle da pressão arterial e não causa qualquer efeito cardíaco quando testado tanto em preparações *in vitro* quanto *in vivo* (Ferrari et al., 2000; Quadri et al., 1997). Além disso, este composto é desprovido de efeitos androgênicos, estrogênicos e corticomiméticos *in vivo*, não altera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a secreção de prolactina e não afeta motilidade gastrointestinal (Quadri et al., 1997).

Por antagonizar os efeitos da ouabaína endógena, a rostafuroxina reduz a pressão arterial sem afetar a frequência cardíaca em ratos hipertensos de Milão, em ratos DOCA-sal e em ratos hipertensos induzidos pelo tratamento crônico com ouabaína (Ferrari et al., 2006; 2010). Além disso, tratamento com rostafuroxina restaura a atividade aumentada da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase encontrada em ratos hipertensos de Milão e em ratos tratados com ouabaína (Ferrari et al., 1998;2006). No entanto, este composto não tem efeito sobre a pressão arterial de animais SHR (Ferrari et al., 1993).

A eficácia da rostafuroxina em antagonizar o efeito da ouabaína também foi observada no território vascular (Ferrari et al., 2006; Zhang et al., 2005). Nesse sentido, foi visto que o aumento da resposta contrátil ao KCl, encontrado em artérias mesentéricas isoladas de animais tratados com ouabaína, é completamente normalizado pelo tratamento por quatro semanas com rostafuroxina (Ferrari et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que o aumento da resposta miogênica, em artéria mesentérica de resistência de camundongo, induzido pela administração aguda de ouabaína, é antagonizado pela rostafuroxina (Zhang et al., 2005). Esses resultados reforçam a ideia que esse fármaco é um inibidor das ações desse glicosídeo.

É digno de nota que, o efeito anti-hipertensivo da rostafuroxina em humanos está sob análise em um ensaio clínico no estudo multicêntrico para Intervenção Específica do Sódio na Hipertensão Arterial (OASIS-HT). A fase II do ensaio clínico, a qual objetivou estudar a eficácia da rostafuroxina no tratamento da hipertensão arterial essencial, foi finalizada em 2011 (Staessen et al., 2011) e os resultados demonstraram que a rostafuroxina não reduziu a pressão arterial significativamente em humanos. A conclusão principal da ineficiência do fármaco foi que os pacientes estudados já recebiam tratamento para hipertensão arterial e que a retirada do

medicamento por um período de 4 semanas foi insuficiente (Staessen et al., 2011). Por outro lado, um importante objetivo secundário do estudo da OASIS-HT foi investigar a redução da pressão arterial pelo tratamento com rosfuroxina em pacientes com determinada variação genética, ou seja, os pacientes que apresentam no fenótipo alteração nas enzimas envolvidas na síntese e degradação de ouabaína. Em suma, o estudo revelou que a farmacogenômica de portadores desse perfil genético, os quais representaram 23% dos pacientes randomizados pela OASIS-HT, mostraram diminuição significativa da pressão arterial (Staessen et al., 2011). Com base nesses resultados preliminares da farmacogenômica, a OASIS-HT iniciou uma forma mais focada de ensaio clínico de fase II comparando os efeitos do rosfuroxina e losartan em pacientes hipertensos com perfil genético específico. Esta pesquisa está em andamento e o perfil do estudo encontra-se no site do [clinicaltrials](http://clinicaltrials.gov).

## 6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados da presente tese é possível concluir que a ouabaína, via ação sobre o sistema cardiovascular, participa na manutenção da hipertensão arterial no modelo DOCA-sal.

A ouabaína endógena interage com a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e ativa uma cascata de sinalização via cSRC o que promove hiperatividade simpática, estresse oxidativo via NAD(P)H oxidase e COX-2, redução da síntese e biodisponibilidade de NO o que gera disfunção endotelial no modelo de hipertensão arterial DOCA-sal. Estas alterações em conjunto contribuem para a manutenção da elevada pressão arterial neste modelo de hipertensão arterial. Assim, sugere-se que a ouabaína possa ser um possível alvo para o tratamento da hipertensão arterial dependente de volume.

## REFERÊNCIAS\*

Aarhus LL, Shepherd JT, Tyce GM, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Contractions of canine vascular smooth muscle cells caused by ouabain are due to release of norepinephrine from adrenergic nerve endings. *Circulation Research*, 1983;52(5):501-507.

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. *Journal of Hypertension*, 2005;23(5):1025-1036.

Aizman O, Uhlén P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001;98:13420-13424.

Ambard L, Beaujard E. Causes de l' hypertension artérielle. *Archives of General Medicine*, 1904;1:520-533.

Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, Paton JF. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *The Journal of Physiology*, 2006;576(Pt 2) :529-583.

Bauer N, Müller-Ehmsen J, Krämer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RHG, Neu H, Kirch U, Grünbaum, Schoner W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of b-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*, 2005;45:1024-1028.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiology Reviews*, 2007;87:245-313.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb R.C. (2001). NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*, 2001;38:1107-1111.

Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intra-celular  $Ca^{2+}$  stores and cell responsiveness. *American Journal of Physiology*, 1993;264:C1367-C1387.

Blaustein MP, Juhaszova M, Golovina VA. The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: A new hypothesis. *Clinical and Experimental Hypertension*, 1998;20:691-703.

Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, Gonzalez MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salaces M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain induced hypertensive rats. *American Journal Physiology*, 2006;291:H193-H201.

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from:<http://www.icmje.org> [2007 May 22].

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. *Journal of Hypertension*, 2009;27(1):83-91.

Bova S, Blaustein MP, Ludens JH, Harris DW, DuCharme DW, Hamlyn JM. Effects of an endogenous ouabainlike compound on heart and aorta. *Hypertension*, 1991;17:944-950.

Budzikowski AS, Leenen FH. Brain 'ouabain' in the median preoptic nucleus mediates sodium-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1997;29:599-605.

Budzikowski AS, Leenen FH. ANG II in median preoptic nucleus and pressor responses to CSF sodium and high sodium intake in SHR. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2001;281:H1210-H1216.

Callera GE, Touyz RM, Teixeira AS, Muscara MN, Carvalho MHC, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin LE, Tostes RC. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-SAL-salt hypertension. *Hypertension*, 2003;42(Pt2):1-7.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clinical Science*, 2006;110(2):243-253.

Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the american heart association professional education committee of the council for high blood pressure research. *Hypertension*, 2008;51:1403-1419.

Cao C, Payne K, Lee-Kwon W, Zhang Z, Lim SW, Hamlyn J, Blaustein MP, Kwon HM, Pallone TL. Chronic ouabain treatment induces vasa recta endothelial dysfunction in the rat. *American Journal of Physiology*, 2009;296(1):F98-F106.

Carneiro FS. Efeito da vitamina E sobre a reatividade vascular e o comportamento leucocitário em ratos hipertensos DOCA-sal [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2006.

Chen M, Webb RC, Malvin RL. Naloxone prevents increased vascular sensitivity in Goldblatt hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension. Theory and Practice*, 1990;12(8):1361-1376.

Clinical trial database. Efficacy of rostafuroxin in the treatment of essential hypertension. Available from: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00415038>>. Cited from 2010 July 2010.



Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*, 2007;131(6):1047-1058.

Cordellini S, Nigro D, Carvalho MH, Fortes ZB, Scivoletto R. Reactivity of macro- and microvessels of DOCA-salt hypertensive rats: role of the endothelial cell. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*, 1988;21(4):845-849.

Cordellini S, Carvalho MHC, Scivolletto R, Fortes ZB, Nigro D. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 1990;8:53-60.

Cordellini S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *General Pharmacology*, 1999;32(3):315-320.

Dahl LK, Knudsen KD, and Iwai J. Humoral transmission of hypertension: evidence from parabiosis. *Circulation Research*, 1969;24 Suppl 5:21-33.

Dahlöf B , Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet*, 2002;359:995-1003.

Dai X, Cao X, Kreulen DL. Superoxide anion is elevated in sympathetic neurons in DOCA-salt hypertension via activation of NADPH oxidase. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2006;290:H1019-H1026.

D'Amico M, Di Filippo C, Piegari E, Rinaldi B, Rossi F, Filippelli A. ETA endothelin receptors are involved in the ouabain-induced haemodynamic effects in the periaqueductal gray area of rats. *Life Sciences*, 2003;72:2211-2218.

Davel AP, Wenceslau CF, Akamine E, Xavier FE, Couto GK, Rossoni. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011;44(9):920-932.

De Wardener HE, Mills IH, Clapham WF. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis with follows administration of intravenous saline in dog. *Clinical Science*, 1961;21:249-258.

De Wardener HE e Clarkson EM. Concept of natriuretic hormone. *Physiological Reviews*, 1985;65:658-759.

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. *Journal of Hypertension*, 2003;21:747-753.

Doris PA. Ouabain in plasma from spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Physiology*, 1994;266:(Pt 2)H360-H364.

Dos Santos L, Xavier FE, Vassallo DV, Rossoni LV. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sciences*, 2003;74:613-627.

Dostanic-Larson I, Van Huysse JW, Lorenz JN, Lingrel JB. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2005;44:15845-15850.

Elhaïmeur F, Courderot-Masuyer C, Nicod L, Guyon C, Richert L, Berthelot A. Dietary vitamin C supplementation decreases blood pressure in DOCA-salt hypertensive male Sprague Dawley rats and this is associated with increased liver oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1973;237:77-83.

Esler M. The sympathetic system and hypertension. *American Journal of Hypertension*, 2000;13:99S-105S.

Ferrandi M, Molinari I, Barassi P, Minotti E, Bianchi G, Ferrari P. Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004;279(32):33306-33314.

Ferrari P, Ferrandi M, Minotti E, Duzzi L, Bianchi G. Effect of canrenone and hydrochlorothiazide on the development of hypertension in rat models of genetic hypertension. *Journal of Hypertension*, 1993;11 Suppl 5:S330-S331.

Ferrari P, Torielli L, Ferrandi M, Padoani G, Duzzi L, Florio M, Conti F, Melloni P, Vesci L, Corsico N, Bianchi G. PST2238: A New antihypertensive compound that antagonizes the long-term pressor effect of ouabain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998;285:83-94.

Ferrari P, Ferrandi M, Torielli L, Tripodi G, Bianchi G. PST 2238: A New Antihypertensive Compound that modulates the Na-K Pump 'in Vivo' and 'in Vitro'. *Hypertension Research*, 2000;23 Suppl 2000:S15-S19.

Ferrari P, Ferrandi M, Valentini G, Bianchi G. Rostafuroxin: a ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006;290:R529-R535.

Ferrari P. Rostafuroxin: an ouabain-inhibitor counteracting specific forms of hypertension. *Biochimica and Biophysica Acta*, 2010;1802(12):1254-1258.

Folkow B, Grimby 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*, 1958;44:255-272.

Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease : From Marvel to Menace. *Circulation*, 2006;113:1708-1714.

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. *Journal of Hypertension*, 1990; 8(11):1043-8.

Giuliumian AD, Pollock DM, Clarke N e Fuchs LC. Coronary vascular reactivity is improved by endothelin A receptor blockade in DOCA-salt hypertensive rats. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1998;274:R1613-R1618.

Ghosh M, Wang HD, McNeill JR. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 2004;141:562-573.

Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentration of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 1992;86(2):420-425.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 2000;86:494–501.

Gruber KA, Whitaker JM, Buckalew VM. Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs. *Nature*, 1980;287:743-745.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Normn RA. Arterial pressure regulation overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *American Journal of Medicine*, 1972;52:584-594.

Hamilton BP, Manuta P, Laredo J, Hamilton JH, Hamlyn JM. The new adrenal steroid hormone ouabain. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes*, 1994;1:123-131.

Hamlyn JM, Ringel R, Schaeffer J, Levinson PD, Hamilton BP, Kowarski AA, Blaustein MP. A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase associated with essential hypertension. *Nature*, 1982;300:650-652

Hamlyn JM, Harris DW, Ludens JH. Digitalis-like activity in human plasma: purification, affinity and mechanisms. *Journal Biological and Chemistry*, 1989;264:7395-7404.

Hamlyn JM, Hamilton BP, Manuta P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *Journal of Hypertension*, 1996;14:151-171.

Hamlyn JM, Laredo J, Shah JR, Lu ZR, Hamilton BP. 11-hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: multiple implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003;986:685-693.

Heringer-Walther S, Batista EN, Walther T, Khosla MC, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex improvement in SHR after ACE inhibition involves angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 2001;37:1309-1314.

Hernanz R, Briones AM, Martín A, Beltrán AE, Tejerina T, Salaces M, Alonso MJ. Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. *Journal of Hypertension*, 2008;26(10):1944-1954.

Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salaces M. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004;258:H225-H234.

Higashi K, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial Function and oxidative stress in renovascular hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 2002;346:1954-1962.

Huang BS, Huang X, Harmsen E, Leenen FHH. Chronic central versus peripheral ouabain, blood pressure, and sympathetic activity in rats. *Hypertension*, 1994;23:1087-1090.

Huang BS, Leenen, FHH. Brain renin-angiotensin system and ouabain induced sympathetic hyperactivity and hypertension in wistar rats. *Hypertension*, 1999;34:107-112.

Huang BS, Ganten D, Leenen FHH. Responses to central Na<sup>+</sup> and ouabain are attenuated in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Hypertension*, 2001;37:683-686.

Jacob F, Clark LA, Guzman PA, Osborn JW. Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. *American Journal of Hypertension*, 2005;289:H1519-1529.

Jiang X, Ren YP, Lv ZR. Ouabain induces cardiac remodeling in rats independent of blood pressure. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007;28(3):344-352.

Jiménez R, López-Sepúlveda R, Kadmiri M, Romero M, Vera R, Sánchez M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Dueñas M, Santos-Buelga C, Duarte J. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007;43:462-73

Johnson RJ, Fink GD, Watts SW, Galligan JJ. Endothelin receptor function in mesenteric veins from deoxycorticosterone acetate salt-hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2002;20(4):665-676.

Kaplan JH. The sodium pump and hypertension: a physiological role for the cardiac glycoside binding site of the Na,K-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2005;44:15723-15724.

Kaplan NM. *Clinical hypertension*. 9 nd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2006. p. 1.

Katholi R, Naftilan AJ, Oparil S. Importance of Renal Sympathetic Tone in the Development of DOCA-Salt Hypertension in the Rat. *Hypertension*, 1980;2:266-273.

Kempner W. Treatment of hypertensive vascular disease with rice diet. *The American Journal of Medicine*, 1948;4(4):545-577.

Kim WJ, Lee J, Park YH, Nam SC. Altered vascular calcium regulation in hypertension. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 1997;1:529-535.

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. *Hypertension Research*, 2000;23 Suppl 2000:67-76.

Ko EA, Amiri F, Pandey NR, Javeshghani D. Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent o vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2007;292:H1789-H1795.

Kojima I, Yoshihara S, Ogata E. Involvement of endogenous digitalis-like substance in genesis of deoxycorticosterone-salt hypertension. *Life Science*, 1982;30(21):1775-1781.

Kojima I. Circulating digitalis-like substance is increased in DOCA-salt hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984;122:129-136.

Konishi M, Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*, 1983;5:881-886.

Kramer H, Gonick H, Paul W. Third factor: inhibitor of Na-K-ATPase? In: *Proceedings of the Fourth International Congress on Nephrology*. New York: Karger, 1969;373.

Kurashina T, Kirchner KA, Granger JP, Patel AR. Chronic sodium-potassium-ATPase inhibition with ouabain impairs renal haemodynamics and pressure natriuresis in the rat. *Clinical Science*, 1996;91:497-502.

Landmesser ULF, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell

nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003; 111:1201–1209.

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(Pt2):401-407.

Leenen FHH. The brain and salt sensitive hypertension. *Current Hypertension Reports*, 2002;4:129-135.

Lima VV, Giachini FRC, Choi H, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, Carvalho MHC, Webb RC, Tostes RC. Impaired vasodilator activity in DOCA-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension*, 2009;53(2):166-74.

Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na and Ca<sup>2+</sup> concentrations. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000;275:27838-27844.

Liu L, Zhao X, Pierre SV, Askari A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2007;293:C1489-C1497.

Ludens JH, Clark MA, Robinson FG, DuCharme DW. Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabain-like compound. *Hypertension*, 1992;19:721-724.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 1986;8:344-348.

Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *Journal of Hypertension*, 1994;12:549-560.

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. *Journal of Hypertension*, 2011;29:349-356.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E. Important GABAergic mechanism within the NTS and the control of sympathetic baroreflex in SHR. *Autonomic Neuroscience*, 2011;20:159(1-2):62-70.

Marín J, Redondo J. Vascular Sodium Pump: Endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacology & Therapeutics*, 1999;84:249-271.

Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF- $\kappa$ B and the regulation of vascular cell function. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2000;20:e83-e88.

Messerli FH, Grossman E, Goldbourt U. Are beta-blockers efficacious as first-line therapy for hypertension in the elderly? A systematic review. *Journal of the American Medical Association*, 1998;279(23):1903-1907.

Morel N, Godfraind T. The endothelin ET A receptor antagonist, BQ-123, normalizes the response of SHR aorta to  $\text{Ca}^{2+}$  channel activator. *European Journal of Pharmacology*, 1994;252:R3-R4.

Mueller SM and Ertel PJ. Association between sympathetic nerve activity and cerebrovascular protection in young spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 1983;14:88-92.

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

Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovascular Research*, 1999;41:9-13.

Mulvany MJ. Small Artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News in Physiological Sciences*, 2002;17:105-109.

Murrell JR, Randall JD, Rosoff J, Zhao J, Jensen RV, Gullans SR, Hauptert GT. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. *Circulation*, 2005;112:1301-1308.

Nakamura T, Ichikawa S, Sato K, Tajima Y, Fujita H, Murata K. Time-related alterations in an endogenous digitalis-like factor in the development of DOCA-salt hypertension in rats. *Clinical and Experimental Hypertension. Theory and Practice*, 1987;9(11):1733-1744.

Nesher M, Dvela M, Igbokwe VU, Rosen H, Lichtstein D. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2009;297:H2026-H2034.

Nunes VW, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHC, Zorn TMT, Scivoletto R. Influence of enalapril on the endothelial function of DOCA-salt hypertensive rats. *General Pharmacology*, 2000;34:117-125.

O'Donoghuy TL, Brooks VL. Deoxycorticosterone Acetate-Salt Rats : Hypertension and Sympathoexcitation Driven by Increased NaCl Levels. *Hypertension*, 2006;47:680-685.

Padilha AS, Rossoni LV, Xavier FE, Vassallo DV. 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*, 2004;44:372-380.

Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Alonso MJ, Salaices M. Ouabain treatment changes the role of endothelial factors in rat resistance arteries. *European Journal of Pharmacology*, 2008;600(1-3):110-116.

Padilha AS, Salaices M, Vassallo DV, Batista PR, Siman FDM. Hypertensive effects of the iv administration of picomoles of ouabain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011;44(9):933-938.

Pamnani M, Huot S, Buggy J, Clough D, Haddy FJ. Demonstration of a humoral inhibitor of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*, 1981;3 Suppl II:II96-II101.

Pamnani MB, Haddy FJ. Humoral sodium-potassium inhibitor in reduced renal mass-saline hypertension rats. *Progress in Biochemical Pharmacology*, 1988;23:35-45.

Park CG, Hong SJ, Suh SY, Lim HE, Kim, JW, Seo HS, Oh DJ, Ro YM. Time-related alterations of endogenous ouabain in DOCA-Salt hypertensive rats. *The Korean Circulation Journal*, 2004;34(12):1216-1222.

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. *American Journal of Hypertension*, 2001;14:44-50.

Pitzalis MV, Hamlyn JM, Messaggio E, Iacoviello M, Forleo C, Romito R, Tommasi E, Rizzon P, Bianchi G, Manunta P. Independent and incremental prognostic value of endogenous ouabain in idiopathic dilated cardiomyopathy. *The European Journal of Heart*, 2006;8:179-186.

Quadri L, Bianchi G, Cerri A, Fedrizzi G, Ferrari P, Gobbin M, Melloni P, Sputore S, Torri M. 17 beta-(3-furyl)-5 beta-androstane-3 beta, 14 beta, 17 alpha-triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action. *Journal of Medical Chemistry*, 1997;40:1561-1564.

Rodrigues SF, Granger DN. Cerebral microvascular inflammation in DOCA salt-induced hypertension: role of angiotensin II and mitochondrial superoxide. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2012;32(2):388-75.

Rodriguez-Iturbe B, Romero F, Johnson RJ. Pathophysiological Mechanisms of Salt-Dependent Hypertension. *American Journal of Kidneys Diseases*, 2007;50:655-672.



Rodríguez-Mañas L, Sánchez-Ferrer CF, Pareja A, Casado MA, Arribas S, Salaices M, Marín J. Neurogenic component of ouabain-evoked contractions is modulated by the endothelium. *Hypertension*, 1994;23(1):10-17.

Rossoni LV, Cunha V, França A, Vassallo DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1999;4:887-892.

Rossoni LV, Pinto VD, Vassallo DV. Effects of small doses of ouabain on the arterial blood pressure of anesthetized hypertensive and normotensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001;34:1065-1077.

Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations on vascular reactivity to phenylephrine and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and expression in hypertension induced by chronic administration of ouabain. *British Journal of Pharmacology*, 2002a;135:771-781.

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. *American Journal of Physiology*, 2002b;283:H2110-H2118.

Rossoni LV, dos Santos L, Barker LA, Vassallo DV. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2003;41:105-116.

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 Sciences*, 2006;79:1537-1545.

Rubanyi, GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1993;22 Suppl 4:1-14.

Schiffrin, E. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmacology*, 2005;43:19-29.

Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: Their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *American Journal of Physiology*, 2007;293:509-536.

Selye H, Stone H. Pathogeneses of the cardiovascular and renal changes which usually accompany malignant hypertension. *Journal of Virology*, 1946;56:399.

Seyle H, Bois P. The hormonal production of nephrosclerosis and periarteritis nodosa in the primate. *British Medical Journal*, 1957;1:183-6.

Shepherd JT. Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. *Journal of Hypertension*, 1990;8 Suppl 7:S15-S17.

- Shibuya J, Ohyanagi M, Iwasaki T. Enhanced myogenic response in resistance small arteries from spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 1998;767–773.
- Siman FD, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. A low concentration of ouabain (0.18 microg/kg) enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats by inhibiting the Na<sup>+</sup> pump and activating the renin-angiotensin system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2010;43:767-776.
- Skoumal R, Szokodi I, Aro J, Földes G, Göőz M, Seres L, Sárman B, Lakó-Futó Z, Papp L, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Involvement of endogenous ouabain-like compound in the cardiac hypertrophic process in vivo. *Life Sciences*, 2007;80:1303-1310.
- Sleight P. Role of the baroreceptor reflexes in circulatory control, with particular reference to hypertension. *Hypertension*, 1991;18(suppl III):III-31-III-34.
- Soltis EE e Field FP. Extracellular calcium and altered vascular responsiveness in the deoxycorticosterone acetate-salt rat. *Hypertension*, 1986;8:526-532
- Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation*, 2000;101:1722-1728.
- Songu-Mize E, Bealer SL, Caldwell W. Effect of AV3V lesions on development of DOCA-Salt hypertension and vascular Na<sup>+</sup>-Pump activity. *Hypertension*, 1982;4:575-580.
- Staessen JA, Thijs L, Stolarz-Skrzypek K, Bacchieri A, Barton J, Esposito ED, de Leeuw PW, Dłużniewski M, Glorioso N, Januszewicz A, Manunta P, Milyagin V, Nikitin Y, Souček M, Lanzani C, Citterio L, Timio M, Tykarski A, Ferrari P, Valentini G, Kawecka-Jaszcz K, Bianchi G. Main results of the ouabain and adducin for specific intervention on sodium in hypertension trial (OASIS-HT): a randomized placebo-controlled phase-2 dose-finding study of rostafuroxin. *Trials*, 2011;14:12:13.
- Takahashi H, Okabayashi H, Matsuzawa M, Suga K, Ikegaki I, Yoshimura M, Ijichi H. Centrally induced vasopressor responses to ouabain in DOCA-salt hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 1987;21(6):439-446.
- Teruya H, Yamazato M, Muratani H, Sakima A, Takishita S, Terano Y, Fukiyama K. Role of ouabain-like compound in the rostral ventrolateral medulla in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997;99:2791-2798.
- The seventh report of the joint national committee on prevention, detection evaluation, and treatment of high blood pressure. *Journal of American of Association*, 2004;289:2560-2572.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, 2004;44:248–252.

Touyz RM. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension*, 2008;51:172-174.

Valente RC, Capella LS, Monteiro RQ, Rumjanek VM, Lopes AG, Capella MAM. Mechanisms of ouabain toxicity. *The FASEB Journal*, 2003;17:1700-1702.

Van Huysse JW. Endogenous brain Na pumps, brain ouabain-like substance and the  $\alpha 2$  isoform in salt-dependent hypertension. *Pathophysiology*, 2007;14:213-220.

Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 2005;144:449-458.

Veelken R, Hilgers KF, Ditting T, Leonard M, Mann JFE, Geiger H, Luft FC. Impaired cardiovascular reflexes precede deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension*, 1994;24:564-570.

Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, Touyz RM, Schiffrin EL. Xanthine Oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2008;H281-288.

Vinson GP. The mislabelling of deoxycorticosterone: making sense of corticosteroid structure and function. *Journal of Endocrinology*, 2011;211:3-16.

Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Durante E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Tacca MD. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. Role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension*, 2009;53:1008-1016.

Xavier FE, Salaices M, Marquez-Rodas I, Alonso MJ, Rossoni LV, Vassallo DV, Balfagón G. Neurogenic nitric oxide release increases in mesenteric arteries from ouabain hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2004a;22:949-957.

Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagón 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. *British Journal of Pharmacology*, 2004b;143:215-225.

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. *British Journal of Pharmacology*, 2004c;143:794-802.

Xavier FE, Davel AP, Fukuda LE, Rossoni LV. Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: the role of vascular mechanisms. *Journal of Hypertension*, 2009;27:1233-1242.

Xie Z, Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Molecular Interventions*, 2003;3:157-168.

Xu J, Carretero OA, Liao TD, Peng H, Shesely EG, Xu J, Liu TS, Yang JJ, Reudelhuber TL, Yang XP. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2010;299(5):H1328-H1338.

Wang H, Huang BS, Leenen FH. Brain sodium channels and ouabainlike compounds mediate central aldosterone-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology*, 2003;285:H2516-H2523.

Webb RC, Bohr DF. Potassium-induced relaxation as an indicator of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase activity in the vascular smooth muscle. *Blood Vessels*, 1978;15:198-207.

Welch WJ, Patel K, Modlinger P, Mendonca M, Kawada N, Dennehy K, Aslam S, Wilcox CS. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1 and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2007; 293: H2644–H2649.

Wenceslau CF, Davel AP, Xavier FE, Rossoni LV. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. *Journal of Vascular research*, 2011;48(4):316-326.

Wenceslau CF. Papel da ouabaína endógena sobre a pressão arterial, atividade simpática e função vascular de artérias de resistência de ratos DOCA-Sal. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

White MR, Rivera CO, Davison CB. Differential contribution of endothelial function to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from deoxycorticosterone-Salt hypertensive rats. *Hypertension*, 1996;27:1245-1253.

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2001;19(4):741-748.

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;30:94-98.

Yemane, H, Busauskas M, Burris SK, Knuepfer MM. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. *Experimental Physiology*, 2009;95.1:51-55.

Yuan CM, Manuta P, Hamlyn JM, Chen S, Bohlen E, Yeun J, Haddy FJ, Pamnani MB. Long-term ouabain administration produces hypertension in rats. *Hypertension*, 1993;22:178-187.

Zhang J, Leenen FHH. AT1 receptor blockers prevent sympathetic hyperactivity and hypertension by chronic ouabain and hypertonic saline. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2001;280:H1318-H1323.

Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke W, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, Wier WG, Blaustein MP. Sodium pump  $\alpha_2$  subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *The Journal of Physiology*, 2005;569:243-256.