INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DOSES NANOMOLARES DE OUABAÍNA NA REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA DE RATOS

Priscila Rossi de Batista

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Maio de 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DOSES NANOMOLARES DE OUABAÍNA NA REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA DE RATOS

Priscila Rossi de Batista

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Apresentada e aprovada em ___/___/_____, por:

_____

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador – UFES

_____

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha – Co-orientadora – UFES

_____

Profª. Drª. Ivanita Stefanon – UFES

_____

Profª. Drª. Ana Paula Couto Davel – USP

Coordenador do PPGCF:

_____

Prof. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Maio de 2009.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco.
À medida que vamos adquirindo conhecimento, instalam-se as dúvidas."

Johann Wolfgang Von Goethe

Dedico esse trabalho, especialmente, à minha mãe,
por sempre ter me conduzido ao caminho
do conhecimento e da sabedoria.

Ao Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo,
meu especial agradecimento pela oportunidade,
acolhimento, orientação, inspiração e amizade.
Obrigada por me encorajar e me amparar diante das adversidades,
despertando em mim todo o entusiasmo de um pesquisador.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo, agradeço a Deus, por me iluminar e me preencher de bênçãos durante toda a minha caminhada.

Ao meu irmão, que com toda sua admirável inteligência, me ensinou a raciocinar para tudo, e jamais hesitou em me ajudar, desde a estatística, os cálculos, o inglês, as conclusões óbvias, até aquelas “filosofadas” e questionamentos sobre qualquer assunto do mundo.

Ao meu pai que, com toda a sua discrição, me ensinou a importância do método, da disciplina e da organização, dádivas que facilitaram muito as minhas conquistas. Obrigada pela admiração e confiança.

À minha “vovolinha” Tereza Luiza, que no silêncio de sua doença progressiva, me fez um ser humano melhor e muito mais forte.

Aos meus familiares, paternos e maternos, os quais sempre acreditaram em mim, ajudando e incentivando os meus estudos.

À minha co-orientadora e amiga Alê, que com sua serenidade, paciência e conhecimento, guiou não apenas o meu projeto, mas meus primeiros passos enquanto pesquisadora.

À professora Dra. Ivanita, pelo grande exemplo, pelo apoio, pelas críticas construtivas e por disponibilizar a sua sabedoria para a ciência.

Aos amigos do laboratório, com os quais Deus me presenteou: Núbia, Mirinha, Fabi, Edu, Tatá, Keli, Lú Camilo, Lorinha, Edna, Roger, Karina, Guilherme e Aurélia. Obrigada por tornarem tudo muito melhor!

Aos demais companheiros do LEMC e de toda a Fisiologia que contribuíram para o meu trabalho e para tantos agradáveis momentos.

Àqueles que sempre me serviram de brilhante exemplo como fisioterapeutas, professores e companheiros, Franck e Giulia. Serei eternamente grata por terem me apresentado ao LEMC.

Às minhas grandes amigas, obrigada por compreenderem a ausência, obrigada pelas palavras de conforto, pela diversão, pelo apoio nos momentos difíceis e, acima de tudo, por saber que posso sempre contar com vocês: Mary, Camilinha, Prussia, Lud, Lari, Mi, Lívia, Paula, Clarinha, Rê, Isa, Lê, Caco, Pam e Rafa.

Ao Kiko, por todo companheirismo, incentivo e compreensão. E à tia Cláudia, Glauber, Paula, Fabinho e Camila, por terem me acolhido sempre, mesmo diante dos momentos de cansaço e ausência.

Ao Carlos André Daher (Billy), agradeço por ter participado com muita disponibilidade e empenho na execução da parte prática deste trabalho.

À grande equipe da Assistência Domiciliar da Unimed Vitória, da qual me orgulho em fazer parte. Muito obrigada por permitirem meu amadurecimento enquanto pessoa e profissional junto a vocês. Particularmente, agradeço às minhas ótimas companheiras Andréia e Juli.

Meu agradecimento especial à Nazira Daher, pela grande oportunidade, conselhos, credibilidade e por toda amizade. Certamente devo parte dessa conquista a você.

Obrigado também à equipe AOT – Artroscopia, Ortopedia e Traumatologia –, por permitirem o desenvolvimento de projetos e estudos junto a vocês, na tentativa de produzir ciência.

Aos demais professores e funcionários da pós, com os quais sempre pude contar.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPES/FUNCITEC.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
RESUMO
ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 17
1.1. Hipertensão arterial 17
1.2. Endotélio Vascular.....20
1.2.1. Disfunção endotelial na hipertensão arterial.....21
1.3. Na^+K^+ATPase na disfunção endotelial.....27
1.4. Ouabaína.....30
1.4.1. Ouabaína na fisiopatogenia na hipertensão arterial.....35

2. OBJETIVOS.....41
2.1. Objetivo geral 41
2.2. Objetivos específicos.....41

3. MATERIAIS E MÉTODOS 42
3.1. Animais experimentais.....42
3.2. Metodologia aplicada para avaliação dos valores pressóricos.....43
3.3. Metodologia aplicada para estudos de reatividade vascular no leito arterial caudal de ratos.....44

3.3.1. **Obtenção do segmento proximal da artéria caudal**.....44
3.3.2. **Protocolos experimentais**.....46

3.3.2.1. Efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina.....46
3.3.2.2. Modulação do endotélio no efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina.....47

3.3.2.3. Influência do tratamento crônico com ouabaína na via do óxido nítrico (NO) sobre a resposta pressora à fenilefrina.....47
3.3.2.4. Estudo do bloqueio com tetraetilamônio (TEA) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em ratos tratados com ouabaína.....48
3.3.2.5. Envolvimento dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre o efeito do tratamento crônico com ouabaína na resposta pressora à fenilefrina.....48
3.3.2.6. Efeito do duplo bloqueio – via do ácido araquidônico-ciclooxigenase e síntese de NO – na reatividade vascular à fenilefrina em ratos tratados com ouabaína.....49
3.3.2.7. Estudo da atividade funcional da Na^+K^+ATPase diante do tratamento crônico com ouabaína.....49

3.4. Expressão dos dados e análise estatística 51
3.5. Fármacos e reagentes utilizados 52

4. RESULTADOS.....53
4.1. Dados ponderais.....53
4.2. Valores pressóricos e de frequência cardíaca.....53
4.3. Avaliação da integridade vascular e resposta vasoconstritora à fenilefrina.....54
4.4. Efeito do tratamento com ouabaína (25µg/kg/dia, *i.m.*) durante 15 dias sobre a resposta pressora à fenilefrina.....57
4.5. Modulação do endotélio no efeito do tratamento por 15 dias com ouabaína sobre a reatividade vascular à fenilefrina.....58
4.6. Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito do tratamento com ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....60
4.6.1. **Efeito do tratamento com ouabaína na via do óxido nítrico**.....60

4.6.2. **Análise dos efeitos do tratamento com ouabaína sobre a participação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF)**.....62

4.6.3. **Efeito da ouabaína, administrada cronicamente, sobre os prostanóides derivados da via do ácido araquidônico / ciclooxigenase**.....64

4.6.4. **Análise da influência da ouabaína no duplo bloqueio das vias do óxido nítrico e do ácido araquidônico/ciclooxigenase (COX)**.....65

4.7. Estudo da atividade funcional da Na^+ K^+ ATPase em ratos tratados com ouabaína durante 15 dias.....68

5. DISCUSSÃO 69

6. CONCLUSÃO 81

7. REFERÊNCIAS.....82

LISTA DE ESQUEMAS, TABELAS E FIGURAS

Esquema 1: Desenho esquemático da preparação do leito arterial caudal.

Tabela 1: Valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de ratos tratados com ouabaína e de ratos controle, obtidos através de experimentos "*in vivo*".

Figura 1: Porcentagem de relaxamento do segmento proximal da artéria caudal à acetilcolina (**A**) após pré-contração com FE (10^{-7} M) e ao nitroprussiato de sódio (**B**).

Figura 2: Reatividade vascular à fenilefrina (FE) representada por mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de FE no segmento proximal da artéria caudal de ratos Wistar do grupo CT (**A**), n=10, e do grupo OUA (**B**), n=10.

Figura 3: Reatividade vascular à fenilefrina (FE) representada por mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de FE no segmento proximal da artéria caudal de ratos Wistar do grupo CT, (n=10) e do grupo OUA (n=10).

Figura 4: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal de ratos Wistar na presença (E^+) e na ausência (E^-) do endotélio em ratos CT (**A**), n=10, e tratados com OUA (**B**), n=10; Modulação endotelial expressada pela porcentagem da diferença da área abaixo da curva (%dAUC) em ratos CT (n=10) e em ratos tratados com OUA (n=10) (**C**).

Figura 5: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=11, e tratados com OUA (**B**), n=12, antes e após infusão por uma hora de L-NAME; Modulação provocada pelo L-NAME expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (n=11) e tratados com OUA (n=12) (**C**).

Figura 6: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=10, e tratados com OUA (**B**), n=12, antes e após infusão por uma hora de TEA; Modulação provocada pelo TEA expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (n=10) e tratados com OUA (n=12) (**C**).

Figura 7: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=11, e tratados com OUA (**B**), n=11, antes e após infusão por uma hora de Indometacina (10μM).

Figura 8: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=11, e tratados com OUA (**B**), n=10, antes e após infusão por uma hora de Indometacina e L-NAME; Modulação provocada pela co-infusão de Indometacina e L-NAME expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (n=11) e tratados com OUA (n=10) (**C**).

Figura 9: Diferenças na modulação provocada pela co-infusão de L-NAME comparada com a co-infusão de Indometacina e L-NAME, expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (**A**) e ratos tratados com OUA (**B**).

Figura 10: Curva de relaxamento induzida pelo Cloreto de Potássio (KCl) no terço proximal da artéria caudal em ratos controle (n=14) e tratados com OUA (n=12). Resultados expressos como porcentagem de contração residual mantida após a pré-contração com FE (10^{-7} M) e adição de KCl (1mM, 2mM, 4mM, 6mM).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

COX – Ciclooxigenase

DC – Débito Cardíaco

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDRF – Fator Relaxante Derivado do Endotélio

EET – Ácidos epóxi-eicosatrienos

eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial

FE – Fenilefrina

HA – Hipertensão Arterial

iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina metil ester

MLV – Músculo Liso Vascular

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

NPS – Nitroprussiato de Sódio

PA – Pressão Arterial

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

$PGF_{2\alpha}$ – Prostaglandina $F_{2\alpha}$

PGG_2 – Prostaglandina G_2

PGH_2 – Prostaglandina H_2

PGI_2 – Prostaciclina

PKC – Fosfoquinase C

PM – Peso Molecular

RVP – Resistência Vascular Periférica

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

TEA - Tetraetilamônio

TXA_2 – Tromboxano A_2

RESUMO

A ouabaína é um glicosídeo cardíaco presente no plasma de mamíferos em concentrações nanomolares, que podem estar elevadas em diversos modelos de hipertensão arterial, sugerindo uma associação à gênese e/ou manutenção da mesma. No entanto, estudos de reatividade vascular em estágios iniciais da hipertensão arterial induzida por ouabaína ainda não foram desenvolvidos em artérias de condutância. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento por 15 dias com ouabaína na reatividade vascular do segmento proximal da artéria caudal de ratos que, por sua vez, comporta-se como um vaso de condutância.

Foram utilizados ratos Wistar (n = 68, 250 – 350g), divididos em grupo controle e tratados com ouabaína, na concentração de 25µg/kg/dia, durante 15 dias. Os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg; *i.p.*) e heparinizados. Após 10 minutos, medidas hemodinâmicas "*in vivo*" foram realizadas. Em seguida, o segmento proximal da artéria caudal foi canulado com cateter preenchido com solução nutridora. A cauda foi, então, seccionada em seu terço proximal e perfundida com solução de Krebs sob fluxo constante (2,5 ml/min) à 36°C. O sistema de perfusão foi conectado a um transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados, conectado a um computador para registros contínuos de pressão de perfusão média. A preparação foi submetida à estabilização de 45 minutos para que fosse dado início os protocolos experimentais.

A reatividade vascular à fenilefrina (FE) (0,001-100µg, *in bolus*) foi avaliada na presença e na ausência do endotélio. A participação dos fatores endoteliais foi analisada através das curvas dose-resposta à FE antes e após administração de L-NAME (100µM), tetraetilamônio (TEA, 5 mM), indometacina (10µM) e, por fim, co-administração com indometacina e L-NAME, com o intuito de investigar, respectivamente, óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostanóides, bem como a interação de NO e prostanóides. A atividade funcional da Na^+K^+ATPase foi analisada através da curva de relaxamento ao KCl. As curvas dose-resposta à FE foram analisadas através da diferença da área abaixo da curva (%dAUC). Os dados estão apresentados como média ± EPM. Para análise

estatística foi utilizado teste t pareado e não pareado, sendo $p<0,05$ considerado estatisticamente significante.

O tratamento com ouabaína produziu aumento de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média, porém não modificou a reatividade vascular à FE, nem a modulação endotelial avaliada pela porcentagem da diferença da área abaixo das curvas de FE na presença e ausência do endotélio. A infusão com L-NAME aumentou a reatividade vascular à FE nos dois grupos estudados, porém esse aumento foi maior no grupo tratado com ouabaína. Este comportamento também foi observado diante da perfusão com TEA, sugerindo maior liberação de NO e EDHF nos animais tratados com ouabaína. A perfusão com indometacina não provocou mudanças na reatividade, no entanto, a co-perfusão com L-NAME e indometacina promoveu aumento de reatividade a FE nos dois grupos estudos. Todavia, somente no grupo tratado com ouabaína, esse aumento de reatividade a FE foi menor do que aquele obtido somente após perfusão com L-NAME, sugerindo liberação de prostanóides vasoconstritores. O tratamento com ouabaína também foi capaz de promover aumento do relaxamento ao KCl.

A administração de concentrações nanomolares de ouabaína, por 15 dias, leva ao aumento das pressões arteriais sistólica, diastólica e média, porém não promove alteração de reatividade vascular nas artérias de condutância estudadas. Entretanto, aumenta a liberação endotelial de NO, EDHF e prostanóides vasoconstritores, além de sugerir um aumento da atividade da bomba de sódio. Sendo assim, acredita-se que a liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores se contrabalanceiam entre si, inalterando a reatividade vascular. Os resultados obtidos neste estudo sugerem modificações da participação dos fatores endoteliais no início da hipertensão arterial induzida pela ouabaína.

ABSTRACT

Ouabain is a cardiac glycoside found in the plasma of mammals at nanomolar concentrations, which may be elevated in several models of arterial hypertension, suggesting an association with its genesis or maintenance. However, studies of vascular reactivity in the early stages of arterial hypertension induced by ouabain have not been developed in conductance arteries yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of treatment with ouabain for 15 days in the vascular reactivity of the proximal segment of the caudal artery of rats, which, in turn, behaves as a conductance vessel.

We used Wistar rats (n = 68, 250 – 350g), divided into control group and treated with ouabain, in the concentration of 25µg/kg/day, for 15 days. Animals were anesthetized with urethane (1,2g/kg, *i.p.*) and heparinized. After 10 minutes, hemodynamic measurements in vivo were performed. Then the proximal segment of the caudal artery was cannulated with a catheter filled with nutrient solution. The tail was then sectioned at its proximal third and perfused with Krebs solution under constant flow (2,5ml/min) at 36°C. The perfusion system was connected to a pressure transducer connected to a data acquisition system, connected to a computer for continuous recording of average perfusion pressure. The preparation was subjected to the stabilization of 45 minutes so the experimental protocols were started.

Vascular reactivity to phenylephrine (FE) (0,001-100µg, *in bolus*) was assessed in the presence and absence of endothelium. The involvement of endothelial factors were analyzed by dose-response curves to FE before and after administration of L-NAME (100mM), tetraethylammonium (TEA, 5mM), indomethacin (10mM), and finally co-administration with indomethacin and L-NAME in order to investigate, respectively, nitric oxide (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), prostanoids, and the interaction of NO and prostanoids. The functional activity of Na^+K^+ATPase was analyzed by the curve of relaxation to KCl. The dose-response curves to FE were analyzed using the difference of area under the curve (%dAUC). Data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using paired and unpaired t test, and $p<0.05$ was considered statistically significant.

The treatment with ouabain produced an increase in systolic blood pressure, diastolic blood pressure and mean arterial pressure but did not modify the vascular reactivity to FE, either the endothelial modulation assessed by the percentage of difference of area under the FE curves in the presence and absence of endothelium. The infusion with L-NAME increased vascular reactivity to FE in the two studied groups, but this increase was greater in the group treated with ouabain. This behavior was also observed with the perfusion with TEA, suggesting increased release of NO and EDHF in animals treated with ouabain. The perfusion with indomethacin caused no changes in reactivity, however, co-perfusion with L-NAME and indomethacin increased FE reactivity in the two studied groups. Nevertheless, only in the group treated with ouabain, this increased FE reactivity was smaller than that obtained after perfusion with only L-NAME, suggesting release of vasoconstrictive prostanoids. Treatment with ouabain was also able to promote increase of the KCl relaxation.

The administration of nanomolar concentrations of ouabain for 15 days leads to increased systolic, diastolic and average blood pressure, but does not promote change in vascular reactivity in the conductance arteries studied. However, it increases the endothelial release of NO, EDHF and prostanoids vasoconstrictors, in addition to suggesting an increased activity of the sodium pump. Therefore, it is believed that the release of vasodilator and vasoconstrictor factors offset each other, unchanging vascular reactivity. The results of this study suggest changes in the participation of endothelial factors occurs during the onset of arterial hypertension induced by ouabain.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial (HA) é considerada um processo patológico crônico de etiologia multifatorial, caracterizada por elevação crônica da pressão arterial (PA) basal, representando um importante fator de risco para doenças cardiovasculares. A hipertensão constitui-se um relevante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, por ser uma doença de alto risco e difícil controle, sendo responsável por alta freqüência de internações hospitalares, além de gerar custos médicos e sócio-econômicos elevados, decorrentes principalmente de suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica. Entre os fatores de risco para mortalidade, a HA justifica 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença arterial coronariana. Estudos epidemiológicos realizados em algumas cidades do Brasil demonstram prevalência de HA de 22,3% a 43,9% (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006). Tais aspectos justificam o empenho em se estudar os mecanismos relacionados à fisiopatologia da HA.

Os níveis pressóricos considerados normais para adultos são inferiores a 140 mmHg de pressão arterial sistólica e a 90 mmHg de pressão arterial diastólica, sendo valores iguais ou superiores a esses classificados como HA (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006). Portanto, uma vez que não existe um valor preciso a partir do qual os valores de PA passam a aumentar o risco cardiovascular, a conceituação de HA é arbitrária e definida operacionalmente por razões práticas para avaliação de risco e tratamento de um indivíduo (Pereira e Krieger, 2005), e também por considerações em relação à lesão de órgãos-alvo e demais doenças associadas.

Estudos relatam que 95% dos pacientes hipertensos são portadores de hipertensão “primária ou essencial”, nos quais não pode ser imediatamente evidenciada uma causa básica renal ou adrenal para elevação da PA. Este tipo de hipertensão é basicamente decorrente da interação de fatores genéticos e ambientais. Por outro lado, na hipertensão secundária, o processo hipertensivo se deve a uma doença renal ou arterial renal, ao excesso de hormônios corticais ou

medulares adrenais, ao uso de medicamentos ou à artrite sistêmica (Perry *et al*., 1994).

Muitos são os fatores que contribuem para a origem e manutenção da HA, classificados em intrínsecos ou extrínsecos, podendo atuar isoladamente ou associados. Dentre os fatores intrínsecos, estão incluídas as alterações nos parâmetros hemodinâmicos com modificações no débito cardíaco (DC) e na resistência vascular periférica (RVP) (Folkow, 1982); alterações funcionais como, por exemplo, aumento da atividade simpática e do sistema renina-angiotensina; resistência à insulina; hereditariedade (Harrap, 1994); raça (Freis *et al*., 1973) e prevalência de certos grupos sanguíneos (Miller *et al*., 1979). Os fatores extrínsecos, por sua vez, englobam a obesidade, o tabagismo, o sedentarismo, o consumo de sal (Bakris e Mensah, 2002) e o aumento de colesterol no sangue (Zhang *et al*., 2003).

Sabe-se que a PA é uma entidade física, sendo assim, influenciada por fatores físicos, como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, que são resultantes da interação entre o DC (freqüência cardíaca x volume sistólico), a RVP e a capacitância venosa. Ao considerar a relação PA = DC x RVP, conclui-se que fatores capazes de alterar o DC e/ou a RVP, modificam consequentemente a PA. Entretanto, são alterações na resistência vascular as principais responsáveis por modificações na PA (Folkow, 1982; Lund-Johansen, 1983). Corroborando estes estudos, diversos outros sugerem que o aumento da reatividade vascular por agentes pressóricos pode ser um dos fatores que contribuem para a hipertensão, como citado, entre outros, por Bohr e Webb (1984).

A resistência vascular pode ser modificada pela estrutura, pela mecânica e pela função dos vasos sanguíneos (Integan e Schiffrin, 2000). Alterações estruturais, como redução do diâmetro luminal e espessamento da parede arterial, alterações mecânicas, como redução da elasticidade, bem como, modificações nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora, dependentes do endotélio (Lüscher e Vanhoutte, 1986), podem repercutir em aumento da resistência vascular e, consequentemente, em HA (Integan e Schiffrin, 2000; Mulvany, 2002; 2003). Dentre as alterações celulares que modificam a resistência vascular, podem ser citados: o aumento intracelular de Ca^{2+} que, por sua vez, aumenta a reatividade do músculo liso vascular (MLV) aos agentes vasoconstritores, como os agonistas α-1 agrenérgicos,

noradrenalina e fenilefrina (Horowitz *et al*., 1996); o aumento da sensibilidade às proteínas contráteis; o aumento da permeabilidade da membrana aos íons cálcio e sódio; as modificações na atividade da bomba de cálcio sensível ao ATP (Ca^{2+}ATPase) da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático; as modificações da atividade do trocador sódio-cálcio e da bomba de sódio e potássio sensível ao ATP ($Na^{+}K^{+}$ATPase) (Folkow,1982; Konishi e SU, 1983; Bohr e Webb, 1984; Marín, 1993).

A PA é estritamente regulada por mecanismos neurais, hormonais ou locais. Dentre os mecanismos locais, incluem aqueles relacionados ao endotélio vascular e suas ações endócrinas, sendo de extrema relevância o conhecimento do endotélio e suas funções, responsáveis por regular o tônus e o crescimento do MLV, participando, desse modo, do controle da PA.

1.2. ENDOTÉLIO VASCULAR

Ate a década de 80, o endotélio vascular era considerado apenas uma "barreira física" entre o sangue e o tecido subjacente. Porém, com o advento de muitos estudos, o endotélio passou a ser entendido como um órgão endócrino, capaz de promover síntese e liberação de substâncias metabolicamente ativas, participantes da regulação do tônus vascular. Também atua na manutenção da homeostase, na via de substâncias coagulantes e anticoagulantes, na participação de respostas inflamatórias e imunológicas; agregação plaquetária e regulação do crescimento vascular (Rubanyi, 1993).

O endotélio vascular é constituído por uma única camada de células confluentes que cobre a superfície interna dos vasos sangüíneos, tendo participação importante na regulação do tônus do MLV, ação fundamental para a manutenção da pressão sanguínea em níveis normais. Considerado o maior órgão endócrino no organismo, o endotélio vascular é capaz de liberar substâncias vasodilatadoras como a prostaciclina (PGI_2) (Moncada *et al.,* 1977; Vanhoutte, 1993), o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) conhecido como óxido nítrico (NO) (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer *et al.,* 1987) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Taylor e Weston, 1988; Félétou e Vanhoutte, 1988), além de substâncias vasoconstritoras como a angiotensina II (Kifor e Dzau, 1987), a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.,* 1988), e os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A_2 (TxA_2), as prostaglandinas H_2 e $F_{2\alpha}$ (PGH_2 e $PGF_{2\alpha}$) (Frolich e Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993) e os ânions superóxido (O_2^-) (Furchgott, 1983; Rubanyi e Vanhoutte, 1986).

Diversas dessas substâncias também regulam o crescimento e apoptose das células musculares lisas, além de participarem dos processos de agregação plaquetária e de adesão de leucócitos (Moncada *et al*., 1977; Moncada *et al*., 1991; Kubes *et al*., 1991; Rubanyi, 1993). Todas essas funções, entre outras, conferem ao endotélio seu papel essencial no controle e manutenção da PA.

1.2.1. Disfunção endotelial na hipertensão arterial

Como citado anteriormente, o endotélio atua de modo relevante no controle do tônus vascular e da RVP, a partir da liberação de substâncias vasoativas (Rubanyi, 1993). Alterações na síntese e/ou liberação desses fatores podem interferir na gênese e/ou manutenção da HA (Lüscher e Vanhoutte, 1986). Modificações na função endotelial, como por exemplo, aumento da síntese de fatores vasoconstritores ou de fatores de crescimento, ou também na redução da síntese de fatores vasodilatadores, podem promover elevação da resistência vascular e, consequentemente, da PA. Essas variações da função do endotélio foram estudadas por diversos pesquisadores, levando à denominação de "disfunção endotelial" (Furchgott e Zawadzki, 1980; Panza, *et al*., 1990; Taddei *et al*., 1993; Rizzoni *et al*., 1996; Rossi *et al*., 1997).

Muitos estudos correlacionam a disfunção endotelial não apenas com a HA, mas também com a aterosclerose, angina, falência renal e cardíaca, síndrome coronariana, microalbuminúria, trombose, coagulação intravascular, diabetes tipo I e II, prejuízo na tolerância à glicose, resistência à insulina, hiperglicemia, obesidade, tabagismo, entre outros (Félétou e Vanhoutte, 2006).

Alterações decorrentes da disfunção endotelial nos processos hipertensivos são multifatoriais e em muitos casos, parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, de sua duração e do leito vascular estudado. Há controvérsias na literatura em relação ao relaxamento vascular dependente do endotélio na HA, podendo estar diminuído, inalterado ou até mesmo aumentado (Lüscher *et al*., 1987; Lee *et al*., 1987; Angus e Cocks, 1989; Panza *et al*., 1990; Mantelli *et al*., 1995; Taddei *et al*., 1997; Briones *et al*., 1999).

O relaxamento dependente do endotélio pode estar diminuído devido a vários processos, dentre eles, diante do prejuízo da liberação basal de NO (Dohi *et al*., 1990). Portanto, a síntese e liberação de NO parecem não estar modificadas, mas sua biodisponibilidade está reduzida devido ao aumento da formação de ânions superóxidos (O_2^-) na hipertensão (Suzuki *et al*., 1995), os quais são responsáveis por inativar o NO, reduzindo sua ação vasodilatadora e promovendo vasoconstrição (Gryglewski *et al*., 1986). O aumento dos ânions superóxidos pode, ainda, inibir

outras fontes vasodilatadoras dependentes do endotélio, a prostaglandina I_2 (PG I_2) e o EDHF, contribuindo para o aumento da RVP e consequentemente para a HA (Félétou e Vanhoutte, 2006).

O NO constitui um dos fatores mais importantes na regulação do tônus vascular (Moncada *et al.,* 1991; Marín e Rodríguez-Martínez, 1997), com reconhecida capacidade vasodilatadora, este fator liberado pelo endotélio também age inibindo a agregação e a adesão plaquetária e leucocitária à parede vascular (Moncada *et al.,* 1991; Kubes *et al.,* 1991), além de inibir a proliferação celular (Garg e Hassid, 1989). Diversos estímulos (físicos e/ou químicos) são capazes de induzir a síntese e a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais, dentre eles: alterações na velocidade de fluxo sanguíneo (estresse de cisalhamento ou *shear stress*), estiramento vascular, agregação plaquetária, serotonina (5-HT), acetilcolina, bradicinina, trombina, substância P, adenosina difosfato (ADP), endotelina-1, angiotensina II, entre outras (Palmer *et al.,* 1987; Angus e Cocks, 1989; Moncada *et al.,* 1991; Marín e Rodríguez-Martínez, 1997).

Participam também da disfunção endotelial na HA as alterações relacionadas ao NO devido à expressão e à atividade das isoformas da óxido nítrico sintase (NOS). Estudos corroboram a teoria de que em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) a síntese de NO está normal ou até mesmo elevada, embora sua degradação esteja potencializada devido ao aumento na produção de radicais livres. (Nava *et al*., 1995; Briones *et al*., 1998; 2002). Outro fator que parece estar implicado na HA é a presença de um inibidor endógeno da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase produzido nas células endoteliais (eNOS), o N(G),N(G')-dimetilarginina (ADMA). Os níveis plasmáticos de ADMA correlacionam-se positivamente com os níveis pressóricos e inversamente com o relaxamento endotélio-dependente, constituindo-se também como fator de risco cardiovascular (Boger *et al*., 1998; Achan *et al*., 2003; Dayoub *et al*., 2003; Kielstein *et al*., 2004).

Outro fator relaxante proveniente do endotélio capaz de participar do controle e manutenção do tônus vascular é a prostaciclina (PGI_2), primeira substância vasodilatadora derivada do endotélio a ser descoberta (Moncada *et al.,* 1977). Além de ser um potente vasodilatador, a PGI_2 também atua como antiagregante plaquetária. Na célula endotelial, a PGI_2 é sintetizada a partir do ácido araquidônico,

o qual é liberado dos fosfolipídeos de membrana. Sob a ação da enzima ciclooxigenase (COX), o ácido araquidônico é convertido em prostaglandina G_2 (PGG_2) e, a partir desta, é formada a PGH_2. Diante da ação da sintase da prostaciclina, a PGH_2 é transformada em PGI_2 (Gryglewski *et al.,* 1988). Diferentemente do NO, a atividade vasodilatadora da PGI_2 é determinada pela expressão de receptores específicos no MLV (Halushka *et al.,* 1989; Coleman *et al.,* 1994). Assim, em artérias que não expressam estes receptores, a prostaciclina não participa da vasodilatação dependente do endotélio. A PGI_2, agindo sobre receptores acoplados à proteína G, ativa a enzima adenilato-ciclase, que transforma o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (Kukovetz *et al.,* 1979). O aumento do AMPc estimula a saída de Ca^{2+} do citosol e diminui a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio (Bukoski *et al.,* 1989; Abe & Karaki, 1992).

Além disso, a PGI_2 facilita a liberação de NO pelas células endoteliais (Shimokawa *et al.,* 1988). Este é um mecanismo adicional na vasodilatação induzida pela PGI_2, onde o NO aumenta os níveis de GMPc favorecendo a vasodilatação pelos mecanismos anteriormente citados, e também inibe a fosfodiesterase, aumentando a meia-vida do AMPc (Lincoln, 1989). Além disso, já é sabido que este mecanismo é sinérgico, uma vez que o próprio NO ativa diretamente a COX, tendo como resultado final o aumento da síntese de PGI_2 (Delpy *et al.,* 1996; Salvemini, 1997).

Dentre as substâncias vasodilatadoras abordadas neste estudo, capazes de atuar na modulação do tônus vascular no processo hipertensivo, há também o EDHF, fator liberado pelo endotélio, de característica ação hiperpolarizante. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar quem seria este fator endotelial, uma vez que sua natureza ainda é desconhecida. Algumas hipóteses sugerem que o EDHF seja um metabólito da via do ácido araquidônico-citocromo P450 (ácidos epóxi-eicosatrienos – EET) ou ácido araquidônico-lipooxigenase, o próprio íon potássio, a anandamida ou ainda o acoplamento elétrico envolvendo junções mio-endoteliais (Félétou e Vanhoutte, 1999; Quilley e McGiff, 2000; Hecker, 2000; Harris *et al.,* 2000). No entanto, a identidade desse fator ainda é controversa, mas estudos relatam que o EDHF parece induzir a hiperpolarização e um

subseqüente relaxamento do MLV através do aumento da condutância aos íons potássio (K^+). Porém, o mecanismo envolvido no aumento da condutância ao K^+ ainda é desconhecido e, todavia, muito variado; assim como sua natureza, este mecanismo depende da espécie e do vaso estudado (Félétou & Vanhoutte, 1999).

Até o momento sabe-se que o EDHF (ou os EDHFs), ao ativar canais de potássio e/ou a bomba de sódio, leva à hiperpolarização do MLV, inativando os canais de cálcio voltagem-dependentes, o que, por sua vez, induz a uma redução da entrada de cálcio e consequente vasodilatação. Adicionalmente, estudos sugerem que o NO é capaz de modular a liberação de EDHF. Este efeito pode ocorrer, ao menos em parte, devido à inibição da citocromo P450. Sendo assim, diante da perda ou diminuição de atividade do NO, ocorreria um aumento da atividade do EDHF, o que explicaria a manutenção da função endotelial em quadros patológicos associados a uma redução da disponibilidade do NO, tais como aterosclerose e hipertensão (Ferrer *et al.,* 1995; Taddei *et al.*, 1999; de Wit *et al.,* 2000).

Há ainda outras alterações resultantes da disfunção endotelial na hipertensão, como o aumento do estresse oxidativo, já bem evidenciado no processo hipertensivo. O metabolismo aeróbico celular produz várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas com moléculas biológicas capazes de causar oxidação, além de dano irreversível à célula, denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO). A produção normal de ERO no metabolismo celular é proveniente da geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial, de radicais livres pelo citocromo P-450, do mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido para causar morte em microorganismos, entre outros mecanismos. Mesmo gerando grandes quantidades de ERO, o organismo também, em contrapartida, sintetiza substâncias antioxidantes que inativam as ERO, havendo, portanto, um equilíbrio desse sistema. Sendo assim, o estresse oxidativo é um desarranjo deste equilíbrio, na qual substâncias pró-oxidantes se sobrepõem à capacidade antioxidante. Além disso, as ERO ativam metaloproteinases e possibilitam uma inclinação do balanço endotelial para a produção de fatores vasoconstritores, os quais possuem grande relevância na patogênese vascular (Griendling e FitzGerald, 2003).

Diversos outros estudos demonstram que a disfunção endotelial presente na HA pode aumentar a produção de substâncias vasoconstritoras derivadas do endotélio e assim, aumentar a contração do MLV dependente do endotélio, como a angiotensina II, PG H_2, TxA_2 e endotelina-1 (Leite e Salgado, 1992; Shiota *et al*., 1992; Lüsche e Vanhoutte, 1986; Taddei *et al*., 1997), as quais podem participar do crescimento e proliferação celular, além do processo de agregação plaquetária.

A literatura é ainda muito controversa em relação aos prejuízos na função vascular decorrentes da disfunção endotelial na hipertensão. Embora alguns trabalhos relatem que em animais hipertensos há uma perda na capacidade do endotélio em modular respostas vasoconstritoras, outros não relatam este efeito (Arribas *et al*., 1994; Lang *et al*., 1995; Dohi *et al*., 1996). Há ainda estudos que demonstram um aumento na liberação de agentes vasodilatadores derivados do endotélio em animais hipertensos quando comparado aos normotensos, muito provavelmente na tentativa de contrabalançar o aumento de resistência vascular (Maeso et al., 1999; Chang et al., 2002).

Alterações na via da COX estão presentes na HA, como pode ser observado em estudos com artérias de resistência de ratos hipertensos, as quais apresentam menor relaxamento endotélio-dependente devido à maior liberação de fatores vasoconstritores dependentes da COX (Diederich *et al*., 1990; Lüscher *et al*., 1990). Estudos relatam que o aumento na resposta contrátil diante de agonistas, observado na HA, parece envolver produtos da COX (Zerrouk *et al*., 1997; Rapoport e Williams, 1996; Alvarez *et al*., 2005). O ácido araquidônico liberado a partir dos fosfolipídeos da membrana, sob a ação da fosfolipase A_2, é metabolizado pela COX nas células endoteliais, resultando na síntese de PGH_2, o precursor de todos os prostanóides, incluindo o $PGF_{2\alpha}$ e o TXA_2 (Moncada & Vane, 1979). A PGH_2 e o TXA_2 agem em receptores de endoperóxidos e tromboxano no MLV induzindo vasoconstrição (Halushka *et al.,* 1989). Apesar da liberação das prostaglandinas, a prostaciclina é o maior metabólito endotelial da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase (Moncada & Vane, 1979). Assim sendo, em condições normais a influência de pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores liberados pelas células endoteliais pode ser mascarada pela produção de prostaciclina, óxido nítrico e EDHF.

Acredita-se que a HA é acompanhada por mudanças na função das células endoteliais. Sendo assim, a disfunção endotelial contribui para a manutenção do aumento da resistência vascular, favorecendo o processo hipertensivo, e também pode facilitar o desenvolvimento de outras complicações e patologias associadas à HA. Desta maneira, é possível sugerir que a avaliação da disfunção endotelial pode ser um indicador de morbidade e mortalidade nos pacientes com patologias cardiovasculares (Hednet & Sun, 1997).

Além do prejuízo no relaxamento vascular e do aumento da liberação de fatores contráteis, dependentes do endotélio, outros fatores estão envolvidos no aumento da sensibilidade a agonistas contráteis na HA. Entre estes fatores é possível citar os que modificam a mobilização do cálcio intracelular livre e a afinidade das proteínas contráteis a este íon, conseqüentemente, levando ao aumento da capacidade contrátil do MLV. Além disso, no MLV, outro componente importante para a manutenção do tônus vascular é a Na^+K^+ ATPase, cuja atividade, acredita-se, pode estar comprometida com a hipertensão e, sendo assim, podendo estar associada à hiperreatividade vascular (Webb & Bhor, 1979; Blaustein, 1993; Marín & Redondo, 1999).

1.3. Na^+K^+ ATPase NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Conhecida também como bomba de sódio, a Na^+K^+ ATPase é um complexo proteico presente na membrana plasmática das células de seres eucariotos, atuando de forma significante em diversas funções celulares vitais para o organismo. Compõe a família de ATPases tipo P, as quais são responsáveis pelo transporte ativo - contra um gradiente de concentração - de vários cátions através da membrana, como o sódio, hidrogênio, magnésio, potássio, cálcio, cobre e cádmio (Scheiner-Bobis, 2002; Stekhoven e Bonting, 1981; Horisberger, 2004). No caso da bomba de sódio, a energia liberada pela hidrólise de uma molécula de ATP é utilizada para realizar o transporte de três íons de sódio do meio intracelular e de dois íons de potássio do meio extracelular.

A bomba de sódio, por sua vez, é constituída por três subunidades: α (PM: 113 kDa), β (PM: 55 kDa) e a pequena subunidade γ (14 kDa). A subunidade α, responsável pela atividade catalítica, possui sítios de ligação para determinadas substâncias que podem estimular ou inibir a bomba de sódio como o ATP, glicosídeos cardíacos, sódio e potássio (Rose e Valdes, 1994). Já a subunidade β é altamente glicosilada, sendo essencial para a maturação e atividade normal da enzima, e parece estar envolvida na modulação da afinidade da enzima ao Na^+ e ao K^+, além de facilitar o ancoramento e estabilização da subunidade α na membrana (Blanco e Mercer, 1998). Em relação à subunidade γ, apesar de pouco conhecida, acredita-se que ela modifica o sítio externo de ligação do cátion à bomba de sódio, alterando assim, a sensibilidade da Na^+K^+ ATPase ao potássio (Béguin *et al*., 1997). Da mesma família da subunidade γ, que incluem as proteínas do plasmalema, há também o fosfolema, que tem sido demonstrada como uma proteína reguladora da atividade da bomba de sódio (Bossuyt *et al*., 2005).

A bomba de sódio pode ser regulada por diferentes mecanismos moleculares, os quais podem modular diretamente a atividade desta enzima ou a quantidade de sítios na membrana plasmática. Através de diversas vias, alguns íons, fármacos, fatores endoteliais e hormônios podem modificar a expressão gênica e a atividade da Na^+K^+ATPase. Os fatores derivados do endotélio, como a endotelina-1,

angiotensina II e óxido nítrico atuam estimulando, enquanto a PGI_2 e a PGE_2 agem inibindo a atividade da Na^+K^+ATPase, o que demonstra uma modulação endotelial sobre a bomba de sódio (Gupta *et al*., 1994a; 1994b; Marín e Redondo, 1999). Glicosídeos cardíacos, como a ouabaína, ou solução livre de K^+, também produzem inibição da bomba de sódio e, consequentemente, aumento do tônus vascular (Toda, 1980; Marín *et al*., 1988; Sato e Aoki, 1988). Resultados de diversos estudos reforçam esta idéia ao demonstrarem que o endotélio de animais normotensos e hipertensos libera fatores capazes de estimular a bomba de sódio (Redondo *et al.,* 1995; 1996; Ponte *et al*., 1996a; 1996b). Parte deste efeito pode estar relacionado à estimulação da PKC, porém a PKA e o GMPc também parecem estar envolvidos (Gupta *et al.,* 1994b; 1996; Redondo *et al.,* 1996; Marín e Redondo, 1999; Scavone *et al.,* 2000).

A Na^+K^+ATPase é o principal sistema celular responsável pelo transporte e controle da homeostasia celular de Na^+ e do potencial de membrana, sendo estes fatores essenciais para o controle do tônus vascular e regulação da PA, o que sugere que alterações na bomba de sódio podem estar envolvidas na HA (Pamnani *et al.,* 1981; Songu-Mize *et al.,* 1982; Blaustein*,* 1993; Marín e Redondo, 1999). Estudos têm demonstrado aumento da atividade da Na^+K^+ATPase em animais hipertensos quando comparados aos animais controles estudados (David-Dufilho *et al*., 1984; Magliola *et al*., 1986).

A HA cursa com modificações na expressão gênica e/ou atividade da Na^+K^+ATPase no sistema cardiovascular, tanto em humanos quanto em ratos. Estudos demonstraram que a densidade e a atividade da bomba de sódio na artéria caudal estavam alteradas, de forma fásica, com a elevação dos níveis pressóricos (Songu-Mize *et al.,* 1984; Songu-Mize e Sanford, 1990; Songu-Mize, 1991). Foi sugerido que estas alterações poderiam estar associadas a circulação de um fator *digitalis-like* no plasma destes animais (Songu-Mize *et al*., 1987). Estes resultados demonstram que a HA é capaz de modular a atividade e/ou expressão da Na^+K^+ATPase, sendo que esta modulação parece dependente do tecido estudado e da progressão do processo hipertensivo.

A partir da década de 70, estudos demonstraram que os mamíferos são capazes de produzir um fator endógeno que inibe a bomba de sódio e que, por sua

vez, este fator tem seus níveis aumentados em alguns processos patológicos, dentre eles, a HA (Haddy e Overbeck, 1976; Blaustein, 1977; Hamlyn *et al.,* 1982; Magargal e Overbeck, 1986; Schoner, 2000). Este inibidor da bomba de sódio provoca um aumento da concentração de sódio intracelular e consequentemente, aumento do tônus vascular, contribuindo, desta forma, para o aumento da PA.

Considerando a redução na atividade da bomba de sódio observada em alguns modelos de hipertensão, foi sugerido que no plasma desses animais havia um fator circulante capaz de inibir a Na^+K^+ATPase, cuja subunidade α apresenta um sítio de ligação para glicosídeos cardíacos.

1.4. OUABAÍNA

A ouabaína, um glicosídeo cardiotônico, foi descoberta por um antropologista francês, que a reconheceu a partir do composto ativo primário do veneno usado em flexas pela tribo Maasai, na África. A ouabaína é originária da semente de plantas africanas como a *Strophantus gratus* (ou Ouabaio) e a *Acokanthera schimpert*. Existem trabalhos demonstrando seu uso desde 1250 para tratamentos de dores de cabeça e espasmo. No entanto, apenas em 1785 que Willian Withering introduziu os glicosídeos cardiotônicos – ou digitálicos – como drogas para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Os digitálicos são utilizados, principalmente, para o tratamento da insuficiência cardíaca, certas arritmias, bem como para estudos experimentais (Wray *et al.,* 1985).

Assim como a *Digitalis purpurea*, a ação da ouabaína ocorre através de sua capacidade de inibir a bomba de sódio. Nos seres humanos, a Na^+K^+ATPase apresenta, em sua subunidade α, um sítio de ligação para digitálicos, o qual ainda não possui função totalmente esclarecida, sendo alvo de diversas pesquisas desde a década de 60.

O início da investigação de uma substância endógena inibidora da Na^+K^+ATPase se deu em 1961, por de Wardener *et al.,* os quais realizaram experimentos em que se perfundia sangue de um cão, que recebia expansão de volume extracelular com salina, em outro cão controle, nos quais foi observado aumento da natriurese. Este fato sugeriu que naqueles animais com sobrecarga aguda de volume, havia a liberação de um hormônio natriurético circulante, que participaria da regulação da excreção de sódio pelos rins. Estudos posteriores sugeriram que este fator seria um inibidor da Na^+K^+ ATPase (Kramer *et al*., 1969; Buckalew *et al*., 1970). A partir de 1976, Haddy e Overbeck começaram a demonstrar que este hormônio natriurético, inibidor da Na^+K^+ ATPase, participava na gênese dos modelos de hipertensão dependentes de volume.

Corroborando estes dados, Pamnani *et al.* (1980) e Songu-Mize *et al.* (1987) sugeriram que leitos vasculares de animais normotensos apresentavam uma redução na atividade da Na^+K^+ ATPase quando incubados com plasma de animais submetidos a hipertensão volume dependente. Como a ação desta substância

presente no plasma dos animais hipertensos, sobre os leitos vasculares, foi similar à ação da ouabaína, o termo *ouabain-like* começou a aparecer na literatura (Haddy *et al.,* 1978). Gruber *et al.* (1980) demonstraram que o inibidor da Na^+K^+ ATPase, presente no plasma de animais submetidos à expansão aguda de volume, fazia reação cruzada com anticorpos anti-digoxina, passando a usar o termo *digitalis-like*. Em 1981, Poston *et al.* e em 1982, Hamlyn *et al.* demonstraram a existência deste fator (endógeno *digitalis-like*) no plasma de pacientes com hipertensão essencial. Começava, assim, a ser demonstrada uma correlação entre os níveis plasmáticos deste inibidor, com a ingestão de sódio e os níveis pressóricos destes pacientes (Hamlyn *et al*., 1982; Hasegawa *et al.,* 1987). Em 1991, Mathews *et al.* e Bova *et al.,* demonstraram que a ouabaína e o fator *digitalis-like,* purificado do plasma de humanos, possuíam características bioquímicas, físico-químicas, imunológicas e fisiológicas semelhantes.

Estudos prévios descrevem a ouabaína como uma substância produzida de forma endógena, presente em concentrações nanomolares no plasma de vários mamíferos como, por exemplo, rato (Ludens *et al*., 1992), boi (Laredo *et al*., 1994), cães (Boulanger *et al*., 1993) e humanos (Hamlyn *et al.,* 1991). As principais fontes de ouabaína endógena relatadas até o momento são a produção periférica pelo córtex adrenal (zona glomerulosa) e, centralmente, as regiões hipotalâmica (Hawpert e Sancho, 1979; de Wardener e Clarson, 1985; Morgan *et al.,* 1985) e anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) (Pamnani *et al.,* 1981; Songu-Mize *et al.,* 1982; Bealer *et al.,* 1983). Acredita-se também que a produção endógena de ouabaína ocorra em cardiomiócitos ventriculares (D'Urso et al., 2004).

Os principais estímulos para secreção deste digitálico são o aumento na concentração plasmática de sódio e a expansão de volume extracelular (de Wardener *et al.,* 1961; Blaustein, 1993; Hamlyn *et al*., 1996; Yamada *et al.,* 1997). Porém, outros mecanismos parecem estar envolvidos na liberação deste glicosídeo, podendo ocorrer diante de resposta à estimulação β-adrenérgica, bem como pelo hormônio adrenocoticotrópico (ACTH) e angiotensina II, via receptores AT2 (Laredo *et al*., 1994; 1995; 1997; Bauer *et al*., 2005). Goto *et al*. (1995), por sua vez, demonstraram que há um aumento dos níveis plasmáticos e adrenais de ouabaína paralelos aos aumentos de corticosterona em ratos submetidos a situações de

estresse, passando a considerar a ouabaína como um hormônio com relevância fisiológica, nos quadros de estresse. A hipóxia também é outro estímulo capaz de aumentar a liberação de ouabaína, tanto no sistema nervoso central quanto nas glandulas supra-renais (De Angelis e Haupert, 1998).

Em humanos, algumas patologias estão associadas ao aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína como a hipertensão essencial (Hamlyn *et al*., 1982), a insuficiência cardíaca congestiva (Gottlieb *et al*., 1992), a insuficiência renal crônica (Hamlyn *et al*., 1996), o hiperaldosteronismo primário (Rossi, *et al.,* 1995), o diabetes mellitus (Martinka *et al.,* 1997), a síndrome de Cushing (Naruse *et al.,* 1994), o infarto agudo do miocárdio (Bagrov *et al*., 1994), entre outras. Os níveis endógenos de ouabaína, nos quadros de hipertensão, são dados muito dispersos devido a diferentes técnicas para a quantificação desta. Rossi *et al.* (1995) demonstraram, em pacientes normotensos, que a concentração plasmática de ouabaína variava entre 0,07 a 0,77 nmol/l e em pacientes hipertensos estes níveis estavam entre 0,08 a 25 nmol/l. Por outro lado, Buckalew (1998) relata uma concentração plasmática, também em humanos, entre 0,5 a 10 nmol/l.

Existem trabalhos demonstrando que a ouabaína pode aumentar o tônus simpático e/ou agir diretamente, aumentando a resistência vascular ou sensibilizando o leito vascular aumentando, assim, sua responsividade a substâncias vasopressoras (noradrenalina, angiotensina II e fenilefrina) e, com isso, pode estar associada à patogênese da HA (Guthrie Jr, 1984; Marín *et al.,* 1988; Yuan *et al*., 1993; Manunta *et al.,* 1994; Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997).

Classicamente, os efeitos da ouabaína são explicados pela sua capacidade de se ligar à subunidade α da Na^+K^+ ATPase e, assim, inibir a atividade da bomba de sódio (Skou e Esmann, 1992 e Lingrel, 1992). Esta inibição, por sua vez, resulta no aumento do sódio intracelular (Blaustein, 1988; Goto *et al*., 1992). Com isto, a membrana é despolarizada e a atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} é reduzida, aumentando a concentração de cálcio intracelular. Ocorre uma modulação dos estoques de cálcio no retículo sarcoplasmático, ou seja, o retículo sarcoplasmático passa a estocar uma maior quantidade de cálcio (Fleming, 1980; Mulvany, 1992; Blaustein, 1993; Weiss *et al*., 1994; Borin *et al*., 1994). Isso resultaria em aumento da concentração de cálcio intracelular, amplificação das respostas contráteis a

agentes vasoativos pela ouabaína, levando ao aumento do tônus vascular. Além disso, a inibição da bomba de sódio nas terminações perivasculares simpáticas poderia promover a liberação de noradrenalina e redução da recaptação da mesma, induzindo, assim, contração do MLV (Vanhoutte e Lorenz, 1984; Marín *et al*., 1988). A convergência desses mecanismos produz efeito inotrópico positivo e, consequentemente, elevação da PA.

Essas ações da ouabaína foram baseadas em pesquisas experimentais com concentrações terapêuticas dessa substância, portanto, existem poucas evidências sobre os efeitos da ouabaína em concentrações fisiopatológicas (nanomolares). Neste sentido, um grupo de pesquisadores descreveu um microdomínio celular denominado de *plasmerosome,* onde a ouabaína endógena parece atuar em concentrações nanomolares, permitindo explicar os possíveis mecanismos pelos quais essas concentrações de ouabaína seriam capazes de participar na fisiopatogenia da hipertensão (Juhaszova *et al.,* 1996; Golovina e Blaustein, 1997; Blaustein *et al.,* 1998). Esta região, próxima ao retículo sarcoplasmático, na qual podem ser encontradas as subunidades α_2 e α_3, e o trocador Na^+/Ca^{++}, pode estar relacionada à modulação do tônus vascular, já que as subunidades de maior afinidade a este digitálico estão situadas próximo ao retículo e poderiam influenciar, mesmo em pequenas concentrações, o mecanismo de amplificação da concentração de cálcio intracelular (Arnon *et al*., 2000).

Sabendo-se que as isoformas α da Na^+K^+ ATPase, de maior afinidade à ouabaína, estão localizadas em regiões específicas da membrana celular, próximo ao trocador Na^+/Ca^{2+} e ao retículo sarcoplasmático, e que as isoformas α, por sua vez, encontram-se modificadas, dependendo de vários fatores como o estado hipertensivo, alterações iônicas, hormonais e/ou substâncias vasoativas, é possível especular que efeitos diferenciais da ouabaína poderão ocorrer dependendo da concentração de digitálicos circulantes e, também, da quantidade de cada isoforma presente no MLV.

Pesquisadores verificaram que concentrações nanomolares de ouabaína, agudamente, promovem aumento da PA de ratos hipertensos e amplifica as respostas vasoconstritoras a agonistas α-adrenérgicos (Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997; Rossoni *et al*., 2001; Padilha *et al*., 2004). Além de aumentar a

reatividade vascular, estudos relatam que 10 nM de ouabaína em ratos normotensos estimulam a liberação de um fator endotelial, que gera abertura dos canais para potássio, modulando negativamente o endotélio (Rossoni *et al*., 1999). Já em animais hipertensos, pesquisadores atribuem o aumento da reatividade vascular à estimulação da ECA e liberação de angiotensina II local (Padilha *et al*., 2004). Estes relatos sugerem que baixas concentrações de ouabaína levam a diferentes efeitos em modelos de hipertensão, podendo colaborar para a gênese e/ou manutenção do processo hipertensivo.

Além das ações periféricas da ouabaína, ações centrais também já foram descritas, sendo observado um aumento da atividade simpatoexcitatória e redução da simpatoinibitória (Leenen *et al*., 1994; Huang e Leenen, 1994). Esses efeitos centrais da ouabaína parecem envolver a ativação do sistema renina-angiotensina, já que suas ações pressoras são inibidas por losartan, um bloqueador de receptores AT_1 para angiotensina II (Huang e Leenen, 1996; Huang *et al.,* 1998).

Sendo assim, os efeitos periféricos da ouabaína sobre a contração do MLV, modificando a RVP, associados aos seus efeitos simpatoexcitatórios centrais, podem contribuir para gênese e/ ou manutenção da HA.

1.4.1. Ouabaína na fisiopatologia da hipertensão arterial

Diversos estudos reforçam a participação da ouabaína na gênese e/ou manutenção da HA, demonstrando elevação da RVP por diferentes mecanismos, sendo eles: ativação do tônus simpático, atuação direta no MLV ou ainda através da liberação de fatores derivados do endotélio, que modulariam seus efeitos (Marín *et al*., 1988; Songu-Mize *et al*., 1995; Huang e Leenen*,* 1996; 1999; Vassallo *et al*., 1997).

O envolvimento da ouabaína, ou de compostos *ouabain-like,* na fisiopatogenia da HA vêm sendo sugerido desde 1976, por Haddy e Overbeck. Aumentos dos níveis plasmáticos ou hipotalâmicos de ouabaína endógena foram descritos em alguns modelos experimentais de hipertensão tais como Ligadura em 8, Dahl-sal sensível, Doca-Sal, SHR, um rim-um clip (1R1C), sobrecarga salina, diabéticos com redução de massa renal, entre outros (Haddy e Overbeck, 1976; Kojima, 1984; de Wardener *et al.*, 1987; Pamnani *et al.,* 1987; Chen *et al.,* 1993; Doris, 1994; Yamada *et al.,* 1997). Outra forma de especular a participação deste glicosídeo endógeno na fisiopatogenia da HA é através da utilização de anti-corpos anti-ouabaína ou bloqueadores, como a canrenona (Semplicini *et al*., 1993; Hamlyn *et al*., 1996; Vassallo *et al*., 1998).

Os mecanismos pelos quais a ouabaína está envolvida nos processos hipertensivos esta relacionado com a Na^+K^+ ATPase, que é um sítio de ligação para este digitálico. Quando a ouabaína se fixa na subunidade α, ocorre inibição do transporte de íons – efluxo de três íons sódio e influxo de dois íons potássio – e, consequentemente, há acúmulo de sódio intracelular, que por sua vez, reduz ou inibe a atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} aumentando as concentrações de cálcio intracelular (Blaustein, 1988; Marín *et al*., 1988). Diante disso, a membrana é despolarizada, aumentando a probabilidade de abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem, com posterior influxo de cálcio para dentro da célula (Vassalle, 1987; Marín *et al*., 1988). Sendo assim, através de uma amplificação nas concentrações intracelulares de cálcio, a ouabaína, em concentrações micromolares, pode gerar contração do MLV. Além disso, com o aumento das concentrações

intracelulares de cálcio, há maior recaptação de cálcio para o reticulo sarcoplasmático, aumentando os estoques intracelulares desse íon (Fleming, 1980; Mulvany, 1992; Blaustein, 1993), e assim, respostas contráteis a agentes vasoativos podem ser amplificadas pela ouabaína. Em concentrações micromolares, a ouabaína, ainda, pode inibir a bomba de sódio nas terminações perivasculares simpáticas, aumentando a liberação de noradrenalina e reduzindo a recaptação da mesma, induzindo, assim, contração do MLV (Vanhoutte e Lorenz, 1984; Marín *et al*., 1988).

O efeito hipertensor da ouabaína em alguns modelos de hipertensão pode ocorrer através de uma ação central deste digitálico. Alguns trabalhos corroboram esta idéia, demonstrando que a lesão da região AV3V, em ratos Doca-sal, ocasiona uma redução do quadro hipertensivo, associada com uma melhora da atividade da bomba de sódio (Songu-Mize *et al*., 1982). Sendo assim, estudos demonstraram que o aumento na concentração de Na^+, presente nos quadros hipertensivos, induz um aumento da liberação de ouabaína pelo sistema nervoso central. Esta, por sua vez, ativa o sistema renina-angiotensina cerebral, diminuindo o componente simpático inibitório e aumentando o simpático excitatório, levando a uma exacerbação da hipertensão em animais SHR e Dahl-Sal sensíveis, submetidos a uma alta ingestão de sódio (Huang *et al*., 1992; 1994; 1996).

Todavia, a HA induzida pela ouabaína promove alterações periféricas relevantes, também por inibirem a atividade da Na^+K^+ ATPase nas aferências barorreflexas, podem aumentar as descargas aferentes neurais e mediar respostas simpatoinibitórias, enquanto que centralmente medeiam mecanismos simpatoexcitatórios (Ferguson *et al.,* 1989; Leenen *et al.,* 1994; Abreu *et al.,* 1998).

Outra possível explicação para o aumento de pressão ocasionada pela presença da ouabaína no plasma de pacientes e animais hipertensos poderia ser sua ação vascular direta. Alguns trabalhos na literatura demonstram a utilização de doses terapêuticas de ouabaína, aumentam a resistência vascular e a PA por uma ação direta no MLV sem alteração da freqüência e do DC (Ross Jr *et al*., 1960; Manson e Braunwald, 1964).

O efeito vascular da ouabaína também depende do leito vascular estudado. Trabalhos demonstraram que a contração induzida pela ouabaína, em artérias cerebrais, deve-se a uma ação direta deste digitálico nas células do MLV deflagrando um componente miogênico, enquanto em artérias femorais, esta se deve à liberação de noradrenalina dos terminais adrenérgicos deflagrando o componente neurogênico (Marín *et al.*, 1988). Outros autores reforçaram a hipótese do componente neurogênico da ouabaína, demonstrando que este digitálico facilita a transmissão adrenérgica (Tsuda *et al.,* 1989).

Os efeitos contráteis da ouabaína e sua ação através dos componentes miogênico e neurogênico, assim como a capacidade do endotélio em modular estas respostas foram estudados extensivamente. Pesquisadores demonstraram que o endotélio modula o componente neurogênico da contração induzida pela ouabaína (Rodríguez-Mañas *et al.*, 1994). Outros trabalhos demonstram uma modulação do endotélio sobre o componente miogênico deste digitálico. Sánchez-Ferrer *et al.* (1992) e Rodríguez-Mañas *et al.* (1992) demonstraram que a ouabaína, de maneira concentração-dependente, induz contração em anéis de vasos placentários e artérias carótidas, de pacientes e animais normotensos, e a remoção do endotélio potencializava este efeito contrátil. Estudos que utilizaram anéis de aorta de animais normotensos e hipertensos (SHR) tratados com ouabaína (1 mM), também demonstraram que o endotélio do animal normotenso libera um fator, em resposta à ouabaína, que modula negativamente o efeito constritor deste glicosídeo (Ponte *et al.*, 1996 a; b). A partir de então muitos trabalhos foram realizados no intuito de descobrir que fator endotelial seria este. Woolfson & Poston (1991) demonstraram que a ouabaína, em concentrações nanomolares, foi capaz de inibir, de maneira dose-dependente, a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em preparações isoladas, enquanto a resposta ao nitroprussiato de sódio não foi alterada, sugerindo que a ouabaína pode afetar a síntese ou liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio. Outros autores também demonstraram a capacidade da ouabaína em liberar fatores endoteliais, porém em cultura de células endoteliais isoladas. Nakagawa *et al.* (1987) demonstraram a liberação de PGI_2, Yamada *et al.* (1990) demonstraram a liberação da endotelina e, por sua vez, Xie *et al.* (1993) demonstraram que as células endoteliais liberavam óxido nítrico quando estimuladas pela ouabaína.

Dados do nosso laboratório têm demonstrado que concentrações nanomolares de ouabaína são capazes de aumentar a PA de animais hipertensos anestesiados, assim como sensibilizam o leito arterial caudal destes animais à resposta pressora induzida pela fenilefrina (Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997; Rossoni *et al.,* 2001). Pesquisas demonstram quem 10 nM de ouabaína foi capaz de induzir liberação de um fator endotelial para abertura dos canais para K^+ em animais normotensos (Rossoni *et al*., 1999) e que concentrações ainda menores de ouabaína (1nM) promoveram liberação de angiotensina II de origem endotelial (Padilha *et al*., 2004). Outros resultados também demonstram que a ouabaína, diretamente, é capaz de induzir elevação da pressão arterial diastólica em animais normotensos, anestesiados, e submetidos ao bloqueio dos reflexos cardiovasculares (Barker *et al.,* 2001). Estes dados sugerem que a ouabaína, nestas concentrações, pode aumentar a resistência vascular por sensibilizar o MLV a agentes vasopressores contribuindo, assim, para o aumento e manutenção do tônus vascular na hipertensão. Porém, pouco se sabe sobre os possíveis mecanismos pelos quais a ouabaína pode levar ao aumento da RVP quando utilizada em concentrações nanomolares.

Há aproximadamente quinze anos, especulava-se sobre a participação da ouabaína na gênese e/ ou manutenção da HA. Entretanto, nenhum trabalho demonstrava a capacidade deste digitálico em desenvolver o processo hipertensivo. Em 1993, Yuan *et al.* foram os primeiros a demonstrar que a administração crônica de ouabaína (17 µg/Kg/dia, *ip*), durante 3 a 4 semanas, em animais com redução da massa renal e em animais controles, estava associada com o desenvolvimento de hipertensão. Pamnani *et al.* (1994), utilizando o tratamento crônico, por seis semanas com ouabaína, obtiveram elevação da pressão arterial sistólica em ratos. Manunta *et al.* (1994) começaram a caracterizar este novo modelo de hipertensão e demonstraram que a ouabaína, de maneira dose-dependente (3-30 µg/Kg/dia, *s.c.*), era responsável pela elevação da PA em ratos. Esta hipertensão cursava com aumentos dos níveis de ouabaína no plasma (10^{-9} a 10^{-8} M), rins, hipotálamo e na pituitária anterior. Entretanto, estava associada com níveis normais de renina plasmática e níveis aumentados de aldosterona. A retirada das glândulas suprarrenais ou o aumento da ingestão de sódio não alterava os níveis pressóricos, mas a interrupção da infusão deste digitálico levava ao retorno da pressão a níveis

normais dentro de uma semana, o que veio demonstrar a reversibilidade desta hipertensão. Ferrari *et al.,* 1998 também conseguiram desenvolver hipertensão em ratos através do tratamento com ouabaína (50 µg/Kg, *s.c.*) e, associado a esta elevação da PA, encontraram um aumento da atividade da bomba de sódio renal. Em 1994, Huang *et al.* demonstraram que a administração de ouabaína, durante 10 a 14 dias, tanto via intravenosa e intracerebroventricular (10 µg/ Kg/ dia) como subcutânea (25 µg/ *pellet/* dia), era capaz de elevar a PA média em ratos.

Estudos demonstraram que o tratamento com ouabaína por 5 semanas foi capaz de promover liberação de NO, derivada da nNOS e eNOS, e também induziu aumento de EDHF, os quais possivelmente abrem canais para K^+, contribuindo para aumento da modulação negativa da retividade à FE em ratos tratados (Rossoni *et al*., 2002b). Pesquisas do mesmo grupo demonstraram que a expressão proteica das isoformas α1 e α2 da bomba de sódio estava aumentada em aorta, diminuída na artéria caudal e não modificada na artéria mesentérica superior. Neste referido estudo também foi observada diminuição da resposta pressora à FE em aorta e mesentérica superior (Rossoni *et al*., 2002a).

Muito embora estes trabalhos demonstrem o desenvolvimento de alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na elevação da PA, alguns autores relatam o não desenvolvimento de hipertensão com o tratamento crônico de ouabaína. Estes estudos foram realizados em carneiros e ratos, sendo importante relatar que estes trabalhos utilizaram altas concentrações deste digitálico, passíveis de levar a quadros de intoxicação digitálica (Yasujima *et al.,* 1986; Li *et al.,* 1995; Pidgeon *et al*., 1996).

Apesar de diversas pesquisas demonstrarem o envolvimento do endotélio nas respostas à ouabaína na HA, ainda são poucos os estudos crônicos utilizando concentrações nanomolares de ouabaína que poderiam alterar a reatividade vascular, estando, assim, associada à gênese e/ou manutenção da HA, visto que os estudos mencionados foram realizados agudamente.

Considerando que alterações de resistência vascular alteram a PA, investigamos no vigente estudo, possíveis alterações ocorridas no início do estabelecimento da HA, induzida por doses nanomolares de ouabaína. Dados de

pesquisas anteriores (Padilha *et al.*, 2008) demonstraram que em artérias de resistência a reatividade vascular não está alterada diante do tratamento com baixas concentrações de ouabaína por 15 dias, embora haja alteração da participação dos fatores endoteliais. Sabe-se também que o tratamento com ouabaína por 30 dias interfere na participação de fatores endoteliais de vasos de condutância (Rossoni *et al*., 2002a; b; Xavier, *et al*., 2004). No entanto, investigações na função vascular ainda não haviam sido feitas em vasos de condutância com 15 dias de tratamento com ouabaína, sendo esta a finalidade do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Estudar o efeito do tratamento por 15 dias com ouabaína (25µg/kg/dia, *i.m.*) na reatividade vascular do segmento proximal da artéria caudal de ratos Wistar.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se o tratamento com ouabaína por 15 dias modifica a pressão arterial de ratos Wistar;
- Avaliar os resultados do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina no terço proximal da artéria caudal de ratos;
- Verificar uma possível modulação endotelial sobre os efeitos do tratamento com ouabaína na artéria de condutância estudada através do terço proximal arterial caudal;
- Investigar a participação de fatores endoteliais envolvidos nos efeitos do tratamento com ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina no terço proximal da artéria caudal de ratos;
- Estudar a influência de concentrações nanomolares de ouabaína administrada cronicamente na atividade funcional da Na^+K^+ATPase na artéria de condutância referida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus novergicus albinus*), com idades aproximadas de três meses, pesando entre 220 – 260g. Esses animais foram cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas, com controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso a água e alimentação. O uso e cuidado destes animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo tratado com ouabaína (25µg/kg/dia, *i.m.*) durante 15 dias e o outro grupo controle, cujo tratamento, pelo mesmo período, foi realizado com a substância utilizada para diluição da ouabaína, o óleo de soja (100µl/dia, *i.m.*). Esta concentração de ouabaína utilizada em nosso estudo deve fornecer aproximadamente uma concentração de ouabaína em níveis nanomolares, similar àquela encontrada no plasma de pacientes hipertensos (Rossi *et al*., 1995; Buckalew, 1998).

Os experimentos foram realizados conforme os as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivissecção de animais de acordo com a Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979. Os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA/EMESCAM).

3.2 METODOLOGIA APLICADA PARA AVALIAÇÃO DOS VALORES PRESSÓRICOS

Inicialmente os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg, *i.p.*) e heparinizados (500 UI, *i.p.*). Após um período aproximado de 10 minutos, os animais foram submetidos à cateterização da artéria carótida para medidas de parâmetros cardiovasculares. O plano anestésico foi acompanhado com testes como pinçar a cauda do animal, e o anestésico foi suplementado quando necessário. As canulações foram realizadas com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (100 UI/ml). Após a cateterização, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Stathan P23 AA) acoplado a um pré-amplificador (MP-100) que, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados o qual utilizava uma frequência de amostragem de 500 hertz (MP100 Biopac Systems, Inc; CA). Foram feitos registros contínuos da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e freqüência cardíaca (FC), durante 30 minutos.

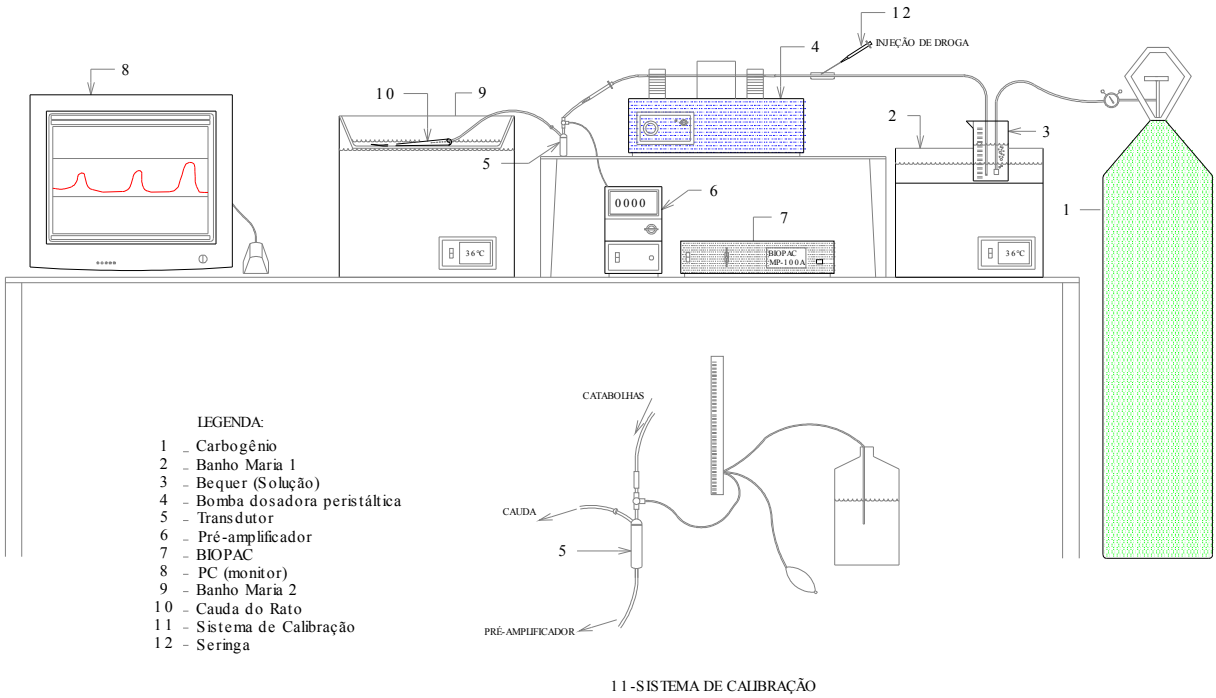
3.3 METODOLOGIA APLICADA PARA ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR NO LEITO ARTERIAL CAUDAL DE RATOS

3.3.1 Obtenção do segmento proximal da artéria caudal

Os estudos de reatividade vascular foram realizados *in vitro*, através da técnica de perfusão do leito arterial caudal, descrita por França *et al.* (1997). Após mensuração de parâmetros hemodinâmicos, o animal foi colocado em posição dorsal sobre a mesa cirúrgica e submetido à dissecação do segmento proximal da arterial caudal, a partir de uma incisão longitudinal, na linha mediana, no sentido crânio-caudal, de aproximadamente 2 cm. Após divulsionar a fáscia lateralmente e isolar o terço proximal da artéria caudal dos tecidos conectivos, a artéria foi canulada próximo a sua base com um cateter de acesso periférico (Safelet intracate 24G X ¾, NIPRO) previamente preenchido com solução nutridora.

Segundo Souza *et al*. (2008), o segmento proximal da artéria caudal possui características compatíveis com um vaso de condutância, o qual objetivamos estudar no presente estudo.

Sendo assim, a cauda foi seccionada no terço proximal, colocada em uma cuba de vidro sobre um banho-maria previamente aquecido e conectada a um sistema de perfusão contínua. As artérias caudais foram perfundidas com solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): $NaHCO_3$ 27,2; NaCl 119; NaH_2PO_4 1; $MgSO_4$ 1,2; KCl 5; $CaCl_2$ 1,25; glicose 11; EDTA 0,03. Esta solução foi mantida à temperatura de 36 °C ± 0,5, aerada pelo borbulhamento de mistura carbogênica contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2, mantendo o pH estável em 7,4. O fluxo foi mantido constante em 2,5 ml/min por meio de uma bomba peristáltica (Milan, Colombo, Paraná, Brasil). A pressão de perfusão média no segmento arterial caudal estudado foi medida através de um transdutor de pressão (TSD104A), que por sua vez foi conectado a um pré-amplificador (DA 100C), situado entre a bomba peristáltica e a cânula arterial. Este pré-amplificador foi interligado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA), o qual estava conectado a um computador, para registros contínuos de pressão de perfusão média (PPM) no leito vascular caudal (figura 1).



Esquema 1: Desenho esquemático da preparação do leito arterial caudal.

As preparações foram submetidas, então, a um período de estabilização de 45 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais. Considerando que *Pressão = Fluxo x Resistência*, e sendo o fluxo constante, as variações de pressão registradas indicaram variações da resistência vascular.

3.3.2 Protocolos experimentais

Para observar a possibilidade de lesão endotelial e do músculo liso vascular durante a canulação da artéria caudal, bem como verificar se essas estruturas permaneciam íntegras após o protocolo experimental, foi avaliada, no final de cada protocolo, a integridade funcional do endotélio e do músculo liso nos grupos estudados. Para isso, o leito vascular caudal foi submetido a uma pré-contração através da infusão contínua de fenilefrina (FE, 10^{-7} M) e depois de estabelecido um platô, foi administrada acetilcolina (ACh, 5µg/100µl, *in bolus*). Em seguida foi avaliada a integridade do músculo liso vascular através da administração de nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1µg/100µl, *in bolus*).

O relaxamento produzido pela ACH traduz a viabilidade do endotélio, enquanto que o relaxamento produzido pelo NPS reflete a integridade do músculo liso. O endotélio vascular foi considerado íntegro quando o relaxamento produzido pela Ach era superior a 40%, enquanto que a integridade do músculo liso foi considerada diante do relaxamento ao NPS acima de 50%.

3.3.2.1 Efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina

Após o período de estabilização, foi realizada administração de FE, agonista α_1–adrenérgico (1µg, *in bolus*, em um volume de 100µl), a fim de verificar a responsividade vascular. Em seguida, doses crescentes de FE foram administradas (0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10; 30; 100; 300µg, *in bolus*, em um volume de 100µl cada dose), no terço proximal da arterial caudal de ratos do grupo ouabaína (n=10) e do grupo controle (n=10), na presença do endotélio funcional.

3.3.2.2 Modulação do endotélio no efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina

Para realização deste protocolo experimental, o endotélio foi lesado através da administração de CHAPS {3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamônio]-I-propanosulfonato}, 8mg, *in bolus*, em volume de 80 µl. Após 40 minutos da administração de CHAPS, foi feita a verificação da integridade do endotélio, visto que o objetivo deste protocolo foi analisar a reatividade vascular sem o endotélio íntegro. A lesão endotelial foi confirmada pela ausência de relaxamento à Ach ou ainda pela presença de relaxamento ≤ 10%, nas preparações pré-contraídas com FE (10^{-7} M). Para descartar uma possível lesão do músculo liso pelo CHAPS, foi realizada a administração de uma dose de NPS (0,1µg/100µl, *in bolus*), um potente vasodilatador independente do endotélio, para avaliar a integridade do relaxamento do músculo liso vascular induzido pelo óxido nítrico.

Após o restabelecimento da situação basal, as preparações foram submetidas a doses crescentes de FE (0,001 – 300µg, *in bolus*, em um volume de 100µl), tanto no grupo controle (n=10) quanto no grupo tratado com ouabaína (n=10). Este protocolo teve como finalidade avaliar uma possível modulação endotelial sobre a resposta pressora à FE, na ausência do endotélio, quando comparado com o endotélio íntegro, diante do tratamento com ouabaína.

3.3.2.3 Influência do tratamento crônico com ouabaína na via do óxido nítrico (NO) sobre a resposta pressora à fenilefrina

Com o objetivo de avaliar uma possível participação do NO na modulação dos efeitos do tratamento crônico com ouabaína, foram feitas curvas dose-resposta à FE (0,001 – 300µg, *in bolus*, em um volume de 100µl) antes e após a perfusão por uma hora com L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil ester), 100µM, um inibidor não–seletivo da óxido-nítrico sintase.

Foram submetidos a este protocolo tanto os animais do grupo controle (n=11) quanto os do grupo ouabaína (n=12).

3.3.2.4 Estudo do bloqueio com tetraetilamônio (TEA) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em ratos tratados com ouabaína

Este protocolo visou estudar a participação do mecanismo de hiperpolarização, via canais de potássio ativados por cálcio, com a utilização de TEA, um inibidor não–seletivo destes canais.

A preparação do leito arterial caudal foi submetida à realização de curvas dose-resposta à FE (0,001 – 300µg, *in bolus*, em um volume de 100µl) antes e após a perfusão por uma hora com TEA (5mM), no grupo controle (n=10) e no grupo ouabaína (n=11), sempre na presença do endotélio vascular.

3.3.2.5 Envolvimento dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre o efeito do tratamento crônico com ouabaína na resposta pressora à fenilefrina

Para averiguar uma possível participação dos produtos derivados da via do ácido araquidônico, sobre os efeitos do tratamento crônico com ouabaína sobre a reatividade vascular à FE, curvas dose-resposta à FE (0,001 – 300µg, *in bolus*, em um volume de 100µl) foram realizadas antes e após a perfusão por uma hora com Indometacina (10µM), um inibidor da enzima ciclooxigenase, no grupo controle (n=10) e no grupo ouabaína (n=12), na presença do endotélio íntegro.

3.3.2.6 Efeito do duplo bloqueio – via do ácido araquidônico-ciclooxigenase e síntese de NO – na reatividade vascular à fenilefrina em ratos tratados com ouabaína

Foram realizadas curvas dose-resposta à FE (0,001 – 300µg, *in bolus*, em um volume de 100µl) antes e após a co-perfusão com Indometacina (10µM) e L-NAME (100µM) por uma hora, no sentido de avaliar o bloqueio simultâneo de ambas as vias, a da ciclooxigenase e a da síntese do NO, respectivamente. Tanto os animais do grupo controle (n=11) quanto os animais tratados com ouabaína (n=10) por 15 dias foram submetidos a este protocolo experimental.

3.3.2.7 Estudo da atividade funcional da Na^+K^+ATPase diante do tratamento crônico com ouabaína

Para a efetivação deste protocolo experimental, foi utilizada a técnica de relaxamento ao potássio, descrita previamente por Webb & Bohr (1979) e modificada por Rossoni *et al.* (1999). Após 45 minutos de estabilização em solução normal de Krebs-Henseleit, as preparações foram perfundidas por mais 30 minutos com solução de Krebs sem potássio. Para obtenção dessa solução livre de potássio, o KCl foi retirado no momento da preparação da solução. Em seguida, foi realizada uma pré-contração com FE (10^{-7}M) em solução livre de potássio, até o estabelecimento de um platô. Então o KCl foi adicionado ao meio de perfusão, em concentrações crescentes de 1, 2, 4 e 6 mM. A preparação era perfundida com a solução contendo KCl, em intervalos de cinco minutos para cada concentração, no sentido de obter uma curva de relaxamento ao KCl (figura 2). Estas curvas foram realizadas no grupo controle (n=12) e no grupo ouabaína (n=12).

A partir desse protocolo, foi possível analisar se os efeitos produzidos pelo tratamento crônico com ouabaína poderiam ser atribuídos, em parte, à atividade da Na^+K^+ATPase.

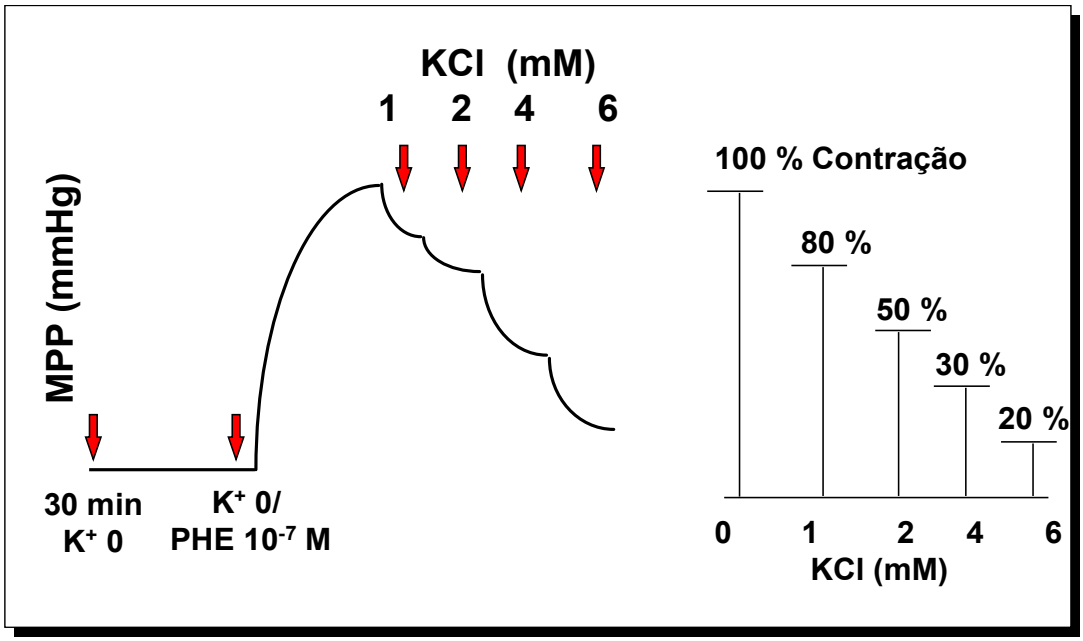


Figura 2: Desenho esquemático do protocolo da curva de relaxamento ao KCl (modificado de Luciana Rossoni).

3.4. EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados durante esta pesquisa estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As respostas vasopressoras induzidas pela FE, sobre o segmento proximal da artéria caudal, estão expressas como variações na pressão de perfusão, obtidas através da subtração do pico de resposta pressora à FE pela pressão de perfusão basal (ΔPPM).

Os resultados das respostas de relaxamento induzidas pela Ach e NPS, no leito vascular caudal, estão expressos como porcentagem de relaxamento da máxima pré-contração induzida pela infusão contínua de FE (10^{-7}M). A resposta de relaxamento ao potássio foi expressa como a porcentagem de contração residual à FE.

Para cada curva concentração-resposta FE foram calculados os valores da resposta máxima (Rmáx) e pD_2 (-log EC_{50}), este representando a sensibilidade. Para isso foi realizada análise de regressão não-linear, obtida através das curvas dose-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, EUA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à FE em artérias caudais dos diferentes grupos estudados, alguns resultados estão expressos como diferença da área abaixo da curva (AUC) das curvas dose-reposta à FE nas situações controle e tratamento com ouabaína. A AUC foi calculada para cada curva dose-resposta e a diferença está expressada como porcentagem da diferença da AUC (%dAUC) da curva controle correspondente, sendo utilizado também o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, EUA).

A análise estatística dos dados foi realizada por teste t de Student, pareado e/ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), uma e/ou duas vias, medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.5. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Bicarbonato de Sódio (Merck)
- CHAPS: 3 - [(3-cloroamidopropil) dimetilamônio]-I-propanosulfonato (Sigma)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de Potássio (Merck)
- Cloreto de Sódio (Merck)
- EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraacético (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Fosfato de Sódio Monobásico (Merck)
- Glicose (Merck)
- Heparina Sódica (Roche)
- Indometacina (Sigma)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- L-NAME: $N^{(W)}$-nitro-L-arginina metil éster, Dicloridrato (Sigma)
- Nitroprussiato de Sódio Dihidratado (Sigma)
- Ouabaína, Octahidrato (Sigma)
- Óleo de soja refinado (Cargill)
- Sulfato de Magnésio (Sigma)
- TEA: Tetraetilamônio, Cloridrato (Sigma)
- Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano (BioRad)
- Uretana (Sigma)

Todos os fármacos, com exceção da indometacina, foram dissolvidos em água destilada e mantidos no congelador a -20ºC. A indometacina foi diluída em tampão Tris 0,1M.

4. RESULTADOS

4.1. DADOS PONDERAIS

Os animais do grupo ouabaína (OUA) e do grupo controle (CT) não apresentaram diferenças entre si nos valores de massa corporal ao final do tratamento por 15 dias (OUA: 306,4 ± 29,7 *vs.* CT: 294,9 ± 30,7 g; teste *t*, p>0,05).

4.2. VALORES PRESSÓRICOS E DE FREQÜÊNCIA CARDÍACA

O tratamento por 15 dias com ouabaína foi capaz de promover aumento da pressão arterial sistólica (PAS), da pressão arterial diastólica (PAD) e da pressão arterial média (PAM) – tabela 1 – quando comparados com os animais controle. A freqüência cardíaca (FC) também se apresentou elevada nos animais tratados cronicamente com ouabaína (tabela 1), no entanto, este aumento ocorreu dentro da faixa fisiológica.

Tabela 1: Valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de ratos tratados com ouabaína e de ratos controle, obtidos através de experimentos "*in vivo*".

PARÂMETROS	ANIMAIS CONTROLE	ANIMAIS OUABAÍNA
PAS (mmHg)	99,9 ± 3 (n=15)	116,4 ± 3* (n=16)
PAD (mmHg)	59,9 ± 4 (n=15)	71,2 ± 3* (n=16)
PAM (mmHg)	70,4 ± 5 (n=15)	89,3 ± 4* (n=16)
FC (bpm)	313 ± 15 (n=15)	352 ± 11* (n=16)

Valores expressos como média ± EPM. Teste *t*,* p< 0,05, ouabaína *vs.* controle.

4.3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE VASCULAR E RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

A integridade endotelial foi testada utilizando-se um vasodilatador dependente do endotélio, a acetilcolina (ACh, 5µg/100µl), que foi capaz de promover relaxamento superior a 50% (figura 1A) após a pré-contração com fenilefrina (FE 10^{-7} M) em ambos os grupos com endotélio preservado, não sendo identificada diferença entre os grupos (CT E^{+}: 66,8 ± 5 *vs*. OUA E^{+}: 68,4 ± 4 %, teste *t*, p>0,05). Nos grupos cujo endotélio foi lesado (E^{-}), através da administração de CHAPS, o relaxamento induzido por ACh, após a pré-contração com FE 10^{-7} M, foi significativamente reduzido no grupo controle e no grupo ouabaína, de modo semelhante, sendo inferior a 10% (CT E^{-}: 5,8 ± 3 *vs*. OUA E^{-}: 6,6 ± 3 %, teste *t*, p>0,05), quando então era comprovada a efetividade da lesão endotelial.

A viabilidade do músculo liso vascular também foi testada, através da administração de nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1µg/100µl), um doador direto de óxido nítrico (figura 1B). As artérias caudais com endotélio funcional apresentaram também integridade da musculatura vascular lisa, a qual foi determinada por relaxamento superior a 60% (CT E^{+}: 79,6 ± 5 *vs*. OUA E^{+}: 76,4 ± 4 %, teste *t*, p>0,05). Nos grupos controle e ouabaína que tiveram o endotélio removido, a resposta ao relaxamento ao NPS comportou-se de forma semelhante (CT E^{-}: 76,8 ± 6 *vs*. OUA E^{+}: 80,2 ± 7 %, teste *t*, p>0,05).

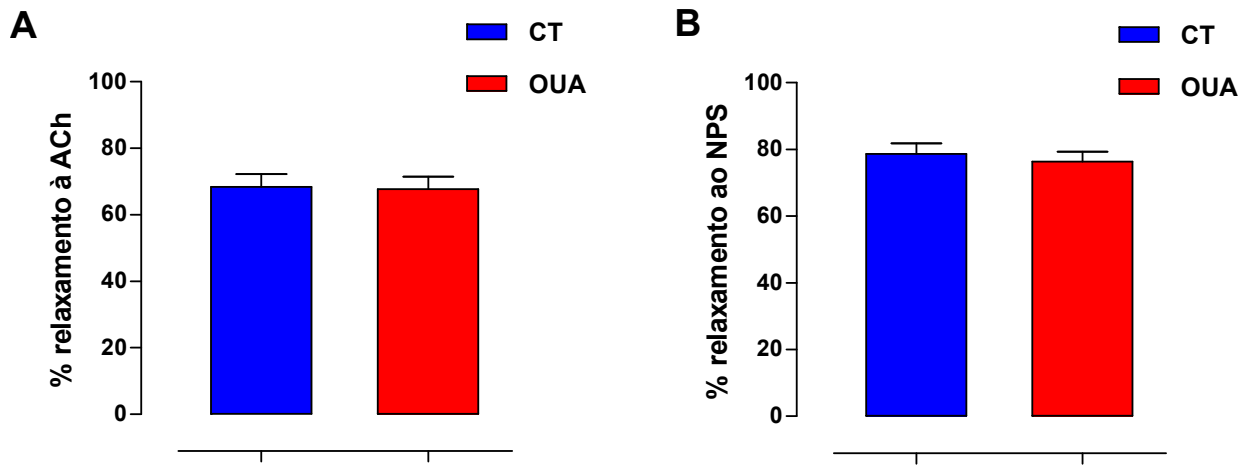


Figura 1: Porcentagem de relaxamento do segmento proximal da artéria caudal à acetilcolina (**A**) após pré-contração com FE (10^{-7} M) e ao nitroprussiato de sódio (**B**). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

A resposta vasoconstritora do segmento arterial caudal estudado foi avaliada utilizando-se um agonista α-adrenérgico, a fenilefrina (FE), que aumentou de maneira dose-dependente, a pressão de perfusão média do leito vascular caudal nos grupos estudados.

A pressão de perfusão média (PPM) basal no leito vascular estudado não sofreu alteração quando comparadas as PPM antes da primeira curva e antes da segunda curva nos grupos estudados (CT curva 1: 44,1 ± 12,3 *vs*. curva 2: 39,3 ± 15,9 mmHg, teste *t*, p>0,05; OUA curva 1: 41,8 ± 17,5 *vs*. curva 2: 40,3 ± 14,6 mmHg, teste *t*, p>0,05).

Com a finalidade de observar a interferência do tempo sobre a estabilidade das preparações, doses crescentes de FE antes e após a perfusão contínua por uma hora com solução de Krebs-Henseleit normal, foram administradas em ambos os grupos de animais. Esse protocolo demonstrou que o tempo não interferiu na resposta máxima – Rmáx – (CT curva 1: 245,8 ± 17,3 *vs*. curva 2: 237,4 ± 25,5 mmHg, teste *t*, p>0,05; OUA curva 1: 245,4 ± 19,7 *vs*. curva 2: 255,8 ± 15,7 mmHg, teste *t*, p>0,05) e nem na sensibilidade – pD2 – (CT curva 1: 1,85 ± 0,07 *vs*. curva 2:

2,23 ± 0,09 log mM, teste *t*, p>0,05; OUA curva 1: 1,79 ± 0,06 *vs*. curva 2: 1,87 ± 0,09 log mM, teste *t*, p>0,05) (figura 2, A e B).

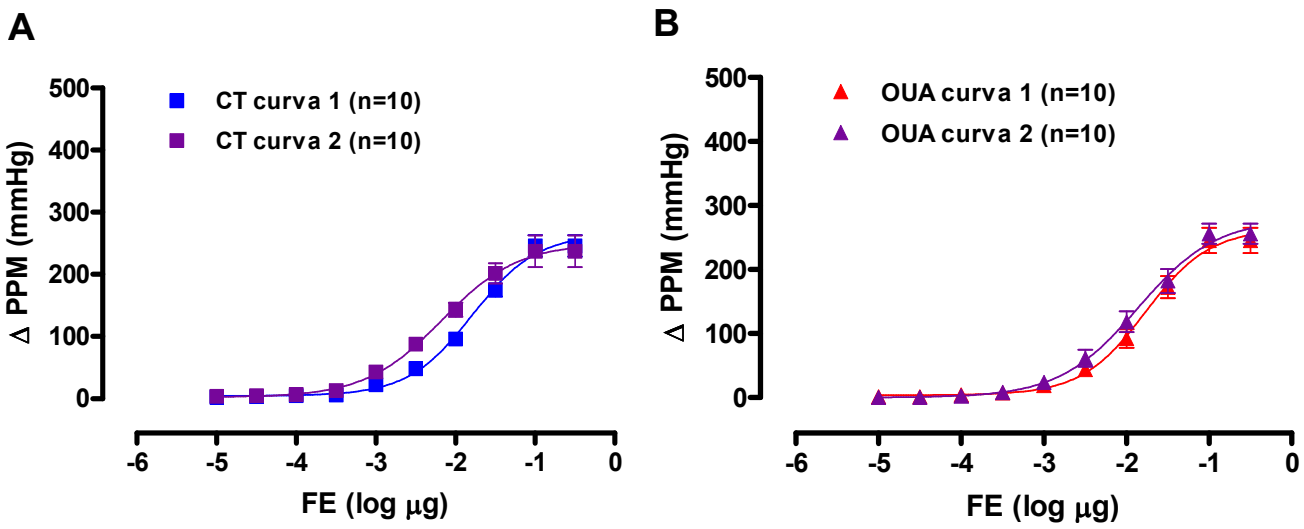


Figura 2: Reatividade vascular à fenilefrina (FE) representada por mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de FE no segmento proximal da artéria caudal de ratos Wistar do grupo CT (**A**), n=10, e do grupo OUA (**B**), n=10. As curvas 1 e 2 não apresentaram diferenças entre si, nem no grupo CT (**A**) nem no grupo OUA (**B**); teste *t*, p>0,05. Pontos representam a média ± EPM.

4.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM OUABAÍNA (25MG/KG/DIA, *i.m.*) DURANTE 15 DIAS SOBRE A RESPOSTA PRESSORA À FENILEFRINA

Ao avaliar a reatividade vascular à FE nos grupos CT e OUA, comparamos as primeiras curvas dose–resposta de FE realizadas em cada grupo (figura 3), não sendo, portanto, observadas diferenças na resposta máxima (Rmáx) – CT: 245,8 ± 17,3 *vs*. OUA: 245,4 ± 19,7mmHg, teste *t*, p>0,05, nem na sensibilidade (pD2) – CT: 1,85 ± 0,07 *vs*. OUA: 1,79 ± 0,06 log mM, teste *t*, p>0,05.

Quando comparadas as PPM antes da realização da primeira curva dose-resposta à FE, não foram encontradas diferenças entre o grupo CT e OUA (CT: 44,1 ± 12,3 *vs*. OUA: 41,8 ± 17,5 mmHg, teste *t*, p>0,05).

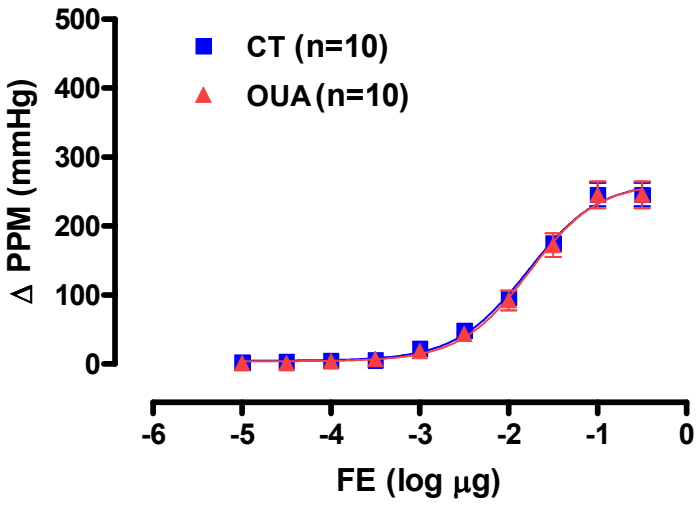


Figura 3: Reatividade vascular à fenilefrina (FE) representada por mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de FE no segmento proximal da artéria caudal de ratos Wistar do grupo CT, (n=10) e do grupo OUA (n=10), teste *t*, p>0,05. Pontos representam a média ± EPM.

4.5. MODULAÇÃO DO ENDOTÉLIO NO EFEITO DO TRATAMENTO POR 15 DIAS COM OUABAÍNA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA

Tanto nos animais CT quanto nos OUA, a lesão endotelial provocada por CHAPS não levou a modificações da pressão de perfusão média basal no segmento proximal da artéria caudal (CT E^+: 44,1 ± 12,3 *vs*. CT E^-: 39,6 ± 15,5 mmHg, teste *t*, p>0,05; OUA E^+: 41,8 ± 17,5 *vs*. OUA E^-: 42,9 ± 11,8 mmHg; teste *t*, p>0,05). Quando comparadas as PPM basais do grupo CT com o grupo OUA, após lesão endotelial provocada por CHAPS, também não foi encontrada diferença na PPM basal (CT E^-: 39,6 ± 15,5 *vs*. OUA E^-: 42,9 ± 11,8 mmHg; teste *t*, p>0,05).

Houve aumento significativo da resposta vasoconstritora à FE diante da lesão endotelial (E^-) em animais CT e também nos animais OUA, quando comparado aos animais com endotélio preservado (E^+) dos respectivos grupos (figura 4, A e B) – tanto na Rmáx (CT E^+: 245,8 ± 17,3 *vs*. CT E^-: 545,4 ± 61,1 mmHg, teste *t*, p<0,05; OUA E^+: 245,4 ± 19,7 *vs*. OUA E^-: 494,8 ± 44,1 mmHg; teste *t*, p<0,05) quanto na pD2 (CT E^+: 1,85 ± 0,07 *vs*. CT E^-: 2,3 ± 0,12 log mM, teste *t*, p<0,05; OUA E^+: 1,79 ± 0,1 *vs*. OUA E^-: 2,35 ± 0,1 log mM, teste *t*, p<0,05). Foi também observado, através da diferença das áreas abaixo da curva (dAUC), que o referido aumento foi semelhante nos grupos CT e OUA (figura 4) – CT: 225,5 ± 46,5 vs. OUA: 186,9 ± 27,6 %, teste *t*, p>0,05 – não havendo diferença significativa na modulação endotelial diante do tratamento crônico com ouabaína nos animais estudados.

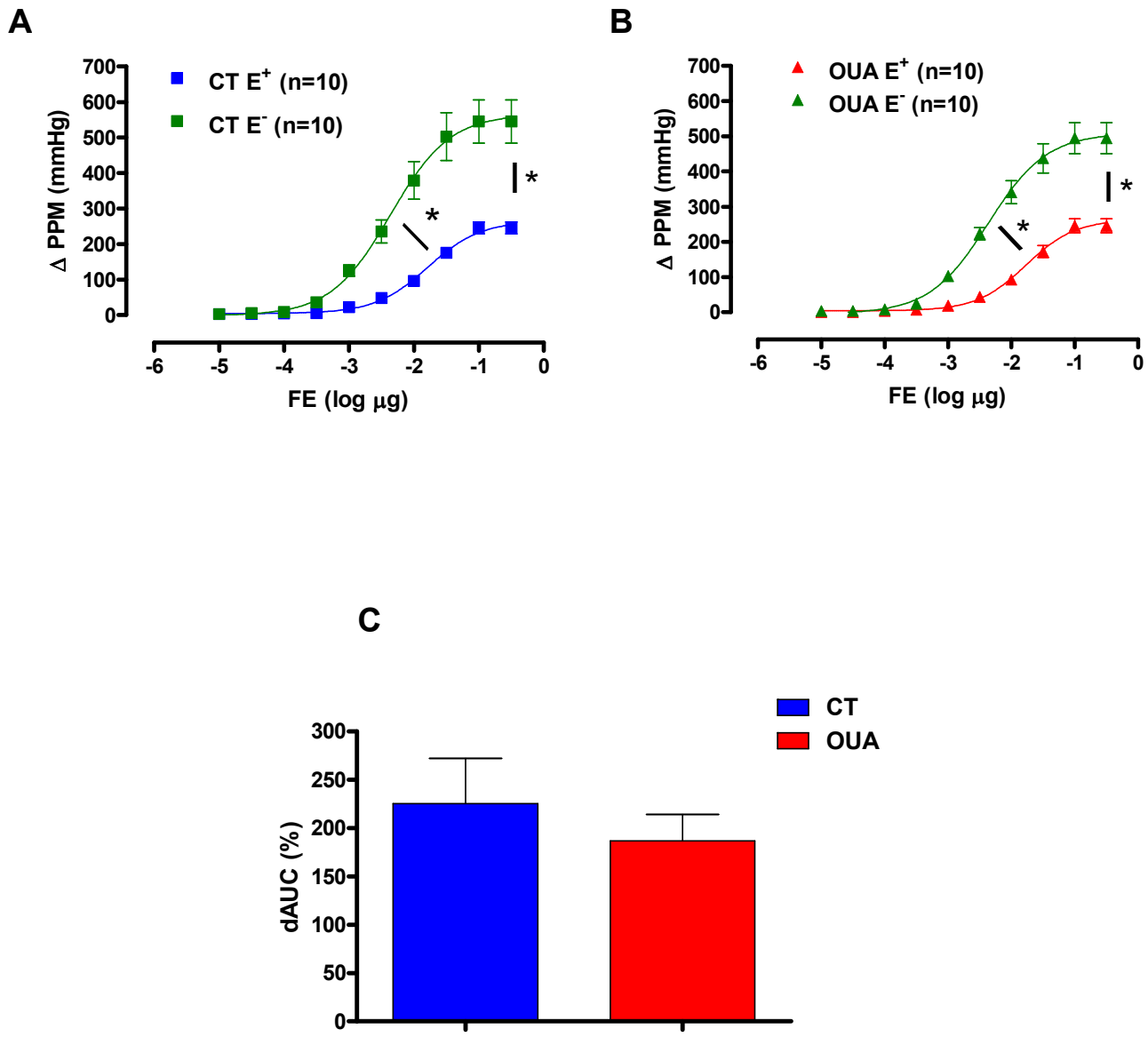


Figura 4: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal de ratos Wistar na presença (E^+) e na ausência (E^-) do endotélio em ratos CT (**A**), n=10, e tratados com OUA (**B**), n=10, teste *t*, p<0,05. Modulação endotelial expressada pela porcentagem da diferença da área abaixo da curva (%dAUC) em ratos CT (n=10) e em ratos tratados com OUA (n=10). Não houve diferença deste parâmetro entre os grupos CT e OUA (**C**); teste *t*, p>0,05.

4.6. ESTUDO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO TRATAMENTO COM OUABAÍNA SOBRE A RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Considerando que a reatividade vascular manteve-se inalterada diante do tratamento com ouabaína, e que a lesão endotelial amplificou igualmente a reatividade vascular nos grupos estudados, os dados seguintes resultam da investigação dos fatores endoteliais participantes. Visto que, embora a modulação endotelial manteve-se preservada após o tratamento com ouabaína, a participação dos fatores endoteliais nessa resposta poderia, mesmo assim, estar alteradas.

4.6.1. Efeito do tratamento com ouabaína na via do óxido nítrico

Com a finalidade de avaliar o papel do óxido nítrico (NO) na modulação do efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta pressora à FE, foi utilizado um inibidor “não seletivo” da síntese do NO, denominado L-NAME.

Ao analisarmos as pressões de perfusão média basais antes e após co-perfusão por uma hora com solução normal de Krebs-Henseleit adicionada de L-NAME (100μM), foi observado um aumento significativo no grupo CT e OUA (CT: 38,9 ± 9,0 *vs.* CT + L-NAME: 80,1 ± 22,4 mmHg, teste *t*, $p<0,05$; OUA: 34,7 ± 6,5 *vs.* OUA + L-NAME: 93,3 ± 36,1 mmHg, teste *t*, $p<0,05$). Este aumento foi semelhante em ambos os grupos, sendo o aumento da PPM basal no grupo CT de 41,2 mmHg e no grupo OUA de 58,6 mmHg (teste *t*, $p<0,05$).

A presença de L-NAME foi capaz de potencializar a resposta vasoconstritora à FE – Rmáx e pD2 – em ambos os grupos estudados, CT e OUA, através do bloqueio da via do NO (Rmáx – CT: 258,6 ± 27,2 *vs*. CT + L-NAME: 337,1 ± 40,1 mmHg, teste *t*, $p<0,05$; OUA: 214,8 ± 26,9 *vs*. OUA + L-NAME: 377,7 ± 52,0 mmHg; teste *t*, $p<0,05$; pD2 - CT: 1,80 ± 0,08 *vs*. CT + L-NAME: 2,69 ± 0,12 log mM, teste *t*, $p<0,05$; OUA: 1,82 ± 0,12 *vs*. OUA + L-NAME: 2,27 ± 0,24 log mM, teste *t*, $p<0,05$).

Contudo, há uma maior resposta vasoconstritora diante da infusão com L-NAME nos animais tratados com OUA em relação ao CT, como é possível analisar (figura 5C) através do cálculo da diferença da área abaixo da curva (dAUC) - CT: 100,6 ± 18,0 *vs*. OUA: 153,3 ± 9,0 %, teste *t*, p<0,05. Estes resultados sugerem uma maior liberação de NO pelos animais tratados com OUA em relação ao CT.

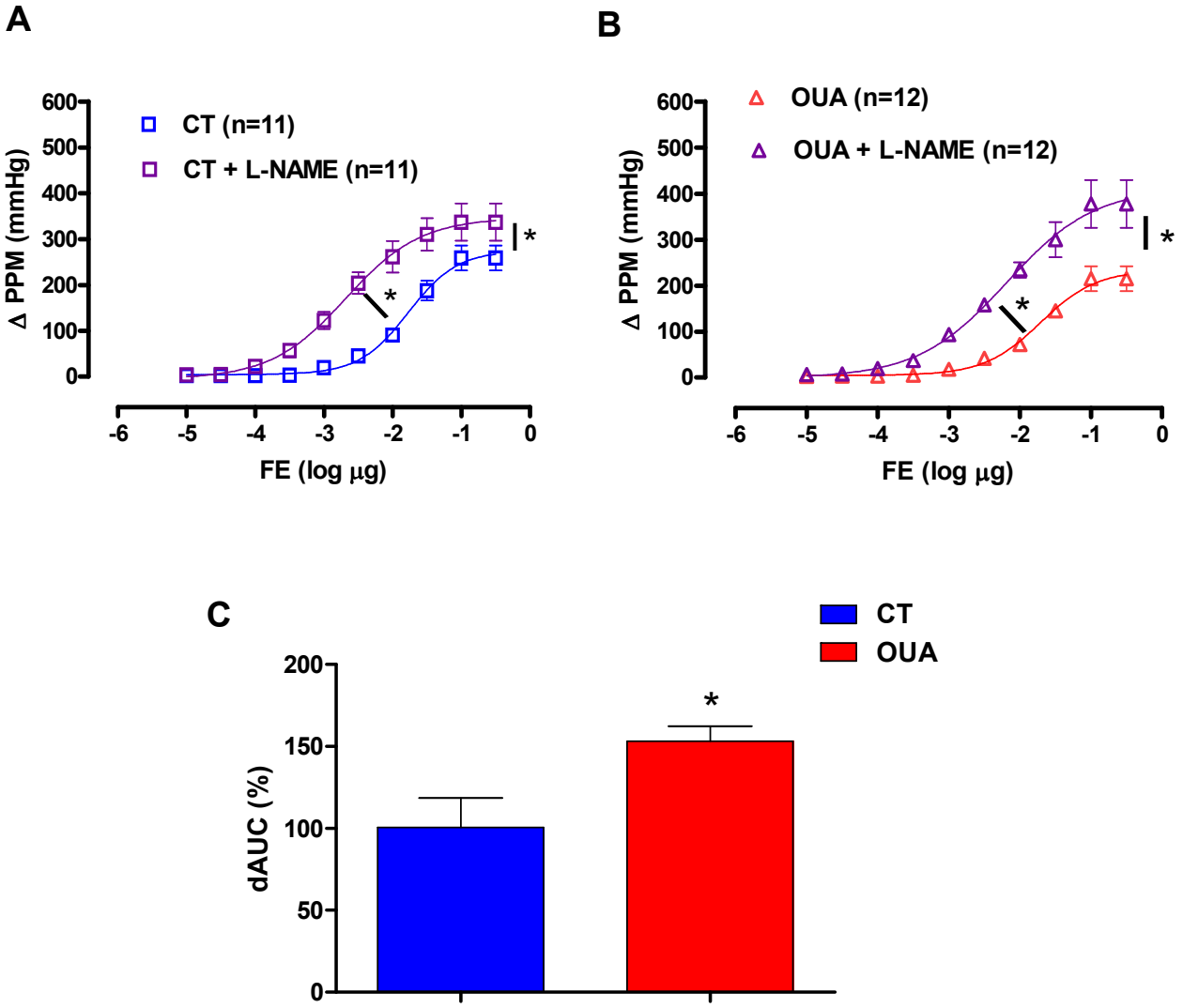


Figura 5: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=11, e tratados com OUA (**B**), n=12, antes e após infusão por uma hora de L-NAME, teste *t*, p<0,05; Modulação provocada pelo L-NAME expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (n=11) e tratados com OUA (n=12), teste *t*, p<0,05 (**C**).

4.6.2. Análise dos efeitos do tratamento com ouabaína sobre a participação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF)

Considerando uma maior liberação de NO diante do tratamento com OUA, associada à reatividade vascular à FE e à modulação endotelial sem alterações, as investigações foram continuadas no sentido de estudar o envolvimento dos fatores vasculares na resposta ao tratamento com OUA.

A co-perfusão com tetraetilamônio (TEA), um inibidor dos canais de potássio dependente de cálcio, modificou a resposta contrátil vascular à fenilefrina, como demonstrado na figura 6 (A e B). Nos animais CT a infusão com TEA aumentou a resposta máxima sem modificar a sensibilidade à fenilefrina – figura 6A (Rmáx – CT: 353,9 ± 16,1 *vs.* CT + TEA: 452,8 ± 27 mmHg, teste *t*, $p<0,05$; pD2 – CT: 2,03 ± 0,07 *vs.* CT + TEA: 1,94 ± ,080 log mM, teste *t*, $p>0,05$). Já no grupo de animais tratados com OUA o bloqueio dos canais de potássio dependente de cálcio gerou um aumento tanto da resposta máxima quanto da sensibilidade à fenilefrina – figura 6B (Rmáx – OUA: 364,8 ± 15,0 *vs.* OUA + TEA: 494,9 ± 21,5 mmHg, teste *t*, $p<0,05$; pD2 – OUA: 1,83 ± 0,07 *vs.* OUA + TEA: 2,04 ± 0,09 log mM, teste *t*, $p<0,05$). A magnitude da resposta vasoconstritora ao TEA no grupo OUA foi significativamente maior que nos animais CT, como é possível analisar através da dAUC (figura 6C) – CT: 37,4 ± 7,1 *vs.* OUA: 66,6 ± 5,4 %, teste *t*, $p<0,05$.

Este resultado demonstra um aumento da participação de canais de potássio ativados por cálcio na modulação da resposta contrátil à fenilefrina no segmento proximal da artéria caudal dos animais tratados com ouabaína.

A pressão de perfusão média basal antes e depois da co-perfusão com TEA por uma hora foi aumentada significativamente tanto nos animais CT quanto nos OUA (CT: 29,5 ± 11,4 *vs.* CT + TEA: 52,1 ± 26,8 mmHg, teste *t*, $p<0,05$; OUA: 31,1 ± 8,9 *vs.* OUA + TEA: 64,2 ± 23,5 mmHg, teste *t*, $p<0,05$), sendo este aumento equivalente em ambos os grupos estudados, com elevação da PPM basal no grupo CT de 22,6 mmHg e no grupo OUA de 33,1 mmHg (teste *t*, $p>0,05$).

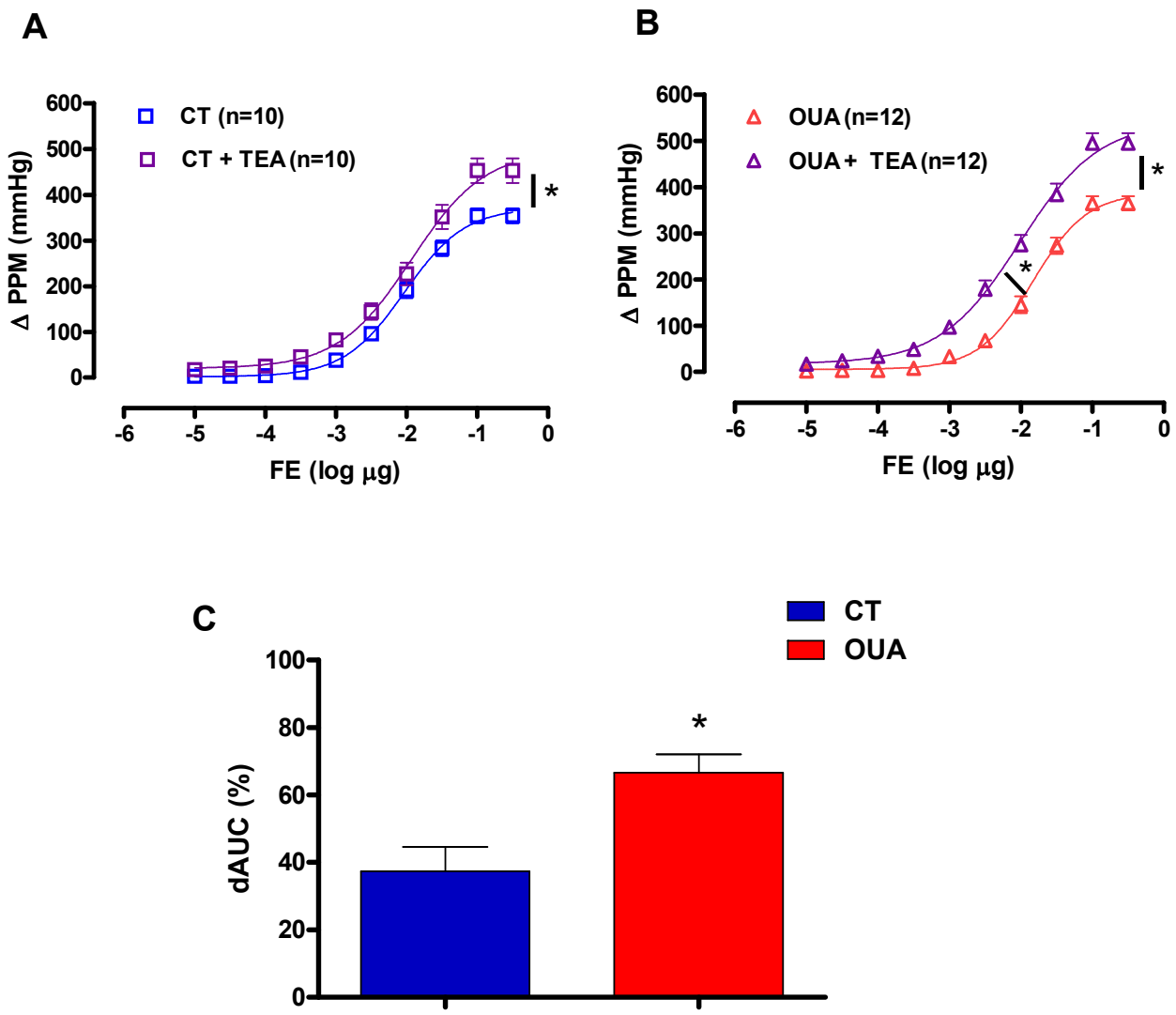


Figura 6: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=10, e tratados com OUA (**B**), n=12, antes e após infusão por uma hora de TEA, teste *t*, p<0,05; Modulação provocada pelo TEA expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (n=10) e tratados com OUA (n=12), teste *t*, p<0,05 (**C**).

4.6.3. Efeito da ouabaína, administrada cronicamente, sobre os prostanóides derivados da via do ácido araquidônico / ciclooxigenase

Para avaliar a participação dos prostanóides na resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-reposta à FE antes e após perfusão por uma hora com Indometacina (10μM), um inibidor da enzima ciclooxigenase, no grupo CT e no grupo de animais tratados com OUA.

A presença de Indometacina (Indo) não foi capaz de modificar a resposta máxima (Rmax) nem a sensibilidade (pD2) das curvas de FE nos grupos CT e OUA – figura 7, A e B (Rmáx CT: 268,3 ± 13,0 *vs.* CT + Indo: 245,6 ± 10,6 mmHg, teste *t*, p>0,05; pD2 CT: 1,78 ± 0,04 *vs.* CT + Indo: 1,88 ± 0,05 log mM, teste *t*, p>0,05; Rmáx OUA: 316,6 ± 18,4 *vs.* OUA + Indo: 302,7 ± 27,7 mmHg, teste *t*, p>0,05; pD2 OUA: 1,85 ± 0,05 *vs.* OUA + Indo: 2,00 ± 0,05 log mM, teste *t*, p>0,05).

Em relação à pressão de perfusão média basal antes e após a co-perfusão com Indo, foi observado um aumento significativo apenas no grupo OUA (CT: 42,6 ± 19,4 *vs.* CT + Indo: 38,8 ± 11,9 mmHg, teste *t*, p>0,05; OUA: 39,5 ± 13,9 *vs.* OUA + Indo: 68,7 ± 18,4 mmHg, teste *t*, p<0,05), sendo a elevação da PPM basal no grupo OUA de 29,9 mmHg (teste *t*, p<0,05).

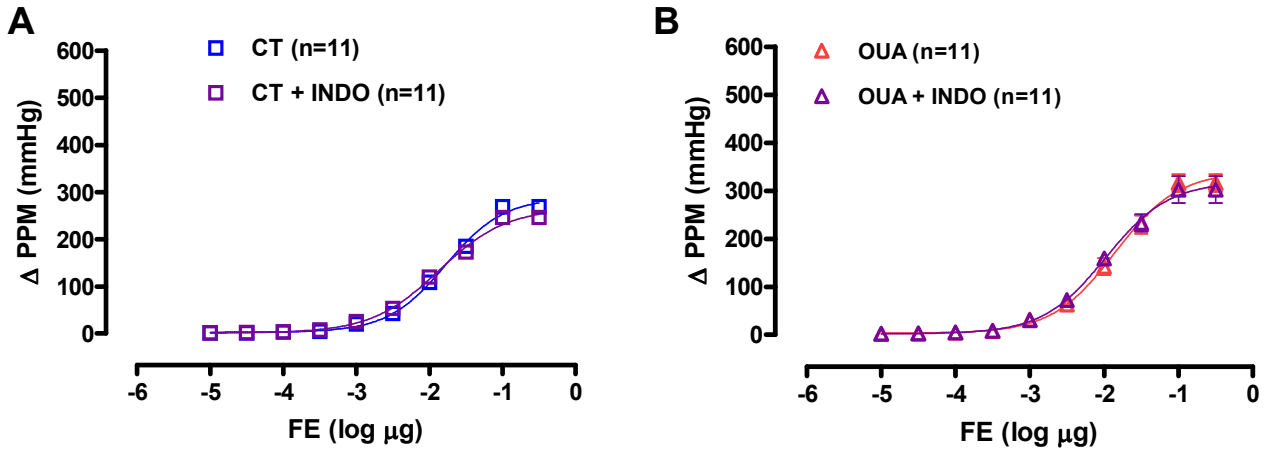


Figura 7: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=11, e tratados com OUA (**B**), n=11, antes e após infusão por uma hora de Indometacina (10μM); teste *t*, p>0,05.

4.6.4. Análise da influência da ouabaína no duplo bloqueio das vias do óxido nítrico e do ácido araquidônico/ciclooxigenase (COX)

Com o objetivo de avaliar simultaneamente o bloqueio de NO e COX, foi realizado o duplo bloqueio com a perfusão de L-NAME e Indometacina. O bloqueio destas duas vias provocou aumento significativo de resposta máxima e sensibilidade nas curvas concentração-resposta tanto no grupo CT quanto no grupo OUA – figura 8, A e B (Rmáx CT: 334,7 ± 16,7 *vs.* CT + Indo + L-NAME: 619,5 ± 37,0 mmHg, teste *t*, p<0,05; pD2 CT: 1,95 ± 0,08 *vs.* CT + Indo + L-NAME: 1,92 ± 0,05 log mM, teste *t*, p<0,05; Rmáx OUA: 346,2 ± 22,1 *vs.* OUA + Indo + L-NAME: 517,3 ± 36,7 mmHg, teste *t*, p<0,05; pD2 OUA: 1,95 ± 0,07 *vs.* OUA + Indo + L-NAME: 2,30 ± 0,11 log mM, teste *t*, p<0,05).

Porém, quando avaliada a magnitude desta resposta, foi observada semelhança entre o grupo CT e o grupo OUA, analisada através da dAUC (figura 8C) – CT: 102,2 ± 21,2 *vs.* OUA: 88,38 ± 22,5 %, teste *t*, p<0,05.

A pressão de perfusão média basal não foi modificada antes e após a co-perfusão por uma hora com Indo + L-NAME, nos grupos estudados – CT e OUA (CT: 54,4 ± 16,8 *vs.* CT + Indo + L-NAME: 56,2 ± 21,6 mmHg, teste *t*, p>0,05; OUA: 48,8 ± 14,6 *vs.* OUA + Indo + L-NAME: 57,9 ± 22,6 mmHg, teste *t*, p>0,05). Entre o grupo CT e OUA também não foi observada mudança na PPM basal após a perfusão simultânea com Indo + L-NAME (CT + Indo + L-NAME: 56,2 ± 21,6 *vs*. + Indo + L-NAME: 57,9 ± 22,6 mmHg, teste *t*, p>0,05).

No entanto, ao analisarmos separadamente a ação do duplo bloqueio com Indometacina e L-NAME com a reatividade após o bloqueio somente com L-NAME, no grupo controle e no grupo tratado com ouabaína, através da dAUC (figura 9, A e B), podemos observar que nos animais OUA houve diminuição da resposta vasoconstritora diante do duplo bloqueio, quando comparado ao bloqueio único da via do NO – dAUC (CT + L-NAME: 100,6 ± 18,1 *vs*. CT + L+NAME + Indo: 102,2 ± 21,0 %, teste *t*, p>0,05; OUA + L-NAME: 153,3 ± 9,8 *vs*. OUA + L-NAME + Indo: 88,4 ± 22,5, teste *t*, p<0,05 %).

Este resultado sugere que nos animais tratados com OUA há liberação de prostanóides vasoconstritores, observado apenas diante do bloqueio conjunto da via da COX e da via do NO. Este efeito parece contrabalancear o efeito vasodilatador causado pela liberação de NO e EDHF, conforme observado anteriormente, diante dos bloqueios únicos com L-NAME ou Indometacina.

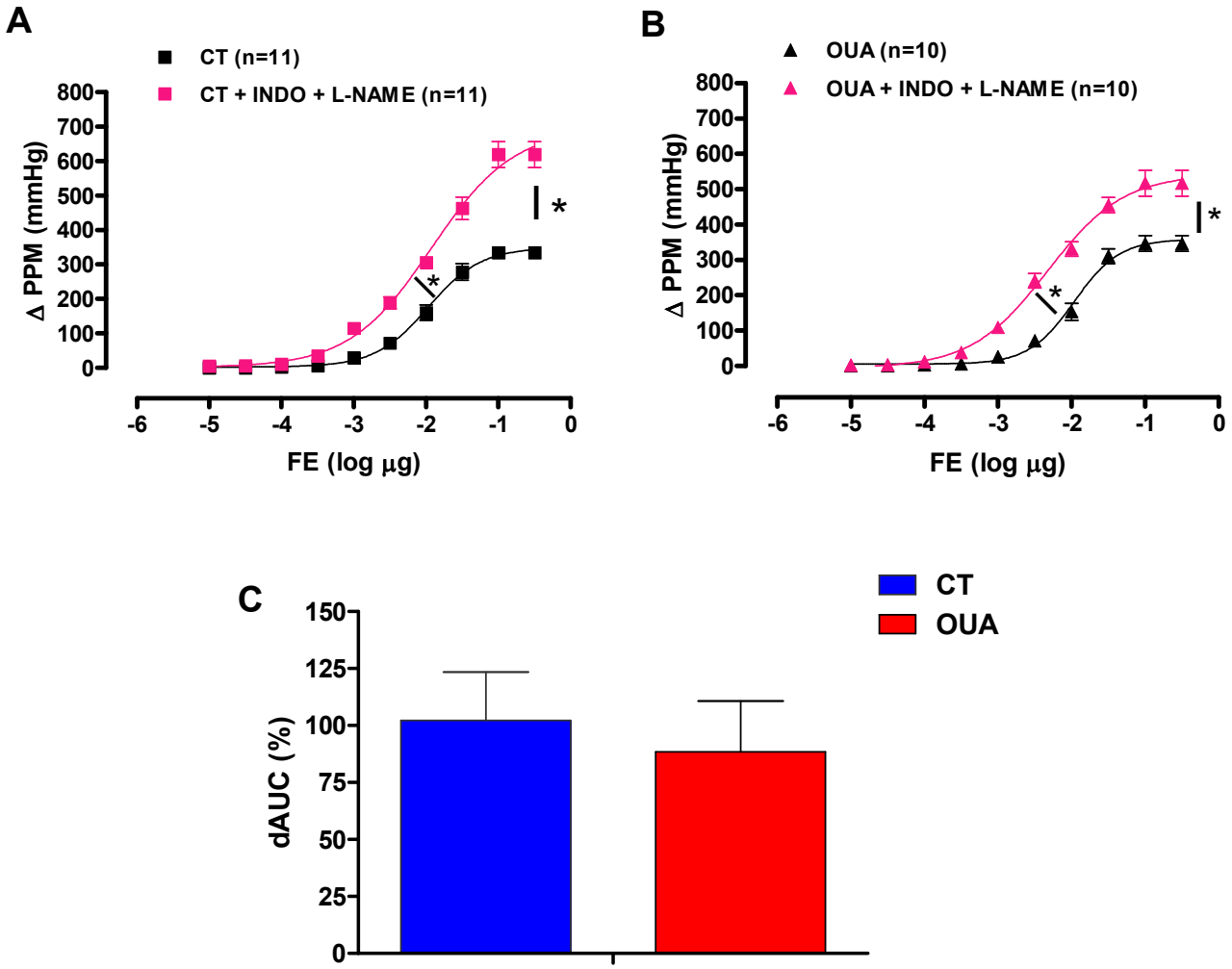


Figura 8: Mudanças na variação da pressão de perfusão média (ΔPPM, mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina (FE) no terço proximal da arterial caudal na presença de endotélio funcional (E^+) em ratos CT (**A**), n=11, e tratados com OUA (**B**), n=10, antes e após infusão por uma hora de Indometacina e L-NAME, teste *t*, p<0,05; Modulação provocada pela co-infusão de Indometacina e L-NAME expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (n=11) e tratados com OUA (n=10), teste *t*, p>0,05 (**C**).

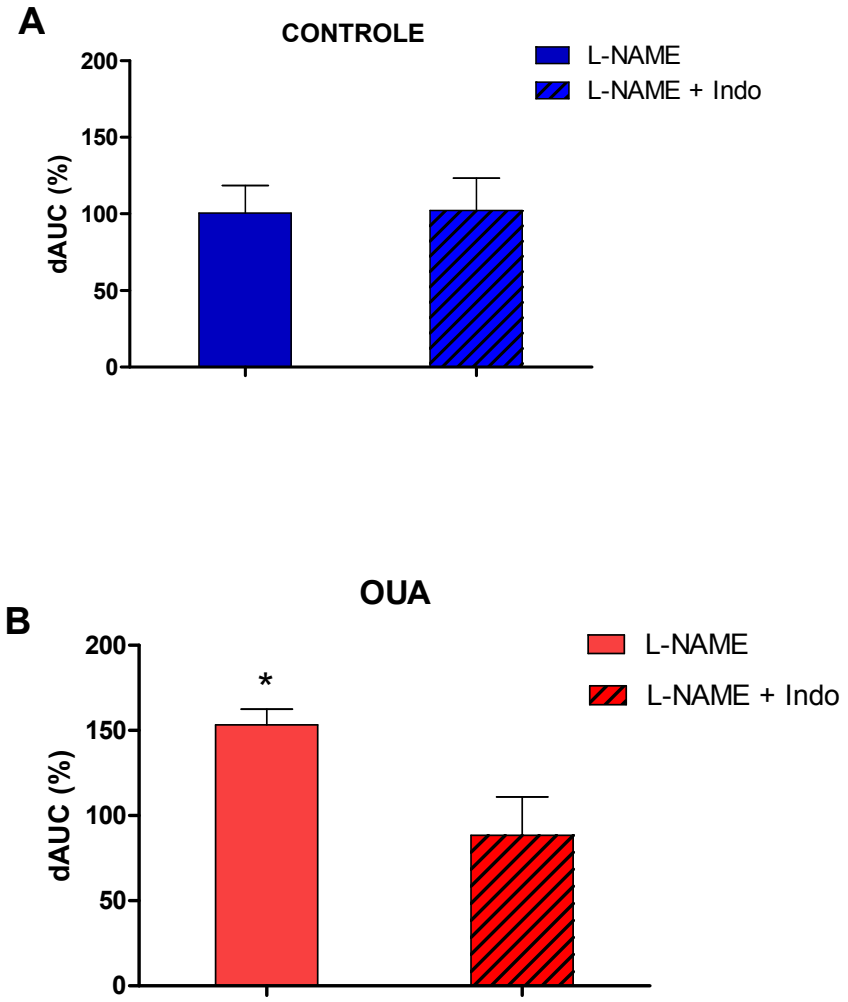


Figura 9: Diferenças na modulação provocada pela co-infusão de L-NAME comparada com a co-infusão de Indometacina e L-NAME, expressada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) em ratos controle (**A**) – teste *t*, p>0,05 – e ratos tratados com OUA (**B**) – teste *t*, p<0,05.

4.7. ESTUDO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA NA^+ K^+ ATPASE EM RATOS TRATADOS COM OUABAÍNA DURANTE 15 DIAS

A atividade funcional da Na^+K^+ATPase foi estudada indiretamente através da técnica descrita por Webb e Bohr (1978) e modificada por Rossoni *et al*. (1999), de relaxamento induzido pelo potássio com intuito de verificar o efeito do tratamento com ouabaína por 15 dias (25µg/kg/dia, *i.m.*) na atividade da Na^+K^+ATPase em ratos Wistar.

Diante da figura 10 pode ser observado, tanto nos animais CT quanto OUA, que o potássio adicionado à perfusão foi capaz de reduzir de maneira concentração-dependente a contração induzida pela FE (10^{-7}M), no terço proximal da artéria caudal dos animais estudados. Nos animais tratados com OUA houve um aumento significativo do relaxamento ao potássio, em todas as concentrações (KCl: 1mM, 2mM, 4mM, 6mM), sendo a resposta máxima de relaxamento obtida na concentração de 6mM (CT: -48,5 ± 3,9 *vs*. OUA: -61,7 ± 2,1 %, teste *t*, $p<0,05$).

Este resultado sugere um aumento na atividade da Na^+K^+ATPase nas artérias de condutância estudadas dos animais tratados com OUA.

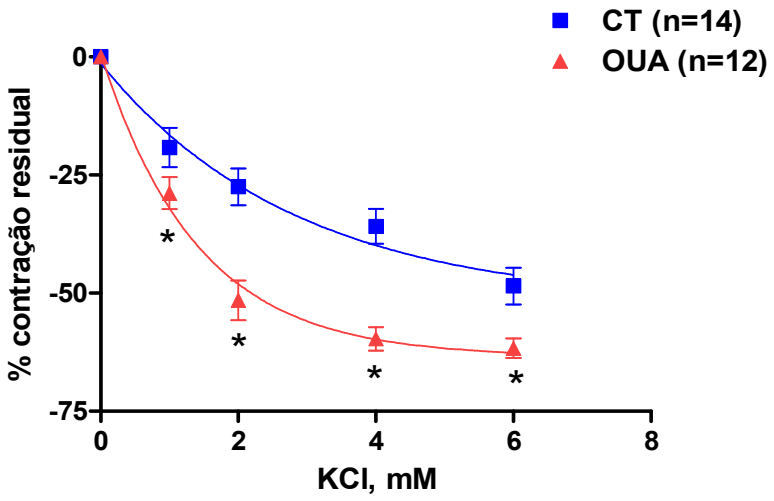


Figura 10: Curva de relaxamento induzida pelo Cloreto de Potássio (KCl) no terço proximal da artéria caudal em ratos controle (n=14) e tratados com OUA (n=12). Resultados expressos como porcentagem de contração residual mantida após a pré-contração com FE (10^{-7} M) e adição de KCl (1mM, 2mM, 4mM, 6mM). Pontos representam a média ± EPM; teste *t*, $p<0,05$.

5. DISCUSSÃO

A HA, como descrito anteriormente, representa um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, sendo atualmente caracterizada como um relevante problema de saúde pública, devido à magnitude de sua prevalência e à dificuldade em ser controlada. São muitos os estudos que buscam esclarecer o fisiopatogenia da hipertensão, devido ao grande interesse clínico em elucidar os mecanismos envolvidos no processo hipertensivo, com o intuito de contê-lo.

Muito embora diversos estudos já tenham sido relatados, se fazem necessárias mais investigações no sentido de conhecer os variados mecanismos que contribuem com o desenvolvimento e a manutenção da elevação dos níveis pressóricos. Sabe-se que fatores que influenciam no DC e na volemia contribuem para a elevação da PA, estando relacionados a modificações da resistência vascular. Dentre as diversas alterações que podem contribuir com aumento da RVP e, deste modo, influenciar a gênese e/ou manutenção do quadro hipertensivo, podem ser citadas modificações vasculares funcionais e estruturais (Winquist *et al*., 1982; Folkow, 1982), como por exemplo: redução do relaxamento ou aumento da liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio; aumento da contração do músculo liso vascular; aumento da sensibilidade a agentes vasoconstritores, aumento da atividade simpática; aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons monovalentes e divalentes; modificações na Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático; modificações na atividade e expressão do trocador Na^{+}/Ca^{2+} e da $Na^{+}K^{+}$ ATPase (Folkow, 1982; Konishi e Su, 1983; Bohr e Webb, 1984; Lüscher e Vanhoutte, 1986; Blaustein, 1988; 1993; Marín, 1993).

Assim, considerando a relevância de todas essas alterações descritas na gênese e/ou manutenção da HA e, principalmente, diante das importantes funções celulares conhecidas da bomba de sódio, desenvolvemos este estudo utilizando um inibidor desta ATPase, a ouabaína, no intuito de compreender o seu efeito hipertensinogênico. A ouabaína é uma substância endógena presente no plasma de diversos mamíferos, incluindo o homem, em concentrações nanomolares, podendo estes níveis se encontrarem elevados no quadro de hipertensão.

Entretanto, o mecanismo pelo qual a ouabaína pode estar influenciando, induzindo e/ou mantendo a HA ainda não foi completamente esclarecido. Muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de demonstrar o papel da ouabaína na gênese e/ou manutenção da PA, assim como, por qual mecanismo esta substância atuaria no sistema vascular. Há relatos de que a ouabaína pode agir diretamente na artéria, elevando a resistência vascular periférica ou sensibilizando o leito vascular, e assim, aumentando sua responsividade a substâncias vasopressoras como noradrenalina, angiotensina II e fenilefrina (Guthrie Jr, 1984; Marín *et al*., 1988; Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997; Ponte *et al*., 1996 a;b). Alguns autores também demonstraram que concentrações nanomolares de ouabaína aumentam a contração induzida pela cafeína em artérias de ratos (Weiss *et al*., 1994), e na concentração de 1nM, pode levar ao aumento da quantidade de cálcio no citosol (Zhu *et al*., 1996). Pesquisadores demonstraram que o *plasmerossome*, região na qual podem ser encontradas as subunidades α_2 e α_3 da bomba de sódio e o trocador Na^+/Ca^{++}, pode estar relacionado à modulação do tônus vascular na hipertensão induzida por ouabaína, já que as subunidades de maior afinidade à ouabaína estão situadas próximo ao retículo e poderiam influenciar o aumento do cálcio intracelular (Arnon *et al*., 2000). Além disso, outros trabalhos descreveram uma ação central da ouabaína aumentando a atividade simpatoexcitatória e um prejuízo do barorreflexo, interferindo, assim, no desenvolvimento da HA (Huang *et al*., 1992; 1994; Huang e Leenen, 1996).

Como relatado previamente, estudos demonstram que a concentração de ouabaína endógena se encontra elevada em pacientes com hipertensão primária, correlacionando-se com a elevação da PA (Goto *et al*., 1990; Rossi *et al*., 1995; Manunta *et al*., 1999; 2001). No presente estudo pôde ser observado aumento da PAS, PAD e PAM, através de experimentos *in vivo*, nos animais tratados com ouabaína por 15 dias (25µg/kg/dia $\cong$ 10nM, *i.m.*). Já é sabido que a administração prolongada deste digitálico é capaz de induzir a hipertensão (Yuan *et al*., 1993; Manunta *et al*., 1994; Rossoni *et al*., 2002b; Dostanic *et al*., 2005; Padilha *et al*., 2008). Relatos prévios do nosso grupo demonstram que a ouabaína promoveu, porém de forma aguda e em animais SHR, aumento da PA em animais anestesiados (Vassallo *et al*., 1997; Rossoni *et al*., 2001; Padilha *et al*., 2004). O aumento da PAS,

neste caso, pode estar relacionado com o clássico efeito inotrópico positivo promovido pela ouabaína através da inibição da bomba de sódio (Cattel e Gold, 1938; Blaustein, 1993; Wasserstrom e Aistrup, 2005; Altamirano *et al*., 2006). Em relação ao aumento da PAD, estudos relatam este efeito diante do tratamento agudo com ouabaína (Blaustein, 1993). Além disso, sabe-se que aumentos pressóricos ocasionados pelo tratamento crônico com ouabaína já estão estabelecidos após 15 dias (Rossoni *et al*., 2002a; b; Xavier *et al*., 2004a; b).

Outro parâmetro que se apresentou elevado em nosso estudo, diante do tratamento com ouabaína por 15 dias, foi a FC. Porém, o aumento de FC encontrado no presente trabalho encontra-se dentro das faixas fisiológicas para os animais estudados, sendo assim, este aumento não foi significativo. Dados de outras investigações, obtidos através da administração aguda de ouabaína, demonstraram que não foi identificada mudança na FC (Rossoni *et al*., 2001).

Com a finalidade de estudar possíveis mecanismos vasculares que estariam envolvidos no aumento da resistência vascular periférica e, assim, participando do efeito pressórico induzido pela ouabaína, nos animais tratados, foi utilizada a preparação do leito arterial caudal. A escolha deste leito arterial foi feita devido aos trabalhos realizados previamente, inclusive em nosso laboratório, em que foi demonstrado que a preparação do leito arterial caudal possui uma alta capacidade de resposta a agentes vasoconstritores como a fenilefrina, o que viabilizaria o desenvolvimento desta pesquisa (Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997). Isolamos o segmento proximal da artéria caudal com intuito de descrever as alterações desenvolvidas em artérias de condutância, cujo comportamento equivalente fora descrito por Souza *et al*. (2008).

Os efeitos vasculares produzidos pelo tratamento crônico com ouabaína diferem quando analisados em artérias de condutância e de resistência. Nas artérias mesentéricas de resistência, diante do tratamento com ouabaína por 5 semanas, foi identificado aumento da produção de NO e diminuição da liberação de EDHF, mantendo inalterada a resposta à noradrenalina nessas artérias (Xavier *et al*., 2004b). Em artérias de condutância, como aorta e mesentérica superior, a administração crônica de ouabaína por cinco semanas foi capaz de promover aumento na produção de NO e diminuição dos prostanóides, levando à redução da

reatividade aos agonistas α-adrenérgicos (Rossoni *et al*., 2002b; Xavier *et al*., 2004b).

No entanto, no período estudado, de 15 dias, com concentração de 25µg/kg/dia, ainda não se conhecia os efeitos da ouabaína em vasos de condutância de ratos, o que havia sido estudado apenas em artérias de resistência mesentéricas, como descrito por Padilha *et al*., 2008.

Sendo assim, os resultados obtidos nesse estudo, em artérias de condutância, demonstram que a administração por 15 dias de ouabaína em concentrações nanomolares é capaz de promover aumento da PAS, PAD e PAM, bem como elevação da FC, *in vivo*. Entretanto, diante dos experimentos *in vitro*, não foi observada alterações na reatividade vascular à fenilefrina, conforme outrora demonstrado em artérias de resistência (Xavier *et al*., 2004a; b; Padilha *et al*., 2008). Em outros relatos, após administração crônica por cinco semanas desse digitálico, observa-se uma redução da reatividade vascular à FE e aumento da atividade e expressão da Na+K+ ATPase (Rossoni *et al*., 2002a). Essa modificação na reatividade vascular parece ser devido ao aumento da produção de óxido nítrico e maior expressão de eNOS e iNOS (Rossoni *et al*., 2002b).

É importante ressaltar que o efeito vasoconstritor direto da ouabaína ocorre em altas concentrações desse composto (Ross Jr *et al*., 1960; Mason e Braunwald, 1964; Marín *et al*., 1988). Como a ouabaína plasmática se encontra em baixa concentração, conforme simulado em nosso estudo, outros mecanismos tem sido propostos para explicar sua ação pressora, podendo ser baseado na sensibilização do MLV aos agentes vasopressores (Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997; Rossoni *et al*., 1999; 2001). Outras investigações demonstram que a ouabaína endógena parece atuar em concentrações nanomolares no *plasmerossome*, permitindo explicar possíveis mecanismos pelos quais essas concentrações de ouabaína seriam capazes de participar na fisiopatogenia da hipertensão (Golovina e Blaustein, 1997; Blaustein *et al.,* 1998).

Reforçando o que já foi descrito, sabe-se que a habilidade da ouabaína em elevar a pressão arterial de ratos, tanto diante da administração aguda quanto crônica, pode ser resultante de mecanismos centrais e periféricos, os quais se fundamentam no aumento da atividade simpática, na ação direta sobre o MLV, na

sensibilização da musculatura lisa aos agentes vasoconstritores (Blaustein, 1993; Huang e Leenem, 1994; Songu-Mize *et al*., 1995; Vassallo *et al*., 1997; Rossoni *et al*., 1999; 2001, 2002a; b), entre outros. Sendo assim, com o intuito de investigar mecanismos hipertensinogênicos oriundos do tratamento crônico com ouabaína realizado no presente estudo, serão discutidas, a seguir, algumas intervenções.

Trabalhos na literatura já vêm demonstrando que, em algumas situações, os animais hipertensos apresentam um aumento compensatório da liberação de agentes vasodilatadores derivados do endotélio, na tentativa de impedir um aumento brusco de resistência vascular (Arribas *et al*., 1994; Ferrer *et al*., 1995; Vargas *et al*.,1996; Maeso *et al*., 1999; Ruiz-Marcos *et al*., 2001, Rossoni *et al*., 2002b). Diante dessas possibilidades, na medida em que a ouabaína poderia agir de modo a elevar a PA dos animais tratados em nosso estudo, ela poderia modificar a participação dos fatores endoteliais envolvidos, conforme descrito por outros pesquisadores (Rossoni *et al*., 2002a; b; Xavier *et al*., 2004a; b; Padilha *et al*., 2004; 2008).

Considerando desta hipótese, foi realizada a retirada do endotélio, o que foi capaz de aumentar significativamente a resposta pressora induzida por fenilefrina, demonstrando uma modulação endotelial sobre a resposta a este agente contrátil, tanto nos animais controle quanto nos tratados com ouabaína. No entanto, a magnitude desta modulação foi semelhante nos grupos estudados, o que corrobora os dados advindos de experimentos com artérias de resistência (Padilha *et al*., 2008). A remoção satisfatória do endotélio foi confirmada diante da redução da capacidade da acetilcolina em induzir relaxamento do segmento arterial estudado. Em ambos os grupos, a lesão endotelial bloqueou, em 90% ou mais, a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina. Esses resultados são compatíveis com diversos trabalhos de reatividade vascular, inclusive o pioneiro estudo de Furchgott e Zawadzki (1980), em que pesquisadores demonstraram a importância do endotélio para o relaxamento induzido por acetilcolina. A manutenção da integridade do MLV, diante da remoção do endotélio com a utilização de CHAPS, foi analisada pela capacidade preservada de relaxamento ao nitroprussiato de sódio.

Dando continuidade às investigações de possíveis fatores endoteliais participantes do processo hipertensivo encontrado nos animais tratados com ouabaína, foi investigada uma possível liberação de NO através da perfusão das

artérias de condutância com L-NAME, conforme discriminado anteriormente. Estudos prévios demonstram que o NO é liberado em cultura de células endoteliais tratadas com 1 μM de ouabaína (Xie *et al*., 1993). Outros trabalhos demonstram uma potencialização da resposta pressora à fenilefrina (Mantelli *et al*., 1995; Dohi *et al*., 1996; Tebernero *et al.*, 1996; 1999; Padilha *et al*., 2008), corroborando os achados do presente estudo, em que houve significativo deslocamento da curva à esquerda causada por L-NAME, em ambos os grupos, sendo que nos ratos tratados com ouabaína este fato ocorreu em maior magnitude. Esses dados sugerem que em animais tratados com ouabaína há uma maior modulação negativa do NO sobre a resposta α-adrenérgica em vasos de condutância, corroborando estudos prévios, no entanto, realizados com 5 semanas (Rossoni *et al*., 2002b) e também estudos em artérias de resistência (Xavier *et al*., 2004a; b; Padilha *et al*., 2008).

Trabalhos anteriores relatam que, embora tenha ocorrido um aumento na liberação de NO diante do tratamento com ouabaína, não houve modificações na expressão protéica da eNOS, não podendo ser atribuído ao aumento da expressão da enzinma eNOS (Xavier *et al*., 2004b; Padilha *et al*., 2008). Por outro lado, outros estudos, em aorta, demonstraram um aumento da expressão da eNOS e da iNOS (Rossoni *et al*., 2002a; b), o que reforça a idéia de que existem alterações regionais observadas na hipertensão por ouabaína.

Nosso trabalho sugere, então, que a modulação do NO sobre a responsividade pressora à FE pode estar relacionada ao aumento da atividade da enzima NOS, corroborando estudos prévios (Kimura *et al*., 2000; Rossoni *et al*., 2002a; Xavier *et al*., 2004b; Padilha *et al*., 2008). No tratamento agudo também já foi identificado um aumento da liberação basal de NO (Xie et al., 1993).

No entanto, apesar de o NO ter promovido uma modulação negativa diante do tratamento com ouabaína, a remoção endotelial amplificou de modo semelhante, nos dois grupos estudados, a resposta à FE, sugerindo que a liberação do fator vasodilatador pode ocorrer concomitante a um possível prejuízo de fatores vasodilatadores ou a um aumento de um fator vasoconstritor derivado do endotélio nos animais tratados com ouabaína, conforme também sugerido por Padilha *et al*., 2008.

Outro fator que poderia estar participando na modulação dos efeitos da ouabaína seria o EDHF, o qual atua abrindo os canais de potássio, gerando hiperpolarização direta do MLV e/ou estimulando a bomba de sódio, sendo essas ações dependentes do modelo animal e do leito arterial estudado (Félétou e Vanhoutte, 1988; 1999; Quilley e McGiff, 2000; Harris *et al*., 2000). Para investigar esta hipótese foi utilizado um bloqueador "não-seletivo" dos canais para potássio ativados por cálcio, o tetraetilamônio – TEA. Sendo assim, foi observado, no vigente estudo, que a perfusão com TEA promoveu importante aumento da resposta pressora à FE, em ambos os grupos estudados – ouabaína e controle – sendo observada uma maior resposta nos animais tratados com ouabaína. Deste modo, nosso trabalho sugere uma liberação de EDHF, pelas artérias de condutância dos animais tratados com ouabaína, maior que nos animais controles, o que se contrapõe a outros estudos, que identificaram um prejuízo na liberação de EDHF em artérias de animais tratados com ouabaína (Xavier, *et al*., 2004b; Padilha, *et al*., 2008). Schiffrin (1996), todavia, observou aumento da liberação de EDHF em artérias de resistência de animais sem tratamento adicional, ao descrever a função do endotélio neste tipo de vaso.

O EDHF é o fator vasodilatador dependente do endotélio predominante em artérias de resistência, ao passo que, em artérias de condutância, o NO possui relevante função vasodilatadora (Edwards *et al*., 1998; Brandes *et al*., 2000). Alterações na síntese ou liberação do EDHF podem ser determinantes em doenças cardiovasculares como a HA, podendo compensar o prejuízo das funções do NO, associado ao quadro hipertensivo, preservando o relaxamento dependente de endotélio em artérias de resistência de ratos hipertensos (Kojda e Harrison, 1999). Variações nos achados em relação à liberação desses fatores deve-se, entre outros, ao tipo de leito vascular analisado.

Reunindo os achados deste estudo até então, tem-se que o tratamento com ouabaína foi capaz de aumentar a PA e FC, porém sem alterações na reatividade vascular à FE e nem na modulação endotelial. Todavia, observamos a participação de fatores endoteliais diante deste tratamento por 15 dias com ouabaína, dentre os quais NO e EDHF. A liberação destes fatores, de conhecida ação vasodilatadora, provavelmente deve estar sendo contrabalanceada por algum fator vasoconstritor,

de modo que a reatividade vascular à FE não se encontra alterada nos animais ouabaína em relação ao seu controle.

Diante do exposto, nossas investigações se deram no sentido de conhecer qual seria este fator vasoconstritor liberado, através, inicialmente, do bloqueio da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase (COX). Dados da literatura demonstram que a ouabaína, em cultura de células endoteliais bovinas, estimula a liberação de prostanóides vasodilatadores, a prostaciclina (PGI_2) (Nakagawa *et al*., 1987). Considerando que a HA pode alterar a síntese ou liberação de prostanóides, contribuindo para as alterações vasculares observadas neste processo patológico (Auch-Schwelk e Vanhoutte, 1991; Alvarez *et al*., 2005), esta via também foi objeto de nosso estudo. No entanto, o bloqueio da via do ácido-araquidônico/ciclooxigenase, através do uso de indometacina, pode estar bloqueando tanto a liberação de prostanóides vasoconstritores e/ou de prostanóides vasodilatadores. Há relatos de que o bloqueio da COX, através do uso de Indometacina, foi ineficaz em potencializar os efeitos agudos da ouabaína (Sánchez-Ferrer, *et al*., 1992; Rodrígues-Mañas, *et al*., 1992; Ponte *et al*., 1996a; França *et al*., 1997). Entretanto, em diversos modelos de hipertensão já foi demonstrado uma modificação na participação dos prostanóides, alterando o relaxamento à acetilcolina assim como, a resposta aos agentes vasoconstitores (Carvalho *et al*., 1997; Taddei *et al*., 1997; Moreau *et al*., 1997; da Cunha *et al*., 2000). Assim, pesquisadores demonstraram que, tanto nos animais controle quanto nos tratados com ouabaína, a indometacina reduziu a resposta máxima à FE, em anéis de aorta torácica e artéria caudal. Estes dados são concordantes com a literatura que demonstram uma participação de prostanóides vasoconstritores mediando a contração da musculatura lisa tanto em animais normotensos quanto em hipertensos (Lin e Nasjletti, 1992; Tabernero *et al*., 1999). Nos anéis de artéria mesentérica de animais tratados com ouabaína, o bloqueio da via do ácido-araquidônico ciclooxigenase não modificou a contração induzida pela fenilefrina (Padilha *et al*., 2008), o que corrobora nossos achados, em que não identificamos mudanças na reatividade vascular à FE induzida somente pela indometacina em ambos os grupos estudados – controle e ouabaína. Rossoni *et al*. (2002b) relatou que, semelhante à administração aguda de ouabaína, o tratamento crônico com este digitálico parece não mediar a liberação de um

prostanóide vasodilatador nos anéis de artérias aorta e caudal modulando a resposta contrátil à FE.

Após bloquear somente a via da COX, realizamos um duplo bloqueio com L-NAME e Indometacina, diante do qual podemos observar um aumento significativo da resposta vasoconstritora à FE, de mesma magnitude em ambos os grupos estudados, entretanto, ao analisarmos separadamente a ação do duplo bloqueio com Indometacina e L-NAME no grupo controle e no grupo tratado com ouabaína, podemos observar que nos animais ouabaína houve diminuição da resposta vasoconstritora diante do duplo bloqueio, quando comparado ao bloqueio único da via do NO. Este resultado sugere que nos animais tratados com ouabaína há liberação de prostanóides vasoconstritores, observada apenas diante do bloqueio conjunto da via da COX e da via do NO. Este efeito parece contrabalancear o efeito vasodilatador causado pela liberação de NO e EDHF, conforme observado anteriormente, diante dos bloqueios únicos com L-NAME ou indometacina, inalterando a reatividade vascular à FE dos animais ouabaína em relação ao controle. Este mesmo efeito foi encontrado em artérias de resistência diante do tratamento por 15 dias com ouabaína, além de identificado aumento da expressão da COX-2 (Padilha *et al*., 2008). Entretanto, nossos achados contrapõem-se daqueles obtidos em artéria mesentérica superior de ratos tratados com ouabaína por cincos semanas, em que foi relatado perda da participação dos prostanóides vasoconstitores sobre a reatividade vascular à FE (Xavier *et al*., 2004b).

É sabido que o NO pode interferir na síntese de prostanóides e na expressão da enzima COX-2 (Salvemini *et al*., 1997; Mollace *et al*., 2005). Essa interação é observada em processos inflamatórios, em que o NO leva à expressão da COX-2, aumentando a formação de prostaglandinas pró-inflamatórias, induzindo a resposta inflamatória (Mollace *et al*., 2005). Também já é conhecido que a HA cursa com processo inflamatório vascular (Sanz-Rosa *et al.,* 2005). Diante do exposto, uma vez que o tratamento por 15 dias com ouabaína é acompanhado de hipertensão e aumento da liberação de NO, esses fatores, por sua vez, podem estar levando ao aumento na expressão da COX-2 e na liberação de prostanóides.

Contudo, a ouabaína não apenas modifica a síntese e liberação de fatores vasoativos, mas também pode interferir na atividade e expressão da bomba de sódio, o que irá depender do tipo de tratamento, agudo ou crônico, e do leito vascular analisado. Estudos demonstram, no entanto, que a hipertensão induzida pela ouabaína pode ser independente da sua capacidade de se ligar e inibir a Na^+K^+ATPase (Manunta *et al*., 2000). Sendo assim, foi investigado no presente estudo a influência do tratamento com doses nanomolares de ouabaína, por 15 dias, sobre a atividade da Na^+K^+ATPase em artéria de condutância de ratos.

Para avaliarmos a atividade funcional da Na^+K^+ATPase, indiretamente, utilizamos a técnica descrita por Webb e Bohr (1978) e modificada por Rossoni *et al*. (1999), de relaxamento induzido pelo potássio com intuito de verificar o efeito do tratamento com ouabaína por 15 dias na atividade da bomba de sódio. No presente estudo pôde ser observado, tanto nos animais controle quanto nos animais ouabaína, que o potássio adicionado à perfusão foi capaz de reduzir de maneira concentração-dependente a contração induzida pela FE no terço proximal da artéria caudal dos animais estudados. Nos animais tratados com ouabaína houve um aumento significativo do relaxamento ao potássio, em todas as concentrações (KCl: 1mM, 2mM, 4mM, 6mM), sugerindo um aumento na atividade da Na^+K^+ATPase nas artérias de condutância estudadas.

Corroborando nossos achados, foi observado aumento da atividade da bomba de sódio no leito vascular caudal e em miócitos ventriculares, porém, com tratamento de ouabaína na concentração de 1nM (Gao *et al*., 2002; Padilha *et al*., 2004). Todavia, trabalhos anteriores demonstraram que 10nM de ouabaína promove, agudamente, inibição parcial da atividade da Na^+K^+ATPase (Rossoni et al., 1999).

Ademais, o tratamento crônico com ouabaína por cinco semanas parece induzir alterações regionais na atividade e expressão da bomba de sódio. Já foi observado que, em aorta de ratos tratados com ouabaína ocorre aumento da expressão e atividade das isoformas α_1 e α_2, ao passo que em artéria mesentérica superior não foram demonstradas modificações nesses parâmetros, sendo que em artéria caudal, houve redução da expressão e atividade dessas isoformas diante do tratamento com ouabaína (Rossoni et al., 2002a). Outros estudos mais recentes relataram que em artérias de resistência, diante do tratamento com ouabaína por 15 dias, a atividade da Na^+K^+ATPase sensível à ouabaína não foi alterada (Padilha *et al.*, 2008).

Estudos prévios que relataram aumento da expressão e atividade das isoformas α_1 e α_2 da bomba de sódio, atribuíram este fato à redução da resposta vasoconstritora à FE encontrada em anéis de aorta (Rossoni *et al.*, 2002a).

Também deve ser considerada a possibilidade de alterações na síntese e liberação de fatores endoteliais vasoativos, induzidas pela ouabaína, serem capazes de interferir na atividade da bomba de sódio. Foi demonstrado por Gupta *et al.* (1994a; b; 1996) que o NO é um fator capaz de estimular a atividade da Na^+K^+ATPase, ao passo que outros pesquisadores demonstraram que a prostaglandina vasoconstritora, PGE2, formada através da via da COX, se comporta como um potente inibidor da bomba de sódio (Marín e Redondo, 1999).

Diante disso, no presente estudo, foi sugerido aumento da atividade da Na^+K^+ATPase, comcomitante ao aumento da liberação de NO e de prostanóides vasoconstritores, apesar de não se saber ao certo qual prostaglandina que está aumentada neste estudo. Sendo assim, não pode ser desconsiderado que a liberação desses fatores endoteliais possa estar influenciando a atividade da bomba de sódio.

Diante do exposto, os resultados obtidos nesse estudo, em artérias de condutância, demonstram que a administração por 15 dias de ouabaína em concentrações nanomolares, aproximadamente, é capaz de promover aumento da PAS, PAD e PAM, *in vivo*. Entretanto, não foi observada alterações na reatividade vascular, conforme outrora estudado em artérias de resistência por Padilha *et al.* (2008). No presente estudo, apesar de inalterada a reatividade, as artérias de

condutância dos animais tratados com ouabaína, *in vitro*, apresentaram maior liberação de NO, EDHF, de prostanóides vasoconstritores, além de aumentar a atividade da bomba de sódio. Diante disso, acredita-se que a liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores se contrabalanceiam entre si, o que resulta em reatividade vascular sem modificações. Os resultados obtidos neste estudo sugerem modificações da participação dos fatores endoteliais no início da hipertensão arterial induzida pelo tratamento com ouabaína.

6. CONCLUSÃO

É possível concluir, através do presente estudo, que o tratamento por 15 dias com doses nanomolares de ouabaína influenciou diversos mecanismos vasculares nas artérias de condutância analisadas, a partir do segmento proximal da artéria caudal.

O referido tratamento foi capaz de promover aumento da PAS, PAD e PAM, nos experimentos *in vivo*. Entretanto, diante das análises experimentais *in vitro*, não foi observada alterações na reatividade vascular. Apesar de inalterada a reatividade vascular à fenilefrina, as artérias de condutância dos animais tratados com ouabaína apresentaram maior liberação de NO e EDHF que pode estar sendo contrabalanceada pelo aumento de prostanóides vasoconstritores, o que justifica a não modificação da reatividade vascular. Além disso, nossos achados sugerem que o tratamento por 15 dias com ouabaína também influencia no aumento da atividade da $Na^{+}K^{+}$ATPase.

7. REFERÊNCIAS

Abe A; Karaki H. Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1992; 211: 305-311.

Abreu G; Futuro Neto HA; Cabral AM; Vasquez EC. Ouabain produces diverse excitatory effects on afferent barorreceptor nerve activity in SHR and WKY animals. *Clin Exp Hypertens.* 1998; 20: 85-94.

Achan V; Broadhead M; Malaki M; Whitley G; Leiper J; MacAllister R; Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1455-1459.

Altamirano J; Li Y; DeSantiago J; Piacentino V; Houser SR; Bers DM. The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires Na^+/Ca^{2+} exchanger function. *J Physiol.* 2006; 15: 575: 845-854.

Alvarez Y; Briones AM; Balfagon G; Alonso MJ; Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens*. 2005; 23: 767-777.

Angus JA; Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther*. 1989; 41: 303-351.

Arnon A; Hamlyn JM; Blaustein MP. Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^+. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: H679-H691.

Arribas S; Marín J; Ponte A; Balfagón G; Salaices M. Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endotelial beta adrenoceptors. Impairment by aging and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 271: 520-527.

Auch-Schwelk W; Vanhoutte PM. Endothelium-derived contracting factor release by serotonin in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 1991; 4: 769-772.

Bagrov AY; Kuznetsova EA; Fedorova OV. Endogenous digoxin-like factor in acute myocardial infarction. *J Int Med.* 1994; 235: 63-67.

Bakris GL; Mensah, GA. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin*. 2002; 20: 195-206.

Barker LA; Rossoni LV; Vassallo DV. Acute pressor actions of ouabain do not enhance the actions of phenylephrine or norepinephrine in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 37: 339-348.

Bauer N; Muller-Ehmsen J; Kramer U; Hambarchian N; Zobel C; Schwinger RH; Neu H; Kirch U; Grunbaum EG; Schoner W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 2005; 45: 1024-1028.

Bealer SL; Haywood JR; Gruber KA; Buckalew VMJr; Fink GD; Brody MJ; Johnson AK. Preoptic-hypotalamic periventricular lesions reduce natriuresis to volume expansion. *Am J Physiol.* 1983; 244: R51-R57.

Béguin P; Wang X; Firsov D; Puoti A. Claeys D; Horisberger JD; Geering K. The subunit is a specific component of the Na^+K^+ ATPase and modulates its transport function. *The EMBO Journal*. 1997; 16: 4250-4260.

Blanco G; Mercer RW, Isoenzymes of the Na^+K^+ ATPase: heterogeneit in structure, diversity in funcion. *Am J Physiol*. 1998; 275: F633-F650.

Blaustein MP. Sodium íons, calcium íons, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am J Physiol*. 1977; 232: C165-C173.

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

Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracelular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol*. 1993; 264: C1367-C1387.

Blaustein MP; Juhaszova M; Golovina VA. The celular mechanism of action of cardiotonic steroids: a new hypothesis. *Clin Exp Hypertens.* 1998; 20: 691-703.

Borin ML; Tribe RM; Blaustein MP. Increased intracellular Na^+ from SR in vascular smoth muscle cells. *Am J Physiol.* 1994; 266: C311-C317

Bossuyt J; Ai X; Moorman JR; Pogwiz SM; Bers DM. Expression and phosphorylation of the Na-pump regulatory subunit phospholemman in heart failure. *Circ Res*. 2005; 97: 558-565.

Brandes RP; Schmitz-Winnenthal FH; Félétou M; Godecke A; Hunag PL; Vanhoutte PM; Fleming I; Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 9747-9752.

Briones AM; Alonso MJ; Marín J; Salaices M. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1999; 126: 111-120.

Briones AM; Alonso MJ; Hernanz R; Miguel M; Salaices M. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 39: 378-388.

Boger RH; Bode-Boger SM; Szuba A; Tsao OS; Chan JR; Tangphao O; Blaschke TF; Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998; 98: 1842-1847.

Bohr DF; Webb RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension*. Am J Med*. 1984; 77 (suppl. 4A): 3-16.

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

Boulanger BB; Lilly MP; Hamylin JM; Laredo J; Shurtleff D; Gann DS. Ouabain is secreted by the adrenal gland in awake dogs. *Am J Physiol.* 1993; 264: E413-E419.

Buckalew VMJr; Martinez FJ; Green WE. The effects of dialysates and ultra filtrates of plasma of saline loaded dogs on toad bladder sodium transport. *J Clin Invest.* 1970; 49: 926-935.

Buckalew VMJr. Summary of a symposium on natriuretic and digitalis-like factors. *Clin Exp Hypertens.* 1998; 20: 481-488.

Bukoski RD; Bergman C; Gairard A; Stoclet JC. Intracellular Ca^{2+} and force determined simultaneously in isolated resistence arteries. *Am J Physiol.* 1989; 257: H1728-H1735.

Carvalho MH; Fortes ZB; Nigro D; Oliveira MA; Scivolleto R. The role of thromboxane A_2 in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one-clip hypertension. *Endothelium.* 1997; 5: 167-178.

Cattell M; Gold H. Influence of digitalis glycosides on force of contraction of mammalian cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1938; 62: 116-125.

Chang HR; Lee RP; Wu CY; Chen HI; Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparision between rats with normotension and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29: 275-280,

Chen S; Yuan C; Clough D; Schooley J; Haddy FJ; Pamnani MB. Role of digitalis-like substance in the hypertension of streptozotocin-induced diabetes in reduced renal mass rats. *Am J Hypertens.* 1993; 6: 397-406.

Coleman, RA; Smith WL; Narumiya S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994; 46: 205-229.

David-Dufilho M; Devynck MA; Beugras JP; Meyer P. Quantitative changes in cardiac Na+,K+ adenosine triphosphatase of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984; 6: 273-280.

Dayoub H; Achan V; Adimoolam S; Jacobi J; Stuehlinger MC; Wang BY; Tsao OS; Kimoto M; Vallance P; Patterson AJ; Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation*. 2003; 108: 3042-3047.

da Cunha V; Rossoni LV; Oliveira PA; Poton S; Pretti SC; Vassallo DV; Stefanon I. Cyclooxygenase inhibitor reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rat. *Clin Exp Hypertens.* 2000; 22: 203-215.

de Angelis C; Haupert GTJr. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na^+K^+ ATPase from midbrain and adrenal. *Am J Physiol.* 1998; 274: F182-F188.

de Wardener HE; Mills IH; Clapham WF; Hayter CJ. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis wich follows administration of intravenous saline in dog. *Clin Sci.* 1961; 21: 249-258.

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

de Wardener HE; Millett J; Holland S; MacGregor GA; Alaghband-Zadeh J. Ouabainlike Na^+K^+ATPase inhibitor in the plasma of normotensive and hypertensive humans and rats. *Hypertension.* 1987; 10 (suppl I): I52-I56.

de Wit C; Bolz SS; Pohl U. Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. *Kardiology,* 2000; 89 (suppl 9): IX/113-IX/116.

Delpy E; Coste H; Gouville AC. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodieterase 3. *Br J Pharmacol.* 1996; 119: 471-478.

Diederich D; Yang ZH; Buhler FR; Lüscher TF. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pahtway. *Am J Physiol*. 1990; 258: H445-H451.

Dohi Y; Thiel MA; Buhler FR; Lüscher TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries: effect of age and hypertension. *Hypertension*. 1990; 16: 170-179.

Dohi Y; Kojima M; Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 28: 732-737.

Doris P. Regulation of Na^+K^+ATPase by endogenous ouabain-like materials. *Soc Exp Biol Med.* 1994; 205: 202-212.

Dostanic I; Paul RJ; Lorenz JN; Theriault S; Van Huysse JW; Lingrel JB. The alpha2-isoform of Na+K+ATPase mediates ouabain induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H477-H485.

D'Urso G; Frascarelli S; Balzan S; Zucchi R; Montali U. Production of ouabain-like factor in normal and ischemic rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43: 657-662.

Edwards G; Dora KA; Gardener MJ; Garland CJ; Weston A. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998; 96: 269-272.

Félétou M; Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988; 93: 515-524.

Félétou, M; Vanhoutte, PM. The alternative: EDHF. *J Mol Cell Cardiol,* 1999; 31: 15-22.

Félétou M; Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol*. 2006; 291: H985-H1002.

Fergusson DW; Berg WJ; Sanders JS; Roach PJ; Kempf JS; Kienzle MG. Sympathoinhibitory responses to digitalis glycosides in heart failure patients. Direct envidence from sympathetic neural recordings. *Circulation.* 1989; 80: 65-77.

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. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 258: 83-94.

Ferrer M; Encabo A; Conde MV; Marín J; Balfagón G. Heterogeneity of endothelium-dependent mechanisms in different arteries. *J Vasc Res.* 1995; 32: 339-346.

Fleming WW. The eletrogenic Na^+K^+ pump in smooth muscle: physiologic and pharmacologic significance. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1980; 20: 129-149.

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

França AS; Rossoni LV; Amaral SMC; Vassallo DV. Reactivity of the isolated perfused rat tail vascular bed. *Br J Med Biol Res*. 1997; 30: 891-895.

Freis ED. Age, race and sex and other indices of risk in hypertension. *Am J Med*. 1973; 55: 275-280.

Frolich JC; Forstermann U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistence. *Adv Prost Thromb Leuk Res.* 1989; 19: 211-215.

Furchgott RF. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. *Circul Res.* 1983; 53: 557-572.

Furchgott RF; Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.

Garg UC; Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1774-1777.

Golovina V; Blaustein MP. Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science.* 1997; 275: 1643-1648.

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

Goto A; Yamada K; Ishii M; Sugimoto T. Digitalis-like activity in human plasma: relation to blood pressure and sodium balance. *Am J Med*. 1990; 89: 420-426.

Goto A; Yamada K; Yagi N; Yoshioka M; Sugumoto T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. *Pharmacol Rev.* 1992; 44: 377-399.

Goto A; Yamada K; Nagoshi H; Terano Y; Omata M. Stress-induced elevation of ouabainlike compound in rat plasma and adrenal. *Hypertension.* 1995; 26: 1173-1176.

Griendling KK; FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108:1912-1916.

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

Gryglewski RJ; Palmer RMJ; Moncada J. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxating factor. *Nature*. 1986; 320: 454-456.

Gryglewski RJ; Botting RM; Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension.* 1988; 12: 530-548.

Gupta S; McArthur C; Grady C; Ruderman NB. Role of endothelium-derivad nitric oxide in stimulation of Na^+K^+ATPase activity by endothelin in rabbit aorta. *Am J Physiol.* 1994a; 266 (35): H577-H582.

Gupta, S; McArthur, C; Grady, C; Ruderman, NB. Stimulation of vascular Na^+-K^+-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol.* 1994b; 266 (35): H2146-H2151.

Gupta S; Phipps K; Ruderman NB. Differential stimulation of Na^+ pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *Am J Physiol.* 1996; 270 (39): H1287-H1293.

Guthrie Jr GP. Effects of digoxin on responsiveness to pressor actions of angiotensin and norepinephrine in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 58: 76-80.

Haddy FJ; Overbeck HW. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. *Life Science.* 1976; 19: 935-947.

Haddy F; Pamnani M; Clough D. The sodium-potassium pump in volume expanded hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1978; 1 (3): 295-336.

Halushka, PV; Mais, DE; Mayeux, PR; Morinelli, TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1989; 29: 213-239.

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

Hamlyn JM; Blaustein MP; Bova S; DuCharme DW; Mandel F; Mathews WR; Ludens JH. Identification and characterization of an ouabain-like compound from human plasma. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1991; 88: 6259-6263.

Hamlyn JM; Hamilton BP; Manuta P. Endogenous ouabain, sodiun balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *J Hypertens.* 1996; 14: 151-171.

Harrap SB. Hypertension: genes versus enviroment. *Lancet*. 1994; 344 (8916): 169-171.

Hamlyn JM; Hamilton BP; Manuta P. Endogenous ouabain, sodiun balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *J Hypertens.* 1996; 14: 151-171.

Harris D; Martin PEM; Evans WH; Kendal DA; Griffith TM; Randall MD. Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanims of K^+-relaxation. *Eur J Pharmacol.* 2000; 402: 119-128.

Hasegawa T; Masugi F; Ogihara T; Kumuhara Y. Increase in plasma ouabainlike inhibitor of Na^+K^+ATPase with high sodium intake in pacients with essencial hypertension. *J Clin Hypertens.* 1987; 3: 419-429.

Hawpert GTJr; Sancho JM. Sodium transport inhibitor from bovine hypotalamus. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1979; 76: 4658-4660.

Hecker M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor- fact or fiction. *News Physiol Sci.* 2000; 15: 1-5.

Hednet T; Sun X. Measures of endothelial function as a endpoint in hypertension? *Blood Pressure Supp,* 1997; 2: 58-66.

Horisberger JD. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology*. 2004; 19: 377-387.

Horowitz A; Menice CB; Laporte R; Morgan RG. Mechanisms os smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. 1996; 76: 967-1003.

Huang BS; Harmsen E; Yu H; Leenen FHH. Brain ouabain-like activity and the sympathoexcitatory and pressor effects of central sodium in rats. *Circ Res.* 1992; 71: 1059-1066.

Huang BS; Leenen FHH. Brain ouabain mediates the sympathoexcitatory and hypertensive effects of high sodium intake in Dahl salt-sensitive rats. *Circ Res.* 1994; 74: 586-595.

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 ouabain and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension,* 1996; 28: 1005-1012.

Huang BS; Veerasingham SJ; Leenen FHH. Brain ouabain, ang II, and sympathoexcitation by chronic central sodium loading in rats. *Am J Physiol.* 1998; 274: H1269-H1276.

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

Integan, HD; Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000; 36: 312-318.

Juhaszova M; Shimizu H; Borin ML; Yip RK; Santiago EM; Lindenmayer GE; Blaustein MP. Localization of the Na^+/Ca^{2+} exchanger in vascular smooth muscle, and in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 779: 318-335.

Kielstein JT; Impraim B; Simmel S; Bode-Boger SM; Tsikas D; Frolich JC; Hoeper MM; Haller H; Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*. 2004; 109: 172-177.

Kifor I; Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracelular synthesis and secretion of angiotensin. *Circul Res,* 1987; 60: 422-428.

Kimura K; Manunta P; Hamilton BP; Hamlyn JM. Different effects of in vivo ouabain and digoxin on renal artery funciotn and blood pressure in the rat. *Hypertens Res*. 2000; 23 (suppl): 67-76.

Kojda G; Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pahtophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999; 43: 562-571.

Kojima I. Circulating digitalis-like substance is increased in DOCA-salt hypertension. *Bioch Bioph Res Com.* 1984; 122: 129-136.

Konishi M; SU C. Role of the 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? *Em Proceedings of the Fourth International Congress on Nephrology*. New York: Karger, 1969; 373.

Kubes P; Suzuki M; Granger DN. Nitric oxide: na endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 4651-4655.

Kukovetz WR; Holtzmann S; Wurm A; Pöch G. Prostacyclin increases cAMP in porcine coronary. *J Cyclic Nucl Res.* 1979; 5: 469-476.

Kukreja RC; Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res*. 1992; 26: 644-655.

Lang MG; Noll G; Lüscher TF. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: modulation by endothelial factors. *Am J Physiol*. 1995; 269: H837-H844.

Laredo J; Hamilton BP; Hamlyn JM. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology.* 1994; 135: 794-797.

Laredo J; Ramilton BP; Hamlyn JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zone glomerulosa and zona faciculata. *Biochem Biophys Res Comm*. 1995 212: 487-493.

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: 401-407.

Lee TJ; Shirasaki Y; Nickols GA. Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. *Blood Vessels*. 1987; 24: 132-136.

Leenen FHH; Harmsen E; Yu H. Dietary sodium and central vs peripheral ouabain-like activity in Dahl salt-sensitive vs salt-resistant rats. *Am J Physiol.* 1994; 267: H1916-H1920.

Leite R; Salgado COM. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. *Hypertension*. 1992; 19: 575-581.

Li M; Martin A; Wen C; Turner SW; Lewis LK; Whitworth JA. Long-term ouabain administration does not alter blood pressure in conscious Sprague-Dawley rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995; 22: 919-923.

Lin L; Nasjletti A. Prostanoid-mediated vascular contraction in normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1992; 220: 49-53.

Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther.* 1989; 41: 479-502.

Lingrel JB. Na^+K^+ ATPase: isoform structure, funcion, and expression. *J Bioenerg Biomembr.* 1992; 24: 263-270.

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

Lund-Johansen P. Haemodynamics en early essential hypertension-still an area of controversy. *J Hypertens*. 1983; 1: 209-213.

Lüscher TF; Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986; 5: 5153-5155.

Lüscher TF; Raij L; Vanhoutte PM. Effect of hypertension and its reversal on endothelium-dependent relaxations in the aorta. *J Hypertens*. 1987; 5: 5153-5155.

Lüscher TF; Aarhus LL; Vanhoutte PM. Indometacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 1990; 3: 55-58.

Maeso R; Navarro-Cid J; Rodrigo E; Ruilope LM; Cachofeiro V; Lahera V. Effects of antihypertensive therapy on factors mediating endothelium-dependent relaxations in rats trated chronically with L-NAME. *J Hypertens*. 1999; 17: 221-227.

Magargal WW; Overbeck HW. Effect of hypertensive rat plasma on íon transport of cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1986; 251 (5Pt): H984-H990.

Mason DT; Braunwald E. Effects of ouabain on forearm vascular resistance and venous tone in normal subjects and in patients in heart failure. *J Clin Invest.* 1964; 43(3): 532-542.

Mantelli L; Amerini S; Ledda F. Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995; 25: 595-602.

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

Manunta P; Stella P; Rivera R; Ciurlino D; Cusi D; Ferrandi M; Hamlyn JM; Bianchi G. Left ventricular mass, stroke volume and ouabain-like factor in essential hypertension. *Hypertension.* 1999; 34: 450-456.

Manunta P; Masssaggio E; Ballabeni C; Sciarrone MT; Lanzani C; Ferrandi M; Hamlyn JM; Cusi D; Galletti F; Bianchi G. Salt sensitivity study group of htltalian Society of Hypertension. Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium baance in essential hypertension. *Hypertension*. 2001; 38: 198-203.

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

Marín J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol*. 1993; 13: 127-176.

Marín J; Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 1997; 75: 111-134.

Marín J; Redondo J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacol Ther*. 1999; 84: 249-271.

Martinka E; Galajada P; Ochodnicky M; Lichardus B; Dtraka S; Mokan M. Endogenous digoxin-like immunoactivity and diabetes mellitus: facts and hypotheses. *Medical Hypotheses.* 1997; 49: 271-275.

Mathews WR; DuCharme DW; Hamlyn JM; Harris DW; Mandel F; Clark MA; Ludens JH. Mass spectral characterization of an endogenous digitalislike factor from human plasma. *Hypertension.* 1991; 17: 930-935.

Miller JZ; Grim CE; Conneally PM; Weinberg MH. Association of blood groups with essential and secondary hypertension. *Hypertension.* 1979; 1: 493-497.

Mollace V; Muscoli C; Masini E; Cuzzocrea S; Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. Pharmacol Rev. 2005; 57: 217-252.

Moncada S; Herman AG; Higgs EA; Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI_2) by layers of the arterial wall: an explanation for the antithronbotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res*. 1977; 11: 323-344.

Moncada, S; Vane, JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A_2 and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1979; 30: 293-331.

Moncada S; Palmer RMJ; Higges EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43: 109-142.

Moreau P; Takase H; Küng CF; Shaw S; Lüscher TF. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension.* 1997; 29: 763-769.

Morgan K; Lewis MD; Spurlock G; Collins PA; Foord SM; Southgate K; Scanlon MF; Mir MA. Characterization and partial purification of the sodium-potassium ATPase inhibitor released from cultured rat hypotalamic cells. *J Biol Chem.* 1985; 260: 13595-13600.

Mulvany MJ. Effect of eletrolyte transport on the response of arteriolar smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 19: 308-313.

Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002; 17: 105-109.

Mulvany MJ. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. *J Vasc Res*. 2003; 40: 558-560.

Nakagawa M; Takamatsu H; Toyoda T; Sawada S; Tsuji H; Ijichi H. Effect of inhibition of Na^+K^+ATPase on the prostacyclin generation of cultured human vascular endothelial cells. *Life Science.* 1987; 40: 351-357.

Naruse K; Narause M; Tanabe A; Yoshimoto T; Watanabe Y; Kurimoto F; Horiba N; Tamura M; Inagami T; Demura H. Does plasma imunorreactive ouabain originate in adrenal gland? *Hypertension.* 1994, 23 (suppl I): I102-I105.

Nava E; Noll G; Lüscher TF. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneously hypertension. *Circulation*. 1995; 91: 2310-2313.

Nava E; Farré AL; Moreno C; Casado S; Moreau P; Consentino F; Lüscher TF. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 1998; 16: 609-615.

Quilley J; Fulton D; Mc Giff JC. Hyperpolarizing factor. *Biochem Pharmacol*. 1997; 54: 1059-1070.

Padilha AS; Rossoni LV; Xavier FE; Vassallo DV. Ouabain at nanomolar concentration promotes the synthesis and release from angiotensin II from the endothelium of the tail vascular bed of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 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. *Eur J Pharmacol*. 2008; 600: 110-116.

Palmer RMJ; Ferrige AG; Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-526.

Pamnani M; Huot S; Steffen R; Haddy FJ. Evidence for a humoral Na^+ transport inhibiting factor(s) in one-Kidney, on wrapped hypertensive dog. *The Physiologist.* 1980; 91: 3-23.

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

Pamnani, MB; Bryant, HJ; Haddy, FJ. Humoral sodium transport inhibitor in acute volume expansion and low renin hypertension. *Hypertension,* 1987; 10(suppl I): I78-I83.

Pamnani M; Chen S; Yuan C; Haddy FJ. Chronic Blood pressure effects of bufalin, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in rats. *Hypertension.* 1994; 23 (suppl I): I106-I109.

Panza JA; Quyyumi AA; Brush JE Jr; Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essencial hypertension. *N Engl J Med*. 1990; 323: 22-27.

Pereira CA; Kriger JE. Dos fatores de risco clássicos ao perfil de risco individualizado. *Hipertensão*. 2005; 8: 131-137.

Perry IJ; Whincup PH; Shapter AG. Environmental factors in the development of essential hypertension. *Br Med Bull*. 1994; 50: 246-259.

Pidgeon GB; Richards AM; Nicholis MG; Charles CJ; Rademaker MT; lynn K L; Bailey RR; Lewis LK; Yandle TG. Chronic ouabain infusion does not cause hypertension in sheep. *Am J Physiol.* 1996; 270: E386-E392.

Ponte A; Marín J; Arribas S; Gonzáles S; Barrús M T; Salaices M; Sánches-Ferrer CF. Endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in aortas of normotensive Wystar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* 1996a; 33: 164-174.

Ponte A; Sánchez-Ferrer CF; Hernández C; Alonso M J; Marín J. Effect of ageing and hypertension on endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodiun pump activity in the rat aorta. *J Hypertens.* 1996b; 14: 705-711.

Poston L; Sewell RB; Wilkison SP; Richardson PJ; Williams R; Clarkson EM; MacGregor GA; de Wardener HE. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essencial hypertension. *Br Med J.* 1981; 282: 847-849.

Quilley J; McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21: 121-124.

Rapoport RM; Willians SP. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*. 1996; 28: 64-75.

Redondo J; Peiró C; Rodríguez-Mañas L; Salaices M; Marín J; Sánchez-Ferrer CF. Endothelial stimulation of sodium pump in cultured vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1995; 26: 177-185.

Redondo J; Rodríguez-Martinez MA; Alonso MJ; Salaices M; Balfagón G; Marín J. Endothelium stimulates the vascular smooth muscle cell Na^+/K^+ pump of normotensive and hypertensive rats by a protein kinase C pathway. *J Hypertens.* 1996; 14: 1301-1307.

Rizzoni D; Porteri E; Castelano M; Bettoni G; Muiesan ML; Muiesan P; Giulini SM; Agabiti-Rosei E. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*. 1996; 28: 785-790.

Rodríguez-Mañas L; Pareja A; Sanchez-Ferrer CF; Casado MA; Salaices M; Marín J. Endothelial role in ouabain-induced contraction in guinea pig carotid arteries. *Hypertension.* 1992; 20: 674-681.

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: 10-17.

Rose AM; Valdes RJ. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem*. 1994; 40: 1674-1685.

Roos Jr J; Waldhausen JA; Braunwald E. Direct effects on pheripheral vascular resistence. *J Clin Invest.* 1960; 39: 930-936.

Rossi M; Taddei S; Fabbri A; Tintori G; Credidio L; Virdis A; Ghiadoni L; Salvetti A; Giusti C. Cutaneous vasodilation to acetylcholine in patients with essencial hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997; 29: 406-411.

Rossi GP; Manunta P; Hamlyn JM; Pavan E; Toni RD; Semplicini A; Pessina A. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essencial hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels. *J Hypertens.* 1995; 13: 1181-1191.

Rossoni LV; Cunha V; França A; Vassallo DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34: 887-892.

Rossoni LV; Pinto VD; Vassallo DV. Effects of small doses of ouabain on arterial blood pressure of anesthetized hypertensive and normotensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34: 1065-1077.

Rossoni LV; Salaices M; Marín J; Vassallo DV; Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na^+K^+ATPase in ouabain induced hypertension. *Br J Pharmacol*. 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. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002b; 283: H2110-H2118.

Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J Cardiovasc Pharmacol*.1993; 22 (suppl. 4): 1-14.

Rubanyi GM; Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscl*e. Am J Physiol.* 1986; 250: H815-H821.

Ruiz-Marcos FM; Ortíz MC; Fortepiani LA; Nadal FJA; Atucha NM; García-Estañ. Mechanisms of the increased pressor response to vasopressors in the mesenteric bed of nitric oxide-deficient hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2001; 412: 273-279.

Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53: 576-582.

Sanchez-Ferrer CF; Fernandez-Alfonso MS; Ponte A; Casado MA; González R; Rodríguez-Mañas L; Pareja A; Marín J. Endothelial modulation of the ouabain-induced contraction in human placental vessels. *Hypertension.* 1992; 71: 943-950.

Sanz-Rosa D; Oubina MP; Cediel E; de Las Heras N; Vegazo O; Jimenez J; Lahera V; Cachofeiro V. Effect of AT1 receptor antagonismo n vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol Physiol*. 2005; 288: H111-H115.

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

Scavone C; Glezer I; Munhoz CD; Bernardes CS; Markus RP. Influence of age on nitric oxide modulatory action on Na^+K^+ ATPase activity through cyclic GMP pathway in proximal rat trachea. *Eur J Pharmacol.* 2000; 388: 1-7.

Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of íon transport. *Eur J Biochem*. 2002; 269: 2424-2433.

Schiffrin EL. The endothelium of resistance arteries: physiology and role in hypertension. *Prostag Leuk Ess Fatty Acids*. 1996; 54: 17-25.

Schoner W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2000; 108: 449-454.

Semplicini A; Buzzaccarini F; Ceolotto G; Marzola M; Mozzato M G; Giusto M; Campagnolo M; Simonella C; Pessina AC. Effects of canrenoate on red cell sodium transport and calf flow in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1993; 6: 295-301.

Shimokawa H; Flavahan NA; Lorenz RR; Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol.* 1988; 95: 1197-1203.

Shiota N; Miyazaki M; Okunishi H. Increase of angiotensin converting enzyme gene expression in the hypertensive aorta. Hypertension. 1992; 20: 168-174.

Skou JC; Esmann, M. The Na,K ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 1992; 24: 249-261.

Songu-Mize E; Bealer SL; Caldwell W. Effect of AV3V lesions on development of DOCA-salt hypertension and vascular Na^+ pump activity. *Hypertension.* 1982; 4: 575-580.

Songu-Mize E; Bealer SL; Calwell RW. Phasic vascular sodium pump changes in deoxycorticosterone-hypertensive rats. *Circ Res.* 1984; 55: 304-308.

Songu-Mize E; Bealer SL; Caldwell RW. Effect of DOCA-salt treatment duration and anteroventral third ventricle lesions on a plasma-borne sodium pump inhibitor in rats. *J Hypertens.* 1987; 5: 461-467.

Songu-Mize E; Sanford DK. Variations in vascular sodium pump site density during the course of doc-salt hypertension in rats. *Pharmacology,* 1990; 9: 3-27-32.

Songu-Mize, E. Vascular sodium pump activity kinetics in early and advanced stages of deoxycorticosterone-salt hypertension in rats. *Life Sciences,* 1991; 49: 2045-2052.

Songu-Mize E; Vassallo DV; Rashed SM; Varner KJ. Ouabain amplifies contractile responses to phenylephine in rat tail arteries in hypertension. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1995; 6: 309-319.

Souza FM; Padilha AS; Stefanon I; Vassallo DV. Differences in functional and structural properties of segments of rat tail artery. Braz J Med Biol Res. 2008; 41: 416-423.

Stekhoven FS; Bonting S. Transport adenosine triphosphatases: properties and functions. *Physiol Rev*. 1981; 61: 1-76.

Suzuki H; Swei A; Zweifach BW; Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 1995; 25: 1083-1089.

Tabernero A; Giraldo J; Vila E. Effect of N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) on functional and biochemical α_1-adrenoceptor-mediated responses in rat blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1996; 117: 757-763.

Tabernero A; Giraldo J; Vila E. Modelling the changes due to the endothelium and hypertension in the α-adrenoreceptor-mediated responses of rat aorta. *J Auton Pharmacol.* 1999; 19: 219-228.

Taddei S; Virdis A; Mattei P; Salvetti A. Vasodilatation to acetylchline in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 1993; 21: 929-933.

Taddei S; Virdis A; Ghiadoni L; Magagna A; Salvetti A. A ciclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essencial hypertension. *Hypertension*. 1997; 20: 274-279.

Taddei S; Ghiadoni L; Virdis A; Buralli S; Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impared nitric oxide availability in essential hypertensive rats. *Circulation.* 1999; 100: 1400-1405.

Taylor SG; Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci.* 1988; 9: 272-274.

Toda N. Mechanism of ouabain-induced arterial muscle contraction. *Am J Physiol.* 1980; 239; H404-H411.

Tsuda K; Tsuda S; Shima H; Masuyama Y. Facilitatory effects of ouabain and digitalis-like substance on adrenergic transmission in hypertension. *Am J Hypertens.* 1989; 2: 465-467.

Vanhoutte PM; Lorenz RR. Na^+K^+ ATPase inhibitors and the adrenergic neuroeffector interaction in blood vessel wall. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984; 6 (suppl 1): S88-S94.

Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation.* 1993; 87 (suppl V): V9-V17.

Vargas F; Osuma A; Fernandez-Rivas A. Vascular reactivity and flow-pressure curve in isolated kidneys from rats with N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension. *J Hypertens.* 1996; 14: 373-379.

Vassalle M. Contribuition of the Na^+K^+-pump to the membrane potential. *Experientia.* 1987; 43: 1135-1140.

Vassallo DV; Songu- Mize E; Rossoni LV; Amaral SMC. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30: 545-552.

Vassallo PF; Stefanon I; Rossoni LV; França AS; Vassallo DV. Small doses of canrenone block the effects of ouabain on the mechanical activity of the heart and vessels of the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32: 679-685.

Wasserstrom JA; Aistrup GL. Digitalis: new actions for an old drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H1781-H1793.

Webb RC; Bhor DF. Potassium relaxation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*. 1979; 16: 71-79.

Weiss DN; Podberesky DJ; Heidrich J; Blaustain MP. Nanomolar ouabain augments caffeine-evoked contractions in rats arteries. *Am J Physiol.* 1994; 265: C1443-C1448.

Winquist RJ; Webb RC; Bohr DF. Vascular smooth muscle in hypertension. Fed Proc. 1982; 41: 2387-2393.

Woolfson, RG; Poston, L. Effect of ouabain on endothelium-dependent relaxation of human resistence arteries. *Hypertension,* 1991; 17: 619-625.

Wray S; Eisner DA; Allen DG. Two hundred years of the floxglove. *Medical History.* 1985; 5: 132-150.

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. *J Hypertens*. 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 α-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*. 2004b; 143: 215-225.

Xie J; Wang Y; Summer WR; Grenberg SS. Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid arteries. *Am J Med Sci.* 1993; 305: 157-162.

Yamada K; Goto A; Hui C; Sugimoto T. Endogenous digitalis-like factor as a stimulator of endothelin secretion from endothelial cells. *Bioch Bioph Res.* 1990; 172: 178-183.

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 (part 1): 94-98.

Yanagisawa M; Kurihara S; Kimura S; Tomobe Y; Kobayashi M; Mitsui Y; Yazaki Y; Goto K; Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature.* 1988; 322: 411-415.

Yasujima M; Abe K; Tanno M; Kohzuki M; Kasai K; Sato M; Omata K; Takeuchi K; Yoshinaga K; Masugi F; Ogihara T. Effects of ouabain on blood pressure regulation in rats. *J Hypertens.* 1986; 4: 597-601.

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

Zerrouk A; Champeroux P; Safar M; Brisac AM. Role of endothelium in the endothelin-1 mediated potentiation of the norepinephrine response in the aorta of hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997; 15: 1101-1111.

Zhang X; Patel A; Horibe H; Wu Z; Barzi F; Rodgers A; MacMahon S; Woodward M. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. *International Journal of Epidemiology*. 2003; 32: 563-572.

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

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo