



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EFEITOS DE ESTERÓIDES CARDIOTÔNICOS ENDÓGENOS NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS

GRACIANA TEIXEIRA COSTA

FORTALEZA – CE

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GRACIANA TEIXEIRA COSTA

EFEITOS DE ESTERÓIDES CARDIOTÔNICOS ENDÓGENOS NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento (UECE)

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Ferreira Santos (UECE)

Colaboradores: Manassés Claudino Fonteles (Mackenzie/UECE)

Krishnamurti de Moraes Carvalho (UECE)

Bruno Andrade Cardí (UECE)

FORTALEZA – CE

Outubro/2009

C843e Costa, Graciana Teixeira
Efeitos de esteróides cardiotônicos endógenos na função
renal de ratos/ Graciana Teixeira Costa.- Fortaleza, 2009.
124p.:il.

Orientador: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas)-
Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

1.Fisiologia humana 2.Bufodienolídeos 3.Hemodinâmica renal
4.Perfusão Renal 5.Src Kinase I. Universidade Estadual do Ceará II.
Centro de Ciências da Saúde

CDD:574.1

Universidade Estadual do Ceará

Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas

Título do Trabalho: Efeitos de esteróides cardiotônicos endógenos na função renal de ratos

Autora: Graciana Teixeira Costa

Defesa em: 02/10/2009

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 9,5

Banca Examinadora



Pro. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Orientador

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Examinador

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Examinador

"A ignorância afirma ou nega veementemente; a ciência duvida".

Voltaire

À minha mãe e minha avó, Maria das Graças e Margarida, bases da minha vida, duas pessoas extraordinárias nas quais me dão o suporte necessário para viver. Esta é mais uma oportunidade de dizer o quanto eu as amo e de agradecê-las por tudo, principalmente por me ensinar a ter fé em Deus e perseverança.

Em especial, à minha irmã, Gracivany e meu sobrinho, Arthur, que ao nascer trouxe uma nova luz e esperança para a minha vida.

Ao meu namorado Aldoney, que mesmo diante das várias crises com conseqüentes dores ocorridas durante a minha vinda para Fortaleza também soube me ajudar de várias formas.

À minha tia Inês (in memorium), que sempre torceu por mim e sei que de lá do paraíso tem sorrido e chorado junto comigo.

E com carinho à Zoraide, uma pessoa que soube representar o papel de mãe e amiga em um momento crucial da minha vida. Pode ter certeza que você é a minha referência de ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, presença viva e essência da vida, por dar-me força, saúde e coragem para percorrer esta longa caminhada.

Ao Prof. **Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento** pelos ensinamentos, conselhos, paciência, amizade, respeito e principalmente pela enorme dedicação na orientação deste trabalho.

À Profa. **Dra. Cláudia Ferreira Santos**, por transferir, em muitos momentos, parte de sua grande experiência profissional, contribuindo assim para a realização deste trabalho, por sua amizade, apoio e estímulo sempre presentes.

Ao Prof. **Dr. Manassés Claudino Fonteles**, pela eficiente orientação e auxílio inestimável no desenvolvimento desta dissertação.

À Prof. **Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração na realização das dosagens dos experimentos.

À Prof. **Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão**, da Universidade Federal de Pernambuco, pela colaboração na realização dos trabalhos experimentais.

À Prof. **Dra. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima** da Universidade Estadual do Ceará, pela colaboração na correção final da dissertação.

Aos amigos, da Pós-Graduação, **Ana Carolina, Albertina, Carlos, Rebouças, Raphael, Phablo, Pedro, Raquel, Sara, Milena, Leidiane, Luis**, pela adorável companhia nas horas de estudo dentro e fora de sala de aula e das confraternizações realizadas frequentemente para mais um momento de saudade e brincadeiras.

Aos grandes amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, **Denise, Pedro, Vanessa, Priscilla, Norberto, Victor, Hilana, Patrícia, Rafael e Karina** pela agradável convivência durante esses anos e pela enorme assistência e dedicação conjunta em prol desta conquista.

Aos amigos, **Rafael, Roberta Jeane e Daniel** da Universidade Federal do Ceará que me deram apoio intelectual durante os procedimentos experimentais necessários para este trabalho.

Aos meus amigos **Keila, Márcio Henrique e Kiko** por terem sido pessoas companheiras e féis que sempre me apoiaram e me deram força para que eu atingisse mais este degrau em minha vida.

Aos meus alunos do Curso de Nutrição da Universidade Federal do Amazonas que compreenderam a minha ausência e colaboraram nas disciplinas ministradas por mim, flexibilizando os horários.

À minha aluna e bolsista **Mayline** do Curso de Nutrição, que mesmo distante, continuou a desenvolver os trabalhos científicos, sempre publicando nos eventos.

Ao meu primo **Alexandre** por ter me ajudado com problemas do dia-a-dia sempre que estou em Fortaleza.

*Ao **Padre Hélio**, pela admiração e confiança que sempre tem depositado na minha vida acadêmica e profissional, além de está sempre em oração por mim.*

*À **Ecila**, secretária da Pós-Graduação, e a todos os funcionários do Instituto Superior de Ciências Biomédicas.*

À todos aqueles, que ,de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

*À **FAPEAM** pelo suporte financeiro.*

Obrigada!!!!!!

RESUMO

EFEITOS DE ESTERÓIDES CARDIOTÔNICOS ENDÓGENOS NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS

Graciana Teixeira Costa. Orientador: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento.

Bufodienolídeos são cardiotônicos esteróides estruturalmente relacionados aos cardenolídeos usualmente utilizados na clínica como, por exemplo, a digoxina. Alguns bufodienolídeos podem ser detectados no plasma e urina de mamíferos e sua significância pato/fisiológica tem sido alvo de intensa investigação recentemente. Estudos demonstram que a produção e secreção desses hormônios aumentam em condições de expansão de volume circulatório em cães, ratos e humanos, o que ocorre também em estados patológicos associados a retenção de fluido, incluindo pré-eclâmpsia em humanos ou animais experimentais, hipertensão, estágios finais de doença renal, cardiomiopatia urêmica e hipertensão sensível ao sal. Recentemente, a inibição da Na^+/K^+ ATPase (NKA) *in vitro*, em células renais, tem sido associada à ativação da via da Src-kinase. No entanto, ainda não se sabe se a ativação dessa cascata está envolvida na promoção de diurese e natriurese em preparações com rins intactos isolados. O efeito natriurético putativo destes esteróides cardiotônicos não está completamente estabelecido. A avaliação dos efeitos renais *in vivo* de bufodienolídeos é difícil, já que estes compostos promovem efeitos vasculares potentes, que podem mascarar efeitos renais diretos. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de estudar os efeitos de um cardenolídeo (ouabaína-OUA) e três bufodienolídeos (bufalina-BUF, marinobufagina-MBG e telocinobufagina-TBG) na função glomerular e tubular de rins isolados e na hemodinâmica renal em ratos normotensos. Rins de ratos foram perfundidos por 120 minutos com os esteróides (1, 3 ou $10\mu\text{M}$) e foram avaliados seus efeitos vasculares e tubulares. Além disso, foi testado o efeito de PP2 ($10\mu\text{M}$), um inibidor de Src-kinase, contra os efeitos renais promovidos pela BUF, esteróide que desenvolveu efeitos renais mais pronunciados. BUF, na concentração de $1\mu\text{M}$ promoveu um efeito caliurético discreto, porém significativo. Nas concentrações de 3 e $10\mu\text{M}$, BUF aumentou o ritmo de filtração glomerular (RFG), a resistência vascular renal (RVR) (para $3\mu\text{M}$, este efeito foi visto apenas com 120 min), fluxo urinário (FU), ENa^+ e EK^+ de uma forma tempo e concentração-dependente. Vale salientar que na concentração de $10\mu\text{M}$, BUF promoveu o aumento de cerca de 2- (RVR), 5- (RFG e EK^+) e 8-vezes (FU e ENa^+) nos parâmetros funcionais renais avaliados. Todos estes efeitos renais promovidos BUF foram bloqueados por PP2. A administração de MBG não desencadeou alterações significativas na função renal. Por outro lado, TBG aumentou significativamente todos os parâmetros renais, porém, em uma menor intensidade que a BUF. OUA promoveu efeitos similares aos da TBG. Com a administração destes dois compostos todos os parâmetros renais aumentaram significativamente, com exceção do RFG, sobre o qual a OUA não promoveu efeito significativo. A administração *in vivo* de BUF aumentou significativamente a pressão arterial

média (PAM) e FU. MBG promoveu aumento significativo na PAM, RFG e fração de filtração, contrastando com os resultados obtidos *ex vivo*. Conclui-se que BUF promove um forte efeito diurético, natriurético e caliurético, parcialmente devido ao aumento da RVR e RFG. MBG não exerce efeitos renais diretos, enquanto que TBG e OUA promovem efeitos tubulares diretos com alterações hemodinâmicas discretas. O presente estudo mostra pela primeira vez os efeitos diurético, natriurético e caliurético diretos da BUF e TBG em rins isolados de ratos e a relevância da transdução de sinal mediada pela NKA.

PALAVRAS-CHAVES: bufodienolídeos, hemodinâmica renal, perfusão renal, Src kinase

ABSTRACT

EFFECTS OF ENDOGENOUS CARDIOTONIC STEROIDS IN THE RENAL FUNCTION OF RATS

Graciana Teixeira Costa. Orientador: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento.

Bufadienolides are cardiotonic steroids structurally related to the clinically relevant cardenolides (e.g., digoxin). Some bufadienolides were detected in the plasma and urine of mammals and their (patho)physiological significance has started to be unveiled. For instance, enhanced production/secretion of these hormones occurs in saline volume expanded dogs, rats and humans, and in pathological states associated with fluid retention, including human and experimental preeclampsia, hypertension in end stage renal disease, uremic cardiomyopathy and salt-sensitive hypertension. Recently, the inhibition of NKA has been associated, in kidney cells *in vitro*, to the activation of Src-kinase pathway. Nevertheless, whether the activation of this cascade leads to diuresis and natriuresis in the isolated intact kidney is still unknown. Nevertheless, the putative natriuretic effect of cardiotonic steroids is still disputed. The evaluation of the renal effects of bufadienolides *in vivo* is difficult since they have potent effects on the vascular system that can mask its direct renal effects. Thus, this work was undertaken in order to study the effects of a cardenolide (ouabain;OUA) and three bufadienolides (bufalin-BUF, marinobufagin-MBG and telocinobufagin-TBG) on glomerular and tubular function of the isolated kidney and on the renal hemodynamics of normotensive rats. We perfused rat kidneys for 120 minutes with the steroids (1, 3 or 10 μM) and measured its vascular and tubular effects. Thereafter we probed the effect of 10 μM PP2, a Src-kinase inhibitor against the steroid that produced the most remarkable renal effects, i.e., BUF. BUF at 1 μM had a slight but significant kaliuretic effect. BUF at 3 and 10 μM increased glomerular filtration rate (GFR), renal vascular resistance (RVR) (for 3 μM , this was only seen at 120 min), urinary flow (UF), ENa^+ and EK^+ in a time- and/or concentration-dependent fashion. For instance, 10 μM BUF led to increments around 2- (RVR), 5- (GFR and EK^+) and 8-fold (UF and ENa^+). All these renal effects of BUF were blunted by PP2. MBG did not evoke significant alterations of the kidney function. On the other hand, TBG increased significantly all renal parameters but to a lesser extent when compared to BUF. OUA also increased, with the same efficacy as TBG, all renal parameters studied significantly with the exception of GFR. *In vivo* BUF significantly increased mean arterial pressure (MAP) and UF. MBG significantly increased MAP, GFR and filtration fraction, contrasting to the results obtained *ex vivo*. In conclusion, BUF evokes strong diuretic, natriuretic and kaliuretic effects partially due to increased RVR and RFG. MBG has no direct renal effects and TBG and OUA evokes direct tubular effects with minimal hemodynamic alterations. The present study shows for the first time the direct diuretic, natriuretic and kaliuretic effects of BUF and TBG in isolated rat kidney and the relevance of Na^+/K^+ -ATPase-mediated signal transduction.

KEY WORDS: bufadienolides, renal hemodynamics, renal perfusion, Src kinase

LISTA DE ABREVIATURAS

SRA	Sistema Renina-Angiotensina
PPR	Pressão de Perfusão Renal
RFG	Ritmo De Filtração Glomerular
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
PAN	Peptídeo Atrial Natriurético
HEA	Hormônios Esteróides da Adrenal
OUA	Ouabaína
MBG	Marinobufagina
TBG	Telocinobufagina
BUF	Bufalina
ACTH	Hormônios Adrenocorticotrópicos
ANG II	Angiotensina II
EDLF	Endogenous Digitalis-Like Factor
PKC	Proteína Quinase C
EGFR	Fator de Crescimento da Epiderme
PI3	Fosfatidilinositol-3 Quinase
PKA	Proteína Quinase A
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
PKG	Proteína Quinase G
DS	Dahl Salt-Sensitive
DR	Dahl Salt-Resistance
RVR	Resistência Vascular Renal
FU	Fluxo Urinário
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
PP2	Bloqueador De Src-Quinase (PP2)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	25
Figura 2. Ação hipotética da ouabaína, um hormônio esteróide da adrenal.....	26
Figura 3. Estrutura química dos esteróides cardiotônicos (cardenolídeos).....	28
Figura 4. Estrutura química dos esteróides cardiotônicos (bufodienolídeos).....	30
Figura 5. Contraste dos efeitos dos hormônios esteróides da adrenal na via “iônica clássica” e “internalização da bomba”.....	34
Figura 6. Provável mecanismo natriurético induzido pela marinobufagina.....	36
Figura 7. Múltiplos passos para as respostas biológicas aos hormônios esteróides da adrenal.....	37
Figura 8. Controle hormonal da liberação de ouabaína endógena de células da zona fasciculada do córtex adrenal sob condições de hipernatremia, hipóxia e atividade física.....	38
Figura 9. Rostafuroxin, um composto que se opõe aos efeitos anti-hipertensivos da ouabaína endógena.....	39
Figura 10. Efeito da hipertensão causada pelo aumento do débito cardíaco e resistência periférica total.....	40
Figura 11. Estrutura do sinalossoma ligada à bomba de sódio.....	45
Figura 12. Perfil de eluição das frações 2 (telocinobufagina), 3 (marinobufagina) e 4 (bufalina) obtida do veneno de <i>Rhinella Jimi</i>	52
Figura 13. Sistema de Perfusão Renal.....	53
Figura 14. Escala experimental de observação quando adicionado os hormônios bufalina, marinobufagina, ouabaína, telocinobufagina (1µM, 3µM e 10µM) no sistema de perfusão.....	54
Figura 15. Escala experimental de observação quando adicionado o hormônio bufalina (1µM, 3µM e 10µM) associada a um bloqueador de src-quinase (PP2) no sistema de perfusão.....	55
Figura 16. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10µM e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) no ritmo de filtração	

glomerular.....	59
Figura 17. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10µM no ritmo de filtração glomerular.....	60
Figura 18. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10µM no ritmo de filtração glomerular.....	61
Figura 19. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10µM no ritmo de filtração glomerular.....	62
Figura 20. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina (10µM) no ritmo de filtração glomerular.....	63
Figura 21. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10µM e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) na resistência vascular renal.....	64
Figura 22. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10µM na resistência vascular renal.....	65
Figura 23. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10µM na resistência vascular renal.....	66
Figura 24. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10µM na resistência vascular renal.....	67
Figura 25. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina (10µM) na resistência vascular renal.....	68
Figura 26. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10µM e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) no fluxo urinário.....	69
Figura 27. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10µM no fluxo urinário.....	70
Figura 28. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10µM no fluxo urinário.....	71
Figura 29. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10µM no fluxo urinário.	72
Figura 30. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina (10µM) no fluxo urinário.....	73
Figura 31. Correlação linear entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal causada pela bufalina (10µM).....	74
Figura 32. Correlação linear entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal causada pela ouabaína (10µM)	75

Figura 33. Correlação linear entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal causada pela telocinobufagina (10 μ M)	76
Figura 34. Correlação linear entre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular causada pela bufalina (10 μ M)	77
Figura 35. Correlação linear entre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular causada pela ouabaína (10 μ M)	78
Figura 36. Correlação linear entre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular causada pela telocinobufagina (10 μ M)	79
Figura 37. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) na excreção de sódio renal.....	80
Figura 38. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na excreção de sódio renal.....	81
Figura 39. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na excreção de sódio renal.	82
Figura 40. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na excreção de sódio renal.	83
Figura 41. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina (10 μ M) na excreção de sódio renal.	84
Figura 42. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) na caliurese.....	85
Figura 43. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na caliurese.	86
Figura 44. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na caliurese.....	87
Figura 45. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na caliurese.	88
Figura 46. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina (10 μ M) na caliurese.	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sumário dos Resultados da Perfusão Renal <i>ex vivo</i>	90
Quadro 2. Resultados da Hemodinâmica Renal <i>in vivo</i>	91
Quadro 3. Diluição da Urina.....	124

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Estrutura e Função Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	24
2.2. Esteróides Cardiotônicos.....	26
2.2.1. Cardenolídeos.....	27
2.2.2. Bufodienolídeos.....	28
2.3. Hormônios Esteróides da Adrenal.....	31
2.3.1. Efeitos Farmacológicos.....	31
2.3.2. Biossíntese.....	32
2.3.3. Mecanismo de Ação	32
2.3.4. Papel na Homeostase.....	38
2.4. Função Renal no Controle da Pressão Arterial.....	39
2.4.1. Natriurese vs. Pressão Arterial.....	40
2.4.2. Natriurese Pressórica vs. Hipertensão	41
2.4.3. Efeitos dos Hormônios da Adrenal na Função Renal vs. Pressão Arterial.....	41
2.5. Efeitos dos Hormônios da Adrenal na Função Vascular.....	43
3. JUSTIFICATIVA	47
4. OBJETIVOS	49
4.1. Geral.....	49
4.2. Específicos.....	49
5. MATERIAIS E MÉTODOS	51
5.1. Características Animais	51
5.2. Drogas e Reagentes.....	51
5.3. Obtenção dos Esteróides Cardiotônicos.....	51
5.4. Perfusão Renal <i>ex vivo</i>	52
5.4.1. Preparação do Perfusato.....	52
5.4.2. Protocolo Experimental.....	55

5.5. Hemodinâmica Renal <i>in vivo</i>	52
5.6. Análise Estatística.....	57
6. RESULTADOS	59
6.1. Perfusão Renal <i>ex vivo</i>	59
6.1.1. Efeito da Bufalina na Filtração Glomerular.....	59
6.1.2. Efeito da Marinobufagina na Filtração Glomerular.....	60
6.1.3. Efeito da Ouabaína na Filtração Glomerular.....	61
6.1.4. Efeito da Telocinobufagina na Filtração Glomerular.....	62
6.1.5. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Filtração Glomerular.....	63
6.1.6. Efeito da Bufalina na Resistência Vascular Renal.....	64
6.1.7. Efeito da Marinobufagina na Resistência Vascular Renal.....	65
6.1.8. Efeito da Ouabaína na Resistência Vascular Renal.....	66
6.1.9. Efeito da Telocinobufagina na Resistência Vascular Renal.....	67
6.1.10. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Resistência Vascular Renal.....	68
6.1.11. Efeito da Bufalina no Fluxo Urinário.....	69
6.1.12. Efeito da Marinobufagina no Fluxo Urinário.....	70
6.1.13. Efeito da Ouabaína no Fluxo Urinário.....	71
6.1.14. Efeito da Telocinobufagina no Fluxo Urinário.....	72
6.1.15. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos no Fluxo Urinário.....	73
6.1.16. Índice de Correlação do Efeito da Bufalina no Fluxo Urinário vs. Resistência Vascular Renal.....	74
6.1.17. Índice de Correlação do Efeito da Ouabaína no Fluxo Urinário vs. Resistência Vascular Renal.....	75
6.1.18. Índice de Correlação do Efeito da Telocinobufagina no Fluxo Urinário vs. Resistência Vascular Renal.....	76
6.1.19. Índice de Correlação do Efeito da Bufalina no Fluxo Urinário vs. Ritmo de Filtração Glomerular.....	77
6.1.20. Índice de Correlação do Efeito da Ouabaína no Fluxo Urinário vs. Ritmo de Filtração Glomerular.....	78

6.1.21. Índice de Correlação do Efeito da Telocinobufagina no Fluxo Urinário <i>vs.</i> Ritmo de Filtração Glomerular.....	79
6.1.22. Efeito da Bufalina na Natriurese.....	80
6.1.23. Efeito da Marinobufaginaa na Natriurese.....	81
6.1.24. Efeito da Ouabaína na Natriurese.....	82
6.1.25. Efeito da Telocinobufagina na Natriurese.....	83
6.1.26. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Natriurese..	84
6.1.27. Efeito da Bufalina na Caliuressa.....	85
6.1.28. Efeito da Marinobufagina na Caliuressa.....	86
6.1.29. Efeito da Ouabaína na Caliuressa.....	87
6.1.30. Efeito da Telocinobufagina na Caliuressa.....	88
6.1.31. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Caliuressa....	89
6.2. Sumário dos Resultados da Perfusão Renal <i>ex vivo</i>	90
6.3. Hemodinâmica Renal <i>in vivo</i>	91
7. DISCUSSÃO	93
8. CONCLUSÃO	103
9. PERSPECTIVAS	105
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	122
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética.....	123
Anexo 2 – Método de Diluição da Urina.....	124

1. Introdução

O consumo de sal em excesso, mais especificamente de sódio, pode em muitas pessoas ser um fator de risco importante para o desenvolvimento da hipertensão arterial, por afetar os níveis plasmáticos de renina, angiotensina e norepinefrina, aumentando assim a excreção de sódio, potássio e cálcio (HADDY & PAMNANI, 1995). Embora, hormônios natriuréticos, produzidos no miocárdio atrial e ventricular (SILVA, et al., 2003) estejam envolvidos no controle de sódio corporal (DE WARDENER & CLARKSON, 1985; BUCKALEW & HADDY, 1990), falhas nestes mecanismos podem provocar alterações na expressão gênica no coração, rim e na parede das artérias, aumentando a rigidez e a resistência arterial, gerando riscos em potencial para acidente vascular cerebral (FROHLICH, 2007).

Em homens ou em animais, a natriurese resultante representa uma complexa interação envolvendo fatores físicos e ações neurohumorais (PUSCHETT, 2008).

A procura dos hormônios natriuréticos, envolvidos na supressão da renina (HADDY & OVERBECK, 1976; BLAUSTEIN, 1977; BUCKALEW & HADDY, 1990), evidenciou outros hormônios envolvidos no controle do sódio e no controle do volume e osmolaridade do líquido extracelular (DE WARDENER & CLARKSON, 1985; MCGRATH, DE BOLD & DE BOLD, 2005; HADDY, 2006).

Em 1960, tornou-se óbvio que a ação do sistema renina-angiotensina (SRA), aldosterona, vasopressina e sistema nervoso simpático não explicavam completamente as respostas fisiológicas e fisiopatológicas na expansão aguda e crônica do volume sanguíneo (SCHRIER, 1975 e 1990). Em 1961, De Wardener & colaboradores demonstraram que a natriurese induzida pela infusão de salina estava associada ao aumento de pressão de perfusão renal (PPR) e ritmo de filtração glomerular (RFG). Este grupo propôs que este fenômeno era mediado por um hormônio, o qual foi denominado de “terceiro fator” (DE WARDENER, 1985).

Cort & Lichardus (1963) e Buckalew & colaboradores (1970) demonstraram que a expansão de volume estava associada com o aumento de substâncias na circulação que tem a propriedade de inibir o transporte de sódio *in vitro*. Em 1974, Kramer & Gonick demonstraram a inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) no rim e em 1982, Hamlyn et al., demonstraram que a inibição da NKA no plasma se correlacionava positivamente com a pressão sanguínea em grupos de pacientes com hipertensão.

Por outro lado, o plasma dos mamíferos contém muitas substâncias capazes de inibir a NKA e que por interagirem com anticorpos anti-digitalis foram classificados como digitálicos endógenos (SCHONER, 1992; DORIS, 1994). Uma variedade de agentes natriuréticos inibe seletivamente a NKA renal *in vitro* (TAYLOR, 1963; NECHAY, PALMER & CHINOY, 1967) e essa inibição pode ser revertida pela adição de potássio (NECHAY, PALMER & CHINOY, 1967).

O interesse nos inibidores endógenos de NKA, enquanto hormônios natriuréticos, diminuiu na década de 1980, principalmente pela inconsistência de dados experimentais acumulados até aquela data. Provavelmente, o fato mais inconsistente é de que a digoxina, o protótipo inibidor da NKA não fosse natriurético em indivíduos normais (HAUPTMAN & KELLY, 1999).

A descoberta do peptídeo atrial natriurético (PAN) por De Bold (1981) também contribuiu para a diminuição do interesse nestes hormônios putativos em benefício dos peptídeos natriuréticos. As pesquisas envolvendo estes compostos aumentaram com objetivo de fornecer subsídios para a fisiologia da homeostase do sódio e as pesquisas em busca do “terceiro fator” por alguns grupos que acreditavam ser um mediador hidrofóbico de natureza lipídica ficaram obscurecidas. As atriopeptinas demonstram efeitos potentes no sistema renal e cardiovascular e, portanto, são importantes na regulação homeostática e no balanço de sódio e de fluidos (YATES & MCDOUGALL, 1993).

O aprofundamento dos estudos com peptídeos natriuréticos revelou que seu papel no controle da pressão arterial e na regulação cardiovascular, são complexos. Vários aspectos bioquímicos, moleculares e farmacológicos dos peptídeos natriuréticos e de seus receptores têm funções marcantes na fisiologia e fisiopatologia nos tecidos renal, cardiovascular, neural e no sistema imunológico (PANDEY, 2005); a pesquisa nesta área continua a crescer.

Ademais, no início da década de 80 foi proposto que o intestino produziria um fator que regula também a excreção renal de sódio (FONTELES, 1991). Anos mais tarde Currie & colaboradores (1992) isolaram de intestino de rato o primeiro dos natriuréticos intestinais, a guanilina. Este peptídeo é um ativador endógeno da guanilato-ciclase C intestinal e foi denominada guanilina. Um ano após a descoberta da guanilina, um segundo membro de peptídeos similares à STa, chamado uroguanilina, foi isolado a partir de uma grande quantidade de urina de opossum (*Didelphis virginiana*) (HAMRA et al., 1993). A confirmação da existência de um provável eixo endócrino entero-renal movimentou vários

laboratórios no mundo e obscureceu também a busca de esteróides endógenos com efeito natriurético.

A partir da década passada, os estudos envolvendo novos hormônios esteróides da adrenal (HEA) recrudesceram, principalmente devido ao isolamento e caracterização da ouabaína (OUA) (SCHNEIDER et al., 1998a; HAMLIN et al., 1991; KAWAMURA et al., 1999), marinobufagina (MBG) (BAGROV et al., 1998; KOMIYAMA et al., 2005), telocinobufagina (TBG) (KOMIYAMA et al., 2005) e bufalina (BUF) (LICHTSTEIN et al., 1993; ODA et al., 2001) no plasma e urina de animais e seres humanos.

A descoberta dos HEA abriu a possibilidade nos avanços terapêuticos (FERRARI, FERRANDI & VALENTINI, 2006; SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2007). Estas substâncias estão envolvidas na função cardíaca, resistência vascular periférica e função renal (SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2008).

A importância desses hormônios tem gerado discussões (KELLY & SMITH, 1992; HANSEN, 2003), sendo assim é necessário avaliar a ação de várias concentrações de HEA na sinalização das isoformas de NKA e seu envolvimento em processos fisiológicos e fisiopatológicos (ORLOV & HAMET, 2006; PIERRE & XIE, 2006).

Estes compostos podem contribuir para excreção renal de sódio em condições de sobrecarga de sal na dieta por suas propriedades natriuréticas. Esta propriedade está baseada em sua capacidade de inibir a isoforma $\alpha 1$ da NKA e assim diminuir o transporte tubular de sódio. No entanto, até hoje não foi descrito na literatura científica biomédica efeitos diretos destes compostos na fisiologia renal. Os estudos *in vivo* realizados mostravam aumento dos níveis de norepinefrina circulante, interação com angiotensina e com o PAN como fatores que poderiam obscurecer a atividade intrínseca destes compostos no rim. Ademais, em alguns estudos, a identidade dos compostos não era garantida, pois a mesma era atestada por imuno-análise e os compostos eram utilizados em dose única ou por infusão contínua de uma única concentração. Portanto, nossa proposta é estudar esses compostos com identidade química determinada e fazer três doses de cada composto para caracterizar os efeitos diretos e dose-dependentes.

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de Literatura

2.1. Estrutura e função da Na⁺/K⁺-ATPase

A NKA, descoberta por Skou (1957), é um heterodímero (AKIMOVA et al., 2004) que controla múltiplas funções celulares essenciais, especialmente, à manutenção do potencial elétrico da membrana, necessário para a transmissão nervosa e contração muscular, excitabilidade e muitas outras funções celulares que dependem do gradiente iônico de sódio e potássio (LINGREL, 1992), como o cotransporte de Na⁺/Ca²⁺ (BLAUSTEIN, 1993). É uma bomba submicroscópica que atravessa a membrana celular e é responsável pelo fino processo de regulação do gradiente iônico celular (LING, 2007). Estimulada pela adenosina trifosfato (ATP), é um sistema de transporte ativo constante de íons sódio e potássio para o meio extra e intracelular em respectivo, altamente conservado em células eucarióticas que converte energia química em energia útil de trabalho.

A NKA (Figura 1) consiste de dois polipeptídios em quantidades equimolares (CANTLEY, 1981): uma subunidade catalítica α (100.000M) e uma subunidade glicoproteínada β (55.000M). A subunidade α , contém sítios de ligação para sódio e HEA no meio extracelular e potássio e ATP no meio intracelular (BAGROV, SHAPIRO & FEDOROVA, 2009). Esta proteína existe em quatro isoformas (α_1 , α_2 , α_3 , α_4), os quais estão distribuídos em diversas células e tecidos (BLANCO & MERCER, 1998), sendo a α_1 exclusivamente encontrada nas células tubulares do rim, a α_2 e α_3 relacionadas à função de vasoconstrição (BLAUSTEIN, et al., 2006) e inotropismo cardíaco (DOSTANIC, et al., 2005).

A subunidade α é até agora o único receptor conhecido dos HEA (BLANCO & MERCER, 1998). A subunidade β , dividida em duas isoformas (β_1 e β_2), ainda não tem funcionalidade conhecida (FEDOROVA E BAGROV, 1997)

Sete proteínas transmembrânicas adicionais próximas ao complexo $\alpha\beta$ foram identificadas (FXYD), sendo que uma dessas proteínas (FXYD2) é conhecida como subunidade γ da NKA. Essa subunidade não é parte integral da bomba de sódio per se, porém, modula e catalisa algumas funções da NKA (BAGROV, SHAPIRO & FEDOROVA, 2009).

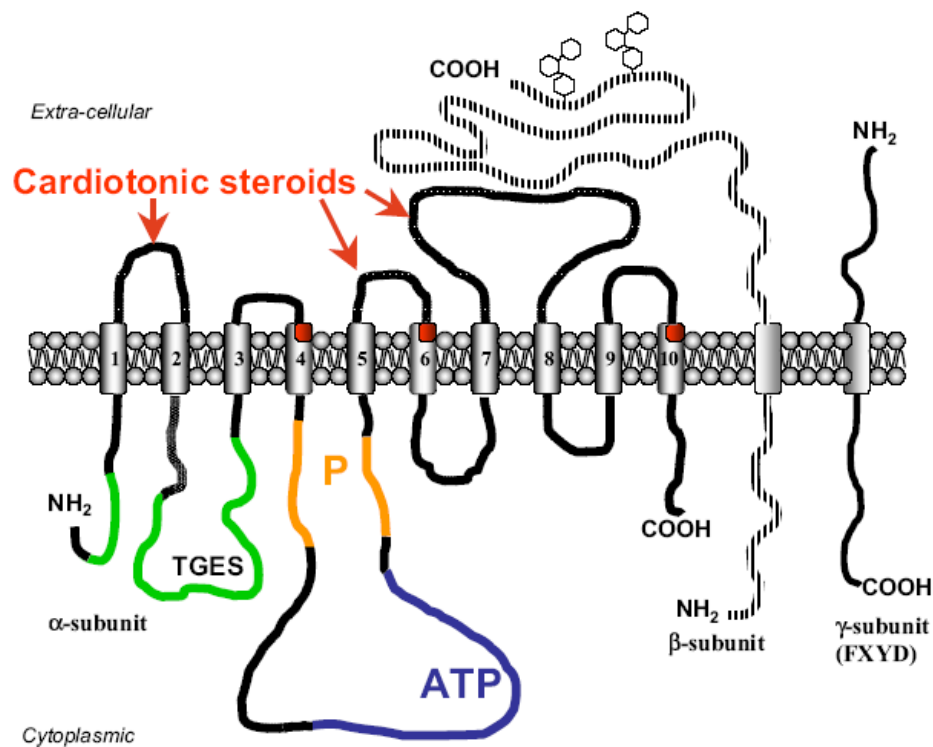


Figura 1. Estrutura da Na^+/K^+ -ATPase.

Fonte: Bagrov, Shapiro & Fedorova (2009).

A função básica da NKA é controlar o gradiente iônico de sódio e potássio intra e extracelular, e após a ligação dos HEA a essa estrutura, estes hormônios inibem a função enzimática da NKA, gerando um aumento da concentração de sódio intracelular. Concomitantemente, há alterações na função fisiológica normal do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, acarretando o aumento da concentração de cálcio intracelular. Estes fenômenos, a nível vascular, geram vasoconstrição por aumento da contratilidade das estruturas musculares dos vasos (Figura 2), e a nível renal, diminuem a reabsorção de sódio, acarretando natriurese.

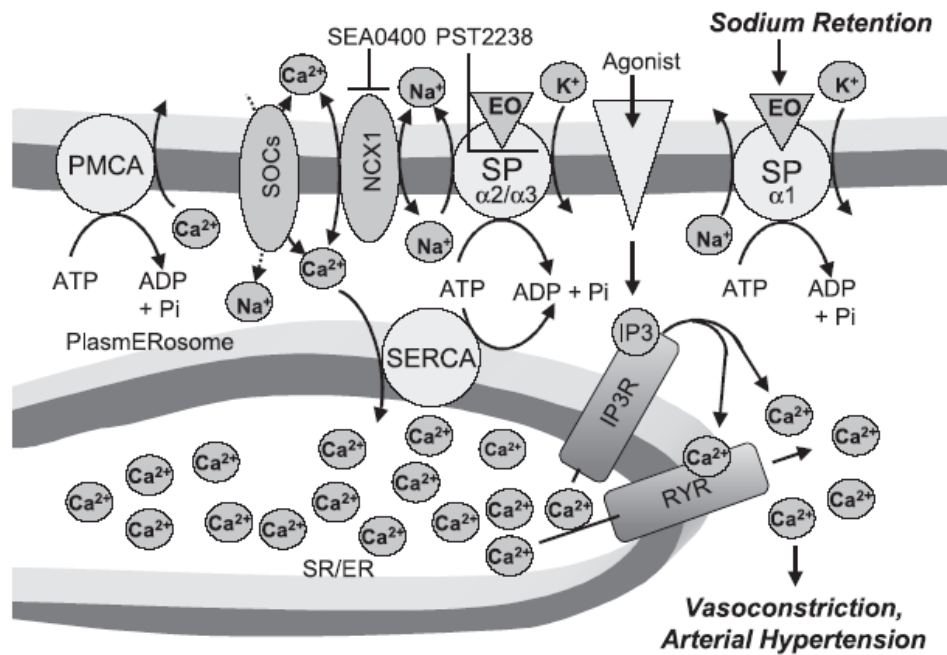


Figura 2. Ação hipotética da ouabaína, um hormônio esteróide da adrenal.

Fonte: Shoner & Georgios Scheiner-Bobis (2007).

2.2. Esteróides Cardiotônicos

Cardenólídeos e bufodienólídeos são chamados de esteróides cardiotônicos. Enquanto os cardenólídeos foram originalmente isolados de plantas (ex. digitalis), os bufodienólídeos têm sido identificados primariamente na pele e glândulas cutâneas de sapos (DVELA et al., 2007). Esses elementos têm uma estrutura geral em comum: um núcleo esteróide com uma lactona no C-17 do anel e um grupo hidroxila no C-14 (GUNTERT & LINDE 1981). Por séculos, os esteróides cardiotônicos têm sido usados no tratamento da insuficiência cardíaca na medicina oriental e ocidental (MEYER & LINDE, 1971; KELLY & SMITH, 1996).

A maioria dos cardenólídeos digitálicos tem um resíduo terminal glicose, a qual se fixa no C-3, logo são chamados primariamente de glicosídeos (THEURER et al., 1994). Inicialmente, os cardenólídeos eram encontrados nas células de *Digitalis lanata* (DIETRICH et al. 1987) acumulados no vacúolo, o principal compartimento de estoque da glicose (PFEIFFER et al. 1982, KREIS & REINHARD 1985, KREIS & REINHARD 1987).

Os cardenólídeos podem ser degradados a um segundo cardenólídeo pela divisão do resíduo terminal da glicose. As digilanidase e digipurpidase, enzimas insolúveis *D. lanata* e *D. purpúrea* catalisam essa deglicosilação (STOLL et al. 1935).

A maioria dos bufodienolídeos, primariamente encontrados no tecido cutâneo de espécies que migram do meio terrestre para o meio aquático, têm sido usados no tratamento da insuficiência cardíaca no Oriente (CHEN & KOWARIKOWA, 1967; FLIER et al., 1980). Esses esteróides cardioativos diferem dos cardenolídeos por conterem uma dupla insaturação no sexto anel da lactona (MEYER & LINDE, 1971).

A OUA (cardenolídeo) pode ser classificada como polar-hidrofílico e a MBG (bufodenolídeo) como não polar-hidrofóbico. Outra diferença é quanto à localização da lactona, na qual esta localizada na quinta ligação dos cardenolídeos e na sexta ligação dos bufodienolídeos. Uma diferença estrutural adicional é àquela presente na ligação epóxi entre os carbonos 14 e 15 da MBG, ausente nos demais HEA (DVELA et al., 2007).

2.2.1. Cardenolídeos

Hamlyn et al (1991) isolaram do plasma humano um esteróide cardiotônico indistinguível daquele obtido de plantas, chamado de OUA endógena. Dois compostos do tipo cardenolídeos foram purificados do plasma humano e do hipotálamo. O primeiro foi a OUA (HAMLYN et al., 1991; MATHEWS et al., 1991) e o segundo foi a digoxina (GOTO et al., 1990a; QAZZAZ et al., 2004).

A digoxina é um glicosídeo cardíaco inicialmente obtido da planta *Digitalis lanata* usada no tratamento de doenças cardíacas em mais de 200 anos (DOHERTY et al., 1978; ANTMAN & SMITH, 1985; RIETBROCK & WOODCOCK, 1985; HELLER, 1990). A *D. lanata* é a fonte mais importante de glicosídeos cardíacos, com aproximadamente 80 tipos diferentes de cardenolídeos/glicosídeos cardíacos a partir de 5 genes e 10 diferentes açúcares (WICHTL et al., 1987).

Ouabaína, um esteróide natural de planta, foi o primeiro cardenolídeo inibidor endógeno de NKA purificada do plasma humano (HAMLYN & BLAUSTEIN, 1991; LUDENS et al., 1991). Foi encontrado também em glândula adrenal bovina, hipotálamo bovino (SCHNEIDER et al., 1998a), medula adrenal de ratos (KOMIYAMA et al., 2001) e hipotálamo humano (KAWAMURA et al., 1999). A digoxina foi encontrada em urina de indivíduos saudáveis (GOTO et al., 1990a).

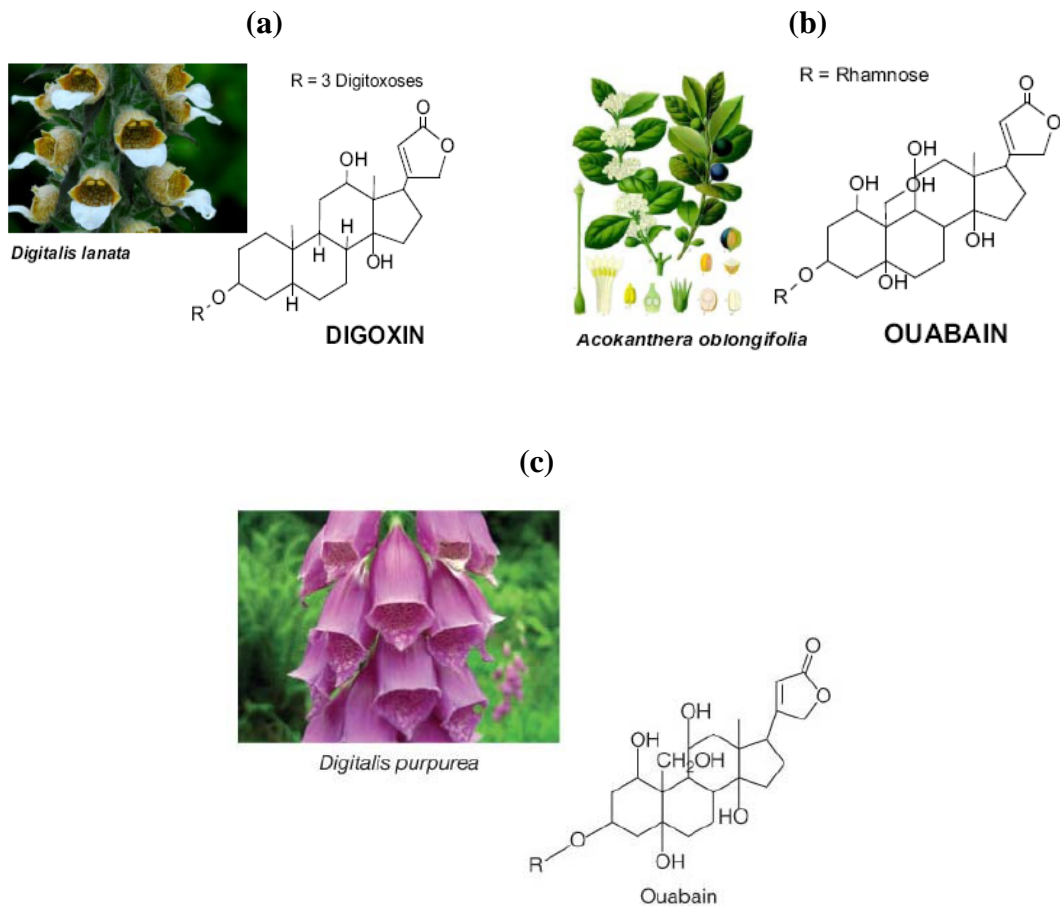


Figura 3. Estrutura química dos esteróides cardiotônicos (cardenolídeos).

Fonte: Bagrov, Shapiro & Fedorova, 2009.

2.2.2. Bufodienolídeos

Bufodienolídeos são esteróides cardioativos cuja eficácia é conhecida desde antiguidade egípcia, que a extraía e usava no tratamento de doenças cardíacas (BAUMGARTEN, 1963). Escilarina A, um dos principais glicosídeos, foi o primeiro bufodienolídeo a se elucidar a estrutura em 1933 (STOLL et al., 1933).

Previamente, foram encontradas no plasma, substâncias análogas àquelas encontradas em glândulas parotóides de sapos (*Bufonidae*), inibidoras de NKA com estrutura bufodienolídea (FLIER, 1978). No veneno de *Bufo marinus* (Figura 3a), foi encontrado um esteróide, MBG, que causa na aorta de ratos uma rápida e sustentada vasoconstrição, que evoca um efeito inotrópico positivo *in vitro* e inibe a NKA (BAGROV et al., 1993).

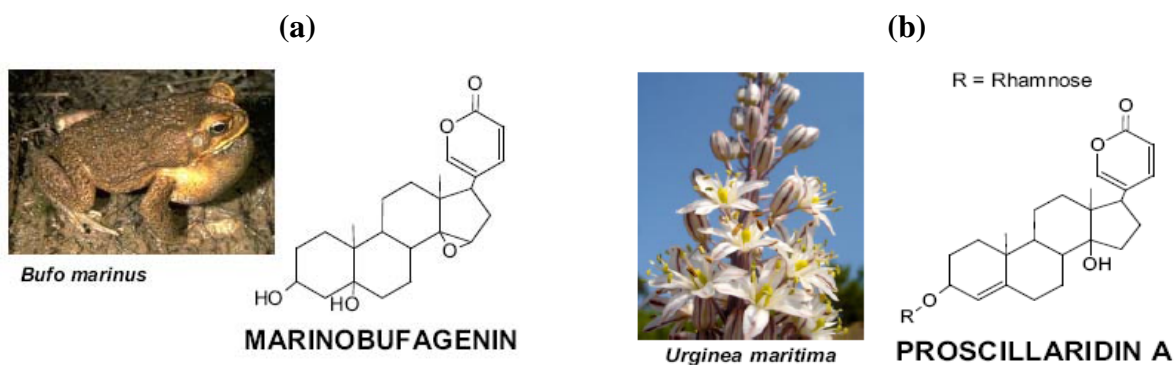
Fedorova e Bagrov (1997) demonstraram a presença no plasma e na urina de humanos de uma substância reativa aos anticorpos contra a MBG (BAGROV et al., 1995;

BAGROV et al., 1996). Por outro lado, Kieval et al. (1988) encontraram BUF na bile humana e Lichtstein et al. (1988) na lente do olho humano. A 19-nor-bufalina foi identificada em lentes de humanos com catarata (LICHTSTEIN, 1993), a proscillaridina A no plasma humano e em pacientes com hipertensão (SICH, 1996; SCHNEIDER et al., 1998b), MBG na urina humana após infarto do miocárdio (BAGROV et al., 1998) e, mais recentemente TBG, forma reduzida da MBG, do plasma de pacientes com insuficiência renal (KOMIYAMA, et al., 2005); a norbufalina foi isolada da catarata de pacientes humanos (LICHTSTEIN, et al. 1993).

A BUF é um bufodienolídeo com fórmula molecular $C_{24}H_{34}O_4$ e peso molecular de 386,5 (HAN et al., 2007). Este bufodienolídeo tem sido usado como cardiotônico e anestésico local na China e Japão por séculos (KRENN & KOPP, 1998).

Numazawa et al. (1995) demonstraram, em humanos, a presença de substâncias que reagem com anticorpo policlonal contra a BUF. Demonstraram também a presença de BUF imunorreativa em humanos e ratos.

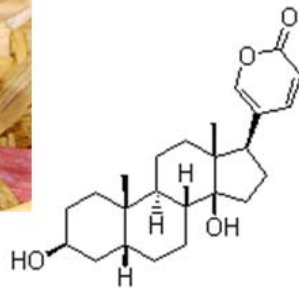
A secreção cutânea de sapo possui ainda um esteróide chamado resibufagenina (1-hidroxi-14,15-epoxi-20,22-dienolídeo glicosídeo). Brownlee et al. (1987) mostraram que a BUF (aglicona), quase idêntico estruturalmente à resibufagina (RBG), diferente apenas por um H^+ , é um potente inibidor da NKA renal em cães, embora tenha apresentado em ratos, um fraco efeito natriurético. A RBG também inibe a NKA e aumenta a força de contração no tecido cardíaco (MEYER & LINDE, 1970; LICHTSTEIN, KACHALSKY & DEUTSCH, 1986).



(c)

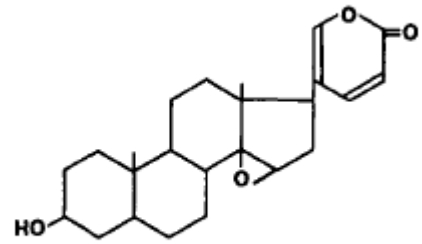


Bufo gargarizans



Bufalina

(d)

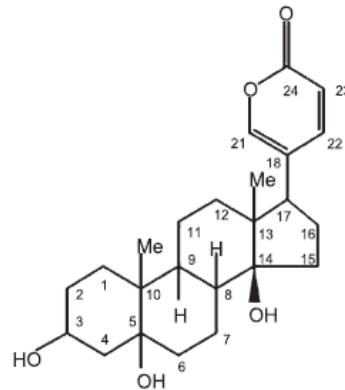


Resibufagenin

(e)



Bufo rubescens



Telocinobufagina

Figura 4. Estrutura química dos esteróides cardiotônicos (bufodienolídeos).

Fonte: ^{a,b,d}Bagrov, Shapiro & Fedorova (2009), ^cJanzen, 2008; ^eGrandinetti, 2004.

Os bufodienolídeos estão implicados na patogênese da hipertensão através do SRA, como demonstrado em experimentos animais e seres humanos (HADDY & OVERBECK, 1976; BLAUSTEIN, 1977). Os glicosídeos cardíacos bloqueiam vasodilatação por cloreto de potássio (KCl) (CHEN et al., 1972), potenciam a vasoconstrição por norepinefrina (NE) (O'NEILL et al., 1980), constrição dos vasos sanguíneos (NYHOF, DABNEY & HADDY, 1978) e aumentam a pressão sanguínea (WILLIAMS, ZOHMAN & RATNER, 1958;. SONGU-MIZE et al., 1983).

2.3. Hormônios Esteróides da Adrenal

2.3.1. Efeitos Farmacológicos

A MBG e OUA possuem propriedades vasoconstritoras, porém, esses dois inibidores endógenos eliciam a vasoconstrição por distintos mecanismos (BAGROV, 1995). Experimentos *in vivo* demonstram diferentes respostas entre cardenolídeos e bufodienolídeos. Pamnani et al. (1991a) mostraram que a infusão intravenosa em ratos com BUF produz resposta pressórica e inotrópica positiva e efeitos natriuréticos mais potentes quando comparados à OUA. A questão que permanece é se os efeitos natriuréticos são resultantes de uma ação renal intrínseca ou secundária ao aumento do débito cardíaco e à natriurese pressórica.

Os efeitos dos cardenolídeos e dos bufaneolídeos parecem estar associados à inibição da NKA nas terminações nervosas intravasculares e músculo liso vascular, respectivamente. Diferenças nos efeitos desses esteróides sugerem a interação com as diferentes isoformas da bomba (FEDOROVA & BAGROV, 1997).

Bagrov et al. (1996) demonstraram que a MBG causa vasoconstrição em artéria pulmonar isolada de humano. Em seus estudos anteriores com aorta isolada de rato, a MBG causou vasoconstrição, porém, com doses maiores que àquela usada por Bagrov et al. (1996).

Concentrações plasmáticas e urinárias de substâncias como OUA e MBG têm sido medidas em unidades picomolares e nanomolares (BAGROV et al., 1996; FERRANDI et al., 1997; LOPATIN et al., 1999). Sob condições de expansão de volume, aumentos na concentração plasmática e urinária de OUA e MBG têm sido relacionados com alterações no mecanismo de transporte de sódio renal. Contudo, os estudos são insuficientes para explicar todas as mudanças no transporte de sódio no túbulo proximal.

Segundo Bagrov et al., (1993), a BUF bloqueia a vasodilatação e aumenta a vasoconstrição, a resistência vascular e a pressão sanguínea via inibição da NKA (ELIADES et al., 1989; PAMNANI et al., 1991 e 1994), apesar do aumento da excreção de sódio (YATES & MCDUGALL, 1993). Evidências científicas mostram que a BUF é um inibidor de NKA mais potente que a OUA (BROWNLEE et al., 1990). Por causa da similaridade na estrutura química entre BUF e digoxina, os efeitos da BUF podem ser bloqueados por anticorpos anti-digoxina (BAGROV et al., 1993).

2.3.2. Biossíntese

O córtex adrenal e hipotálamo são considerados sítios de produção de OUA em mamíferos (KOMIYAMA et al., 2001; EL-MASRI et al., 2002). Hormônios adrenocorticotrópicos (ACTH), angiotensina II (Ang II), vasopressina e fenilefrina estimulam a liberação de OUA do córtex adrenal *in vitro* (LAREDO et al., 1997; SHAH et al., 1999).

Os cardenolídeos podem ser sintetizados no coração (D'URSO, et al., 2004), hipotálamo (MURRELL, et al., 2005) e na zona fasciculada e glomerulosa da glândula adrenal, especialmente a OUA (LAREDO, HAMILTON & HAMLYN, 1995). Hormônios esteróides, como pregnolona e progesterona, além do colesterol também são precursores da OUA e digoxina endógena, mas não de MBG.

Os bufodienolídeos são sintetizados nas células adrenocorticais (DMITRIEVA et al., 2000; YOSHIKA, et al., 2007), e embora a progesterona não seja precursora da MBG, o colesterol está envolvido no processo de síntese.

Para Huang, Amin & Leenen (2006), o cérebro também pode estar envolvido na produção dos glicosídeos cardíacos, pois as altas concentrações encontradas dessas substâncias neste tecido sugerem que essas substâncias possam ser usadas como neurotransmissores.

Muitos estudos sugerem que a adrenal seja a fonte de “*endogenous digitalis-like factor*” (EDLF) - fatores endógenos semelhantes à digoxina, pois em vários tecidos que tenham sido extraídos esses hormônios através de técnicas bioquímicas e imunológicas, os níveis extraídos da adrenal foram os mais altos (DORIS, 1988; RAUCH & JR, 1988). Laredo, Hamilton & Hamlyn (1994) demonstraram que a OUA é secretada de culturas primárias de células adrenocorticais bovinas e que a secreção aumenta perante o ACTH e Ang II. No ano seguinte, esses cientistas mostraram que o conteúdo de OUA endógena era 5-7 vezes maior na zona glomerulosa que na zona fasciculada da adrenal.

2.3.3. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação inotrópico vem sendo investigado por aproximadamente 60 anos. A inibição da NKA diminui o transporte de sódio e potássio e resulta no aumento da concentração intracelular de sódio, que por sua vez, aumenta secundariamente os níveis de

cálcio intracelular pela redução da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (SMITH, 1989, WASSERSTROM & AISTRUP, 2005).

Observações recentes sugerem que os esteróides cardiotônicos modulam em curto e em longo prazo outros processos de sinalização. A ligação dos HEA à NKA resulta na ativação de uma cascata de sinalização de transdução de Src-quinase/MAP-quinase e proteína quinase C (PKC) e, este efeito parece não depender da inibição do transporte iônico pelos HEA, mas pode ser pela ligação dos HEA à NKA caveolar na presença de Src e fator de crescimento da epiderme (EGFR) (XIE & ASKARI, 2002; PIERRE & XIE, 2006; LIANG et al., 2007). Isto foi demonstrado em diferentes tipos de células, incluindo miócito cardíaco, músculo liso e célula epiteliais (AYDEMIR-KOKSOY, ABRAMOWITZ & ALLEN, 2001; HAAS et al., 2002). Esse efeito da OUA parece ser independente da inibição do transporte iônico e pode ocorrer em vários tipos de células (XIE & CAI, 2003; XIE & XIE, 2005;). Os esteróides cardiotônicos induzem baixa frequência oscilatória no cálcio intracelular em células do túbulo proximal renal (AIZMAN et al., 2001), COS7 (MIYAKAWA-NAITO et al., 2003; ZHANG et al., 2006) e endotelial (SAUNDERS & SCHEINER-BOBIS et al., 2004). Esse efeito também parece ser independente da inibição da NKA.

Poucos estudos têm investigado a internalização da bomba de sódio após sua ligação com os HEA (Figura 5). A exposição prolongada altera a K_d da ligação para OUA na célula (GRIFFITHS et al., 1991). Baixas doses de OUA por 48 horas causam uma diminuição no número de sítios para OUA. Nas células tubulares renais ocorre uma alteração do trânsito da bomba de sódio relacionada à endocitose do receptor, mediada por fosfatidilinositol-3 quinase (PI3), na cisterna endocítica de clatrina (BERTORELLO & KATZ, 1993; OGIMOTO et al., 2000). Dependendo do tipo de célula, a PKC ou proteína quinase A (PKA) podem estar envolvidas. Baseado nesses achados, Liu et al. (2002), sugerem que a ligação entre os HEA e NKA pode induzir a internalização e/ou inativação da bomba de sódio nas células tubulares renais e, dessa forma, os efeitos natriuréticos de baixas concentrações séricas de HEA podem se tornar ampliados.

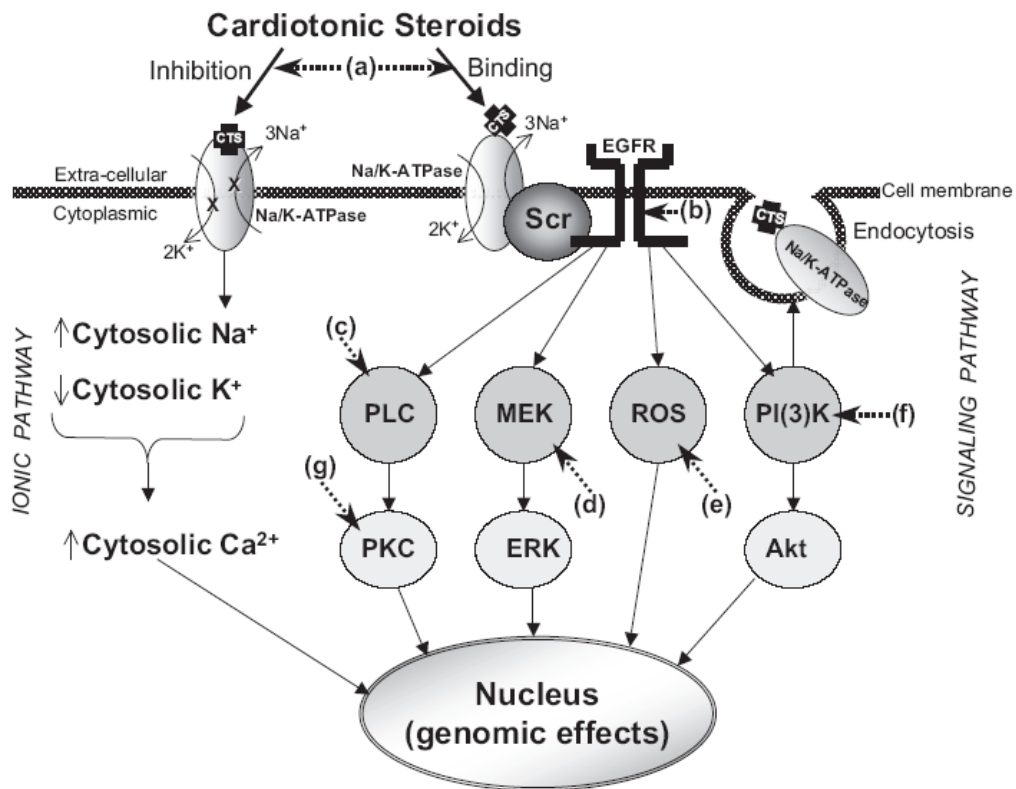


Figura 5. Contraste dos efeitos dos hormônios esteróides da adrenal na via “iônica clássica” e “internalização da bomba”.

Fonte: Bagrov, Shapiro & Fedorova, 2009.

A ligação dos hormônios esteróides com $\alpha 1$ pode ativar a sinalização celular via dependente ou independente de cálcio. No entanto, tardiamente a sinalização ocorre via Src-EGFR, presente nas cavéolas, por fosforilação da tirosina (LIANG et al., 2007), produzindo aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio, dependente do aumento do cálcio intracelular (LIU et al., 2000), resultando numa cascata de reações intracelulares, as quais culminam na alteração da expressão protéica e da membrana plasmática do túbulo renal (FERRARI, et al., 2006; SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2007).

Liu & Shapiro (2007) verificaram que em células do túbulo proximal, concentrações nanomolares de OUA e MBG foram capazes de internalizar a bomba de sódio e o trocador Na^+/H^+ (NHE3), ao contrário de células do túbulo distal.

Em miócitos, a inibição eletrogênica da NKA pelos HEA causa despolarização, elevação de sódio intracelular, inativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a abertura de canais de Ca^{2+} que resulta no aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, contração de cardiomiócito, e aumenta a sensibilidade das células musculares lisas aos constritores endógenos (BLAUSTEIN &

LEDERER, 1999; GLITSCH, 2001). Muitos estudos propõem a sinalização independente de Na^+ à ligação aos HEA. Esta hipótese se baseou nos achados de que baixas concentrações de HEA aumentam a proliferação celular (SAUNDERS & SCHEINER-BOBIS, 2004), síntese de DNA, ativação da proteína quinase ativada por mitógeno - MAPK (DMITRIEVA & DÓRIS, 2004) e produção de ROS (LIU et al., 2000) sem inibição significativa da NKA e elevação de $[\text{Na}^+]$.

O único receptor estabelecido para todos HEA é a subunidade α da NKA (BLAUSTEIN, 1977). Os esteróides se ligam a sítios extracelulares H1-H2-H3-H4 e H5-H6 e induzem mudanças conformacionais na NKA (DVELA et al., 2007). A ligação dos HEA e a subunidade α da NKA resulta na inibição da hidrólise do ATP e transporte iônico (AKIMOVA et al., 2005). Contudo, existe diferença na sensibilidade das diferentes isoformas para diferentes esteróides cardiotônicos. Em roedores, por exemplo, a isoforma α_3 é a mais sensível para OUA, α_2 é moderada e a α_1 é a menos sensível (BLANCO, BERBERIAN & BEAUGE, 1990; O'BRIEN, LINGREL & WALLICK, 1994). Em contrapartida, α_1 é mais sensível e α_3 menos sensível para MBG (FEDOROVA & BAGROV, 1997; FEDOROVA, et al., 2001a).

Este sistema também participa de importantes “cross-talks”. O efeito inibitório da isoforma α_1 da NKA pela MBG pode ser potencializada pela fosforilação do PAN e vice-versa (FEDOROVA, et al., 2006). Somado a isso, a MBG também inibe a transcrição do receptor para mineralocorticóide, favorecendo ainda mais a natriurese (SMITH, et al., 2007). A natriurese causada pela MBG pode ocorrer via internalização dos carreadores de sódio no túbulo proximal (PERIYASAMY, et al., 2005; LIU & SHAPIRO, 2007) e interferir na síntese protéica da aldosterona através do receptor mineralocorticóide nos túbulos distais e no ducto coletor (SMITH, et al., 2007). Contudo, esse efeito natriurético pode ser contraposto pela aldosterona, responsável pela reabsorção de sódio no túbulo distal e ductos coletores como mostrado na figura 6 (THOMAS, MCENEANEY & HARVEY, 2008) por aumentar a expressão da subunidade α , incluindo os canais de sódio (ENaC) e da NKA (MICK, et al., 2001).

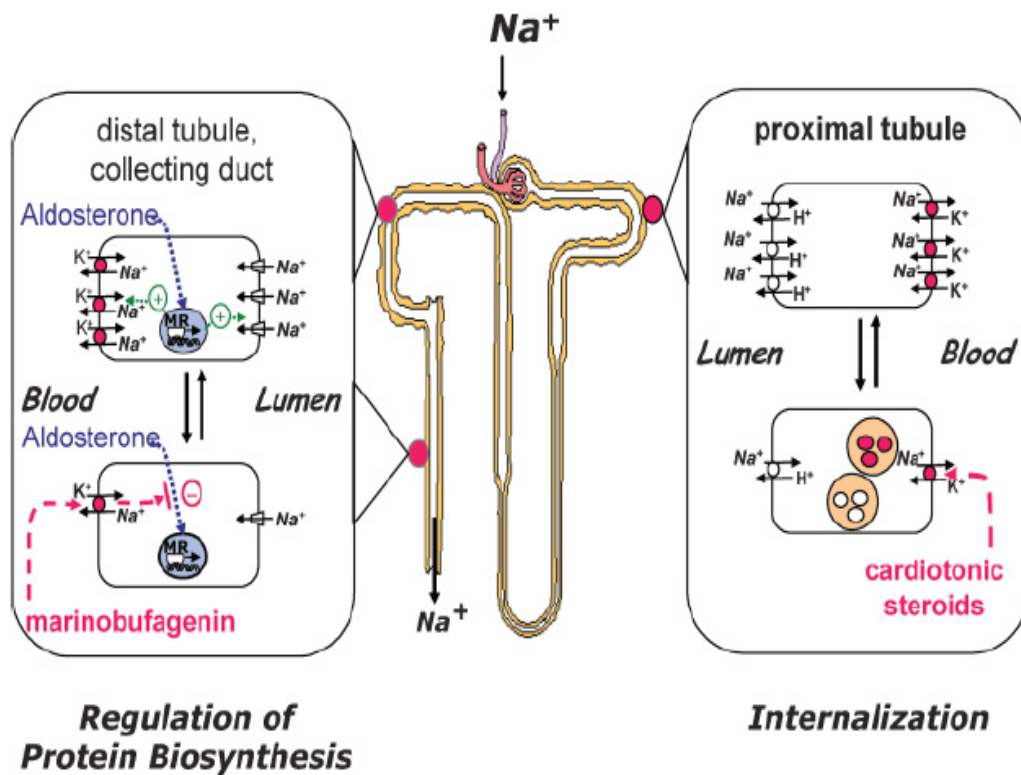


Figura 6. Provável mecanismo natriurético induzido pela marinobufagina.

Fonte: Schoner & Scheiner-Bobis, 2008.

As diferenças também ocorrem em nível genético. Segundo WANG, YUAN & LU (2001), no miocárdio ventricular, a OUA diminuiu a expressão da $\alpha 1$. A insuficiência renal crônica é marcada por alterações na expressão de genes cardíacos, que por sua vez altera a concentração de cálcio e a função contrátil no miocárdio (KENNEDY, et al., 2003). O mecanismo para a diversidade de ação pode ser devida as diferenças da estrutura dos esteróides, da natureza do receptor e da especificidade da espécie (Figura 7). (DVELA et al., 2007).

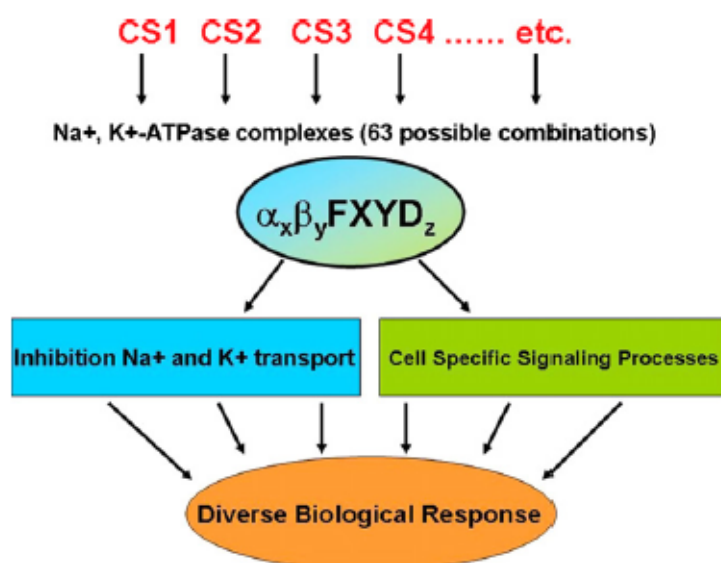


Figura 7. Múltiplos passos para as respostas biológicas aos hormônios esteróides da adrenal.

Fonte: Dvela et al., 2007.

Os efeitos dos HEA se estendem aos processos de diferenciação e apoptose (AKIYAMA et al., 1999; XIAO et al., 2002). Masuda et al. (1995) demonstraram que a BUF induz diferenciação e apoptose em células leucêmicas em humanos, acompanhado pelo aumento da expressão da apoptose, efeito este diminuído pela OUA (ZHANG et al., 1991 e 1992). Em células MDCK, Orlov et al. (2006) demonstraram que 1 μ M de OUA, BUF e digoxina diminuiu a viabilidade celular (AKIMOVA et al., 2005), enquanto a MBG na mesma concentração teve um efeito marginal.

A BUF tem atividade de induzir diferenciação e apoptose em células tumorais. Estudos *in vitro* envolvendo BUF tem sido feitos com células leucêmicas, câncer de próstata, câncer gástrico e hepático (YAMADA et al., 1998; TIAN et al., 2006). Su et al. (2003) mostrou, *in vitro*, que doses micromolares de BUF foram suficientes para produzir um efeito deletério potente em células hepáticas cancerígenas em humanos.

A BUF tem ação farmacológica, incluindo ação cardiotônica e anestésica local (CHEN & KORARIKOVA, 1967) e induz diferenciação em algumas linhas de células leucêmicas (ZHANG et al., 1991 e 1992).

2.3.4. Papel na Homeostase

TBG e MBG são encontrados no sangue humano e as concentrações destes hormônios aumentam significativamente em pacientes com doença renal (BAGROV & FEDOROVA, 2005; KOMIYAMA et al., 2005).

O aumento da concentração de sódio sérico estimula o cérebro a secretar OUA, e em cascata aumenta a produção de renina, Ang II e hormônios do sistema simpático (Figura 8). Outras situações, como exercício físico (BAUER, et al., 2005), estresse (FEDOROVA, et al., 2001b) e hipóxia (DE ANGELIS & HAUPERT, 1998) também estimulam a produção dos hormônios esteróides, enquanto, o PAN suprime a liberação de OUA pelo cérebro (CRABOS, et al., 1998). Ainda não está muito esclarecido como a ingestão elevada de sódio aumenta a produção de TBG e MBG (KENNEDY, et al., 2006b).

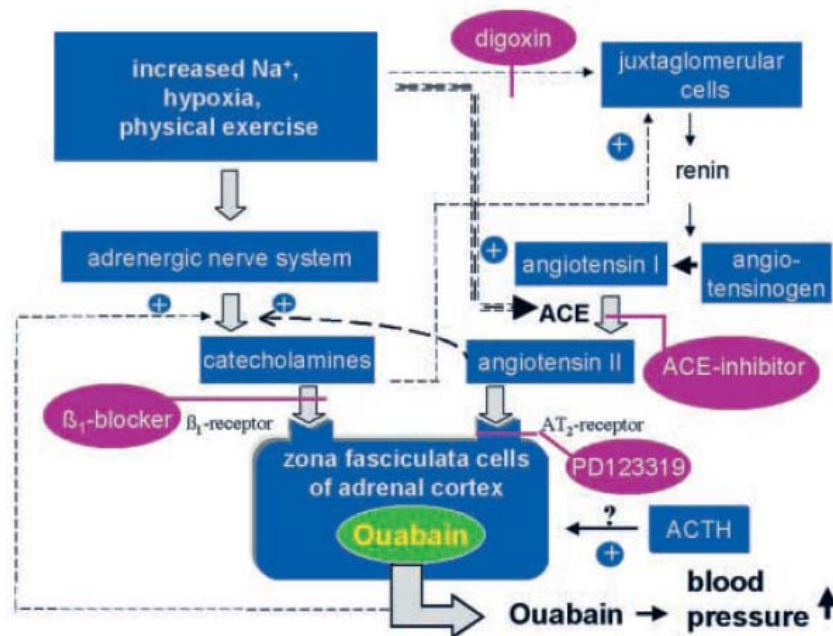


Figura 8. Controle hormonal da liberação de ouabaina endógena de células da zona fasciculada do córtex adrenal sob condições de hipernatremia, hipóxia e atividade física.

Fonte: Schoner, 2002.

A vasoconstrição por OUA, acompanhada pela diminuição da taxa cardíaca, ocorre via ativação do barorreceptor (KENNEDY, et al., 2006b). A digoxina, ao contrário da OUA, não ativa os barorreceptores, provavelmente pela sua internalização, evitando a

liberação dos elementos hipertensores provocados pela OUA (HUANG, et al., 1992; SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2007).

O aumento crônico dos glicosídeos cardíacos plasmáticos, como OUA e MBG promovem a hipertensão arterial, natriurese e alterações na expressão gênica no coração, parede das artérias e rim (SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2008). Concentrações nanomolares crônicas de OUA provoca hipertensão arterial (MANUNTA, et al., 2005), ademais, o uso de anticorpos contra este hormônio, como Digibind, pode atuar terapêuticamente na insuficiência cardíaca (PITZALIS, et al., 2006), na hipertensão arterial (KAIDE, et al., 1999), pré-eclâmpsia (AVERINA, et al., 2006) e hemorragia induzida pela hipertensão (MENEZES & DICHTCHEKENIAN, 2003).

O uso de anticorpos para os HEA têm sido preconizada, experimentalmente, no tratamento da hipertensão arterial e de outras patologias associadas ao aumento sérico desses hormônios. Periyasamy, et al. (2005) verificaram que anticorpos para MBG, em ratos Sprague-Dawley submetidos à dieta rica em sal, diminuiu a excreção urinária de NaCl em 60%, aumentou 86Rb^+ no filtrado tubular e a atividade da NKA (PERIYASAMY, et al., 2005).

A rostafuroxina (Figura 9), um antagonista destes hormônios, é um novo protótipo de anti-hipertensivos, e quando acompanhado de outros fármacos, como diuréticos, β bloqueadores, antagonistas de Ca^{2+} , parece ser a melhor conduta terapêutica para tratar fibrose e insuficiência cardíaca (SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2008).



Figura 9. Rostafuroxin, um composto que se opõe aos efeitos anti-hipertensivos da ouabaína endógena.

Fonte: Bagrov, Shapiro & Fedorova, 2009.

2.4. Função Renal no Controle da Pressão Arterial

Em muitos pacientes com hipertensão, não há manifestação clara de defeitos renais, já que os índices usados para avaliar a função renal, como o RFG ou fluxo plasmático

renal, encontram-se dentro da normalidade, o que leva muitos investigadores a acreditar que a hipertensão pode se desenvolver na ausência de anormalidade renal (HALL et al., 1990). Ainda não existe relação entre a excreção de sódio e água e a pressão arterial em todos os tipos de hipertensão clínica e experimental. Normalmente, um aumento na pressão arterial elevaria a excreção de sódio (natriurese) (GUYTON, 1980; HALL, et al., 1986). O fato de o paciente hipertenso ter excreção normal de sódio (igual ao ingerido) apesar de ter um aumento na pressão arterial indica que a natriurese pressórica foi bloqueada. Os mecanismos responsáveis por este fenômeno no rim, como a falha do seu papel na hipertensão têm gerado muitas controvérsias (HALL et al., 1990).

2.4.1. Natriurese Pressórica *versus* Pressão Arterial

A natriurese pressórica é um componente primário no “feedback” da regulação da pressão arterial e do volume de fluido corporal (BURNETT, GRANGER & OPGENORTH, 1984). Se a pressão arterial aumentar sem causar prejuízos na capacidade renal, haverá aumento na excreção de sódio e água através da natriurese pressórica e diurese, reduzindo assim o volume corporal e restabelecendo a pressão arterial (Figura 10).

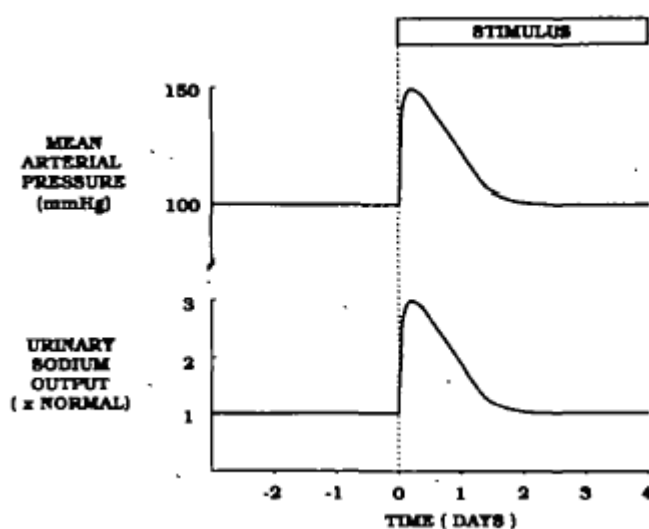


Figura 10. Efeito da hipertensão causada pelo aumento do débito cardíaco e resistência periférica total.

Fonte: Hall et al., 1990.

O SRA é um poderoso modulador da natriurese pressórica e, conseqüentemente da pressão arterial. A hipertensão causada pelo aumento do débito cardíaco ou pela resistência

periférica total não pode ser sustentada se a natriurese pressórica também não aumentar para que a excreção de sódio e água aumente até a pressão arterial se restabelecer (HALL et al., 1990).

2.4.2. Natriurese Pressórica *versus* Hipertensão

Alterações na natriurese pressórica estão presentes em todas as formas de hipertensão crônica. O conceito primário é de que a redução da capacidade renal excretória, causada pela diminuição do RFG ou aumento da reabsorção tubular, inicie um aumento compensatório na pressão sanguínea que tenta a todo custo manter o balanço de volume (GUYTON, 1980).

Sendo assim, mudanças na natriurese pressórica na hipertensão ocorrem secundariamente ao aumento na pressão arterial (THOMPSON & DICKINSON, 1976; LIARD, 1979). Hipertensão causada por hormônios anti-natriuréticos, como mineralocorticóides ou Ang II, causam retenção de sódio e elevação gradual da pressão sanguínea (GONZALEZ-CAMPOY, ROMERO & KNOX, 1989).

Anormalidades na natriurese pressórica renal têm sido observadas em modelos animais com hipertensão genética, Dahl salt-sensitive (DS) (ROMAN, 1986). Nesses modelos onde a hipertensão ocorre espontaneamente, alterações na natriurese pressórica acontecem antes do desenvolvimento da hipertensão e não secundariamente ao aumento da pressão sanguínea. Nos animais DS, o fluxo urinário (FU) e PPR são menores que nos animais Dahl salt-resistance (DR).

O fato dos animais DS sofrerem prejuízos primeiramente na natriurese pressórica demonstra que há uma diferença renal intrínseca nos animais DS e DR. Os mecanismos desse fenômeno não se encontram claros, porém, acredita-se que em parte se devam a hemodinâmica renal (HALL et al., 1990).

2.4.3. Efeitos dos hormônios da adrenal na função renal

São escassos na literatura estudos sobre os efeitos diretos destes hormônios esteróides na função renal.

A atividade da NKA é maior na medula que no córtex (HENDLER, TORRETTI & EPSTEIN, 1971), portanto aumenta o interesse do papel enzimático na reabsorção de sódio nos diferentes segmentos do néfron (TORRETTI et al., 1972). A OUA inibe a bomba *in*

vitro, diminuindo assim a reabsorção de sódio no rim. Seu efeito natriurético é melhor mostrado quando doses maiores são infundidas diretamente na artéria renal (HYMAN, HYMAN & JACQUES 1956). Resultados de Torrenti et al. (1972) sugeriram que a bomba desenvolve um papel proeminente na reabsorção de sódio na parte espessa ascendente da alça de Henle e túbulo distal e um menor papel do túbulo proximal.

O fato da expansão do volume plasmático aumentar a concentração no plasma de duas classes de fatores natriuréticos e ter efeitos opostos no tônus vascular sugere a possibilidade de algumas interações modulatórias entre eles. Fedorova et al. (2006) demonstraram que alguma interação pode ocorrer a nível celular e explorou os mecanismos desde importante fenômeno. Nos seus estudos, mostraram a interação de peptídeos atrial e MBG, inibidor da $\alpha 1$ NKA resistente a OUA encontrado no tecido renal e vascular de ratos. Na medula renal, os PAN aumentaram a fosforilação da $\alpha 1$ NKA através da proteína quinase G (PKG), contudo a sinalização celular desse fenômeno não está bem estabelecida. Estudos anteriores mostraram uma redução da atividade da NKA através da fosforilação da subunidade α por PKA e PKC. A fosforilação e a inibição da NKA renal pelo PAN pode requerer dopamina cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32), pois este elemento é o maior substrato da PKG. Tanto os PAN como a MBG inibiram a atividade catalítica da NKA na medula renal e seus efeitos foram somatórios, contrariamente no sarcolema vascular aórtico no qual, os PAN não tiveram efeitos ou discretamente estimularam a atividade da NKA e reduziram a fosforilação da $\alpha 1$ NKA através da PKG e reduziram os efeitos inibitórios na NKA pela MBG por um mecanismo também dependente da PKG. Esses efeitos de fosforilação e atividade catalítica dependente da PKG levaram esses cientistas a postular que a desfosforilação da NKA vascular pode ser menos sensível a inibição da $\alpha 1$ à MBG, e assim sugeriram que as diferenças dos efeitos da fosforilação da NKA e atividade catalítica no tecido vascular e renal poderia ser devido a diferença nas isoformas da PKG.

O papel das fosfatases na regulação da atividade da NKA foi observado em estudos anteriores de outro agonista ao GMPc/PKG, o óxido nítrico (WILLIAM et al., 2005). O sinergismo entre MBG e PAN no rim, poderia obviamente, facilitar a excreção da sobrecarga de sal e contribuir com a fina regulação da excreção de sódio renal. Na vasculatura, o antagonismo do efeito vasoconstritor da MBG e PAN forneceriam uma explicação pelo qual a expansão do volume poderia aumentar a excreção de sódio mediado pelos EDLF sem causar o aumento na pressão sanguínea (BUCKALEW, 2008).

Bagrov, Shapiro & Fedorova, (2009) verificaram que a MBG tem efeitos potentes na atividade da NKA de ratos que são reversíveis após administração de anticorpos. Observaram também que a administração dos hormônios esteróides provoca endocitose em células caracteristicamente semelhantes às células do túbulo proximal, não sendo recíproco para as células do túbulo distal. A endocitose provocada é variável via indução de OUA, MBG e digoxina, sendo esta última a mais fraca em potencial. De qualquer forma, esses achados mostram que a MBG atua favorecendo a natriurese tanto *in vivo* como *in vitro*. No entanto, estudos anteriores desses cientistas demonstram que a MBG não inibe a NKA renal de maneira a justificar atividade natriurética.

A inibição da NKA por BUF ou OUA tem sido demonstrada em estudos, ser os responsáveis pelo surgimento de hipertensão em cachorros e ratos (ELIADES et al., 1989; PAMNANI et al., 1991; YUAN et al., 1993; PAMNANI et al., 1994). Embora esses HEA provoquem vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca, o aumento dos componentes vasoativos, os seus efeitos na função renal ainda não foram investigados (ELIADES et al., 1989; ELIADES et al., 1991; PAMNANI et al., 1991a; WOOLFSON et al., 1992; YUAN et al., 1993).

2.5. Efeitos dos Hormônios da Adrenal na Função Vascular

O efeito dos HEA na pressão sanguínea tem sido extensivamente estudado (DVELA et al., 2007). Grandes evidências científicas suportam a possibilidade desses hormônios endógenos participarem no desenvolvimento da hipertensão (BLAUSTEIN et al., 2006; NESHER et al., 2007). Sua participação na etiologia da hipertensão pode ser direta, afetando a contratilidade do músculo liso e/ou natriurese.

A crônica secreção dos glicosídeos cardíacos, mesmo em concentrações nanomolares, pode levar a alterações na síntese protéica e afetar de forma generalizada outros sistemas hormonais, como àqueles do sistema simpático, a exemplo das catecolaminas, da acetilcolina, PAN, endotelina I, óxido nítrico, aldosterona e SRA (SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2007). Todas essas alterações, a nível central e periférico, contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial.

Os efeitos hipertensores dos hormônios da adrenal ainda não estão relacionados conclusivamente com a habilidade de provocar a inibição da atividade da NKA (MANUNTA, HAMILTON & HAMLIN, 2001). No músculo cardíaco, a inibição da NKA resulta na inibição iônica de sódio e potássio, aumento na contratilidade cardíaca

(BRACE et al., 1974; WALLICK, LANE & SCHWARTS, 1979), vasoconstrição (VATNER et al., 1971), aumento dos agentes vasoativos (BRENDER, STRONG & SHEPHERD, 1970) e aumento da pressão arterial (VATNER et al., 1971). Esses efeitos, possivelmente, acontecem se a diurese não acontecer (VATNER et al., 1971)

No entanto, devido ao fato de os bufodienolídeos apresentarem afinidade pela isoforma $\alpha 1$ da enzima, estes evidenciam efeitos natriuréticos e pressóricos. Esse efeito pressórico é importante no sentido de aumentar a pressão glomerular e tubular e, com isso, aumentar a excreção urinária de sódio. Contudo, o aumento constante da pressão arterial leva a alterações fisiológicas e bioquímicas intracelulares preocupantes (FEDOROVA et al., 2001).

A infusão de OUA (MANUNTA et al., 2000), BUF (PAMNANI et al., 1991) ou MBG (ELKAREH et al., 2007) por muitas semanas mostrou relação positiva com a hipertensão em ratos. MBG causou rápida e forte vasoconstrição na preparação de aorta isolada de rato, enquanto OUA produziu um fraco efeito (BAGROV et al., 1995). Fedorova et al. (2006) demonstraram que PAN reduz a sensibilidade da NKA à MBG, mas não à OUA na aorta e aumenta o efeito inibitório nos túbulos medulares.

Muitos estudos suportam a idéia de que a inibição da bomba do sódio não seja necessária para o efeito inotrópico dos glicosídeos cardíacos no miocárdio (NOBLE, 1980). Através de Xie & colaboradores (XIE & ASKARI, 2002; XIE & CAI, 2003), começou-se a entender como concentrações nano e subnanomolares de glicosídeos cardíacos endógeno e exógeno podia provocar aumento no inotropismo do músculo cardíaco, proliferação e diferenciação celular. Ao contrário, a bomba de sódio pode usar todas as suas isoformas, através do sinalossoma, para transduzir a informação da sua ligação com HEA para o interior da célula e do núcleo celular (SHONER & SCHEINER-BOBIS 2007). O sinalossoma está localizado na estrutura caveolar (Figura 11) (DANIEL, EL-YAZBI & CHO, 2006) e pode transferir os sinais para o interior celular quando a bomba está incapaz de exercer sua função (LIANG et al., 2006). As cavéolas também podem se associar com moléculas que manipulam o cálcio. A ligação dos sinalossomas aos HEA pode provocar a ativação e fosforilação dos canais de cálcio e/ou do trocador Na^+/Ca^{2+} e dessa forma aumentar o inotropismo cardíaco (MOHAMMADI et al., 2001)

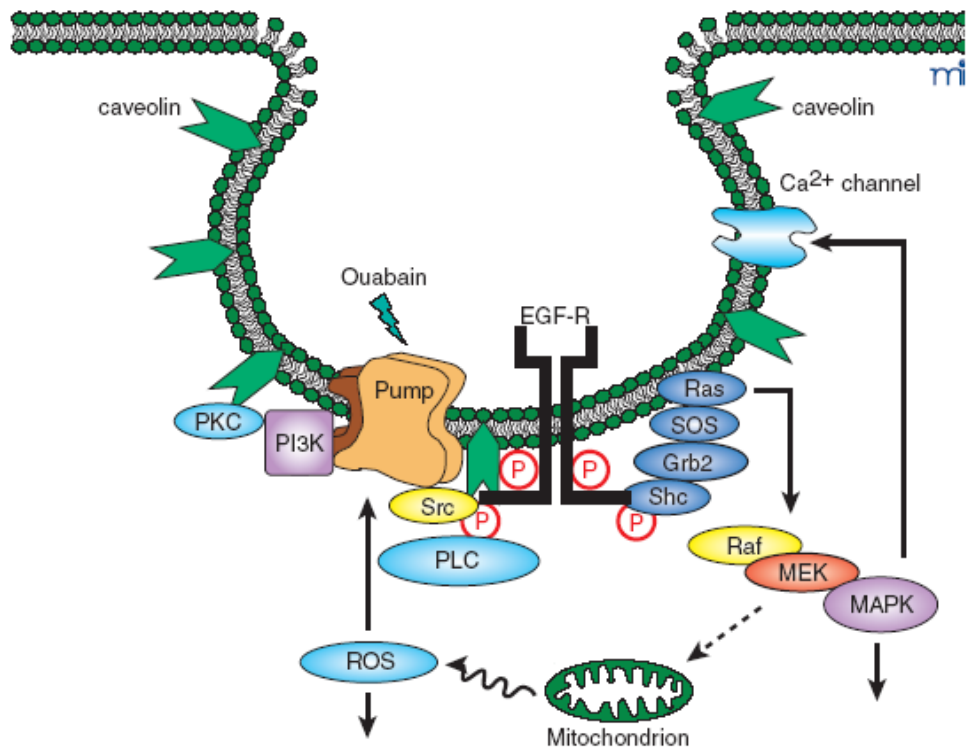


Figura 11. Estrutura do sinalossoma ligada à bomba de sódio.

Fonte: Xie & Cai, 2003.

JUSTIFICATIVA

3. Justificativa

A avaliação dos efeitos renais causados pelo bufodienolídeos é muito difícil devido ao fato dos efeitos sistêmicos serem potentes sobre o sistema vascular e poderem se sobrepor à inibição da NKA renal. Além do mais, a inibição das isoformas da NKA neural, cardíaca, vascular e renal tem grande impacto no débito cardíaco aumentando indiretamente a diurese. Ademais, os níveis circulantes de noradrenalina aumentam com a administração sistêmica dos esteróides cardiotônicos e estes interagem positivamente para incrementar a natriurese com angiotensina 2 e com o peptídeo natriurético, de tal sorte que estudar seus efeitos próprios *in vivo* torna-se bastante complicado. Outro aspecto a se ressaltar quanto à originalidade e importância do presente estudo, é que a ação dos hormônios esteróides da adrenal, nos estudos realizados até o presente momento, por vários grupos no mundo, se correlaciona apenas de maneira indireta aos efeitos natriuréticos. Por exemplo, a maioria das pesquisas se baseia na administração de anticorpos, não pela administração *per se* dos hormônios e verificação de atividade e dose-dependência. Portanto, sem esclarecer de fato a função isolada dos hormônios, BUF, MBG, OUA, e TBG no rim. Somado a essa questão, não há estudos que determinam a atividade desses hormônios *in vivo*, levando em consideração a hemodinâmica renal, de modo a esclarecer se os efeitos natriuréticos são resultantes de uma ação renal intrínseca ou secundária ao aumento do débito cardíaco e à natriurese pressórica. Considerando os aspectos hemodinâmicos, a administração de doses distintas de bufodienolídeos (BUF, MBG, OUA, e TBG) e a análise em rim perfundido, se buscou uma melhor caracterização dos seus efeitos na função glomerular e tubular renal, já que os vários estudos feitos para determinar a pressão e a eficiência do fluxo sanguíneo renal sob várias condições, não conseguiram ainda determinar a contribuição individual do mecanismo desses hormônios na função renal.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral:

Analisar os efeitos de um cardenolídeo (ouabaína) e três bufodienolídeos (bufalina, marinobufagina e telocinobufagina) identificados em animais e no homem como hormônios esteróides endógenos sobre a atividade da NKA renal e das implicações diretas dessa atividade na função glomerular e tubular renal em ratos normotensos.

4.2. Objetivos Específicos:

Avaliar os efeitos diretos de diferentes hormônios como bufalina, marinobufagina e telocinobufagina e ouabaína (1, 3, 10 μ M) em rins isolados de ratos normotensos;

Analisar os efeitos desses hormônios na hemodinâmica renal de ratos normotensos anestesiados;

Verificar o papel da via metabotrópica NKA-src-quinase-ERK, como o uso do bloqueador específico de src-quinase, PP2 (10 μ M).

MATERIAL E MÉTODOS

5. Materiais e Métodos

Todos os protocolos a serem descritos para avaliação biológica foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa envolvendo animais da UECE e receberam parecer favorável através do processo nº 47/2009 (09172555-0).

5.1. Características Animais

Foram utilizados ratos normotensos Wistar, machos com 8 semanas pesando entre 200-250g (n=6/cada grupo), mantidos no biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará a uma temperatura de 28 °C no ciclo de 12 horas claro-escuro recebendo livremente água da torneira e ração industrializada .

5.2. Drogas e Reagentes

Os compostos OUA foram obtidas da Fluka Biochemika e a BUF, MBG e TBG a partir da secreção da pele de *Rhinella Jimi* (CHAPARRO et al., 2001). As frações foram purificadas por cromatografia líquida de alta performance e as estruturas estabelecidas por ressonância magnética nuclear. Essas substâncias foram diluídas em DMSO e a concentração final desse veículo no perfusato do rim foi de 0,1%.

5.3. Obtenção dos Esteróides Cardiotônicos

Os bufodienolídeos foram isolados do veneno bruto do sapo *Rhinella Jimi* (CHAPARRO et al., 2007). Estas substâncias foram purificadas em grandes quantidades usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) .

HPLC foi realizado utilizando-se de 1,7 mL da fração sobrenadante do veneno bruto, ressuspendido previamente em etanol (1/5; p/v), utilizando-se uma coluna preparativa de fase reversa C18 (Shim pack prep. ODS 2,5 x 30 cm) com um fluxo de 5 mL/min e uma eluição com gradiente de acetonitrila de 0 - 60%. Os picos obtidos foram coletados, liofilizados e estocados a - 25° C.

Em 11B, é mostrado um cromatograma de HPLC realizado para uma alíquota do pico P2 purificado, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C18 (Shim pack ODS 0,5

x 15 mm), eluída com um fluxo de 1 mL/min em um gradiente de acetonitrila de 0 - 60%, para confirmação do grau de pureza. O mesmo grau de pureza foi obtido com P3 e P4 (dados não mostrados).

As estruturas dos compostos foi elucidada de maneira definitiva por uma combinação de técnicas espectrométricas como infravermelho, espectrometria de massa e uma combinação de ressonância magnética (H^1 e C^{13}) nuclear uni e bidimensional de maneira independente na Universidade Federal do Ceará (pelo prof. Edilberto da Rocha Silveira) e na Universidade Federal do Rio de Janeiro (pelo prof. Roland Kaiser). As estruturas foram deduzidas como P2 = 3,5,14-trihidroxibufa-20,22-dienolídeo (telocinobufagina); P3 = 3,5-dihidroxi-14,15-*epoxi* bufodienolídeo (MBG) e P4 = 3,14-dihidroxi-5 β -bufa-20,22-dienolídeo (BUF). Estas substâncias foram diluídas em DMSO e a concentração final deste veículo no perfusato renal foi de 0,1%. A OUA foi obtida da empresa *Fluka Chemia-Biochemika (Buchs, Switzerland)* e diluída também em DMSO na mesma proporção que os demais esteróides.

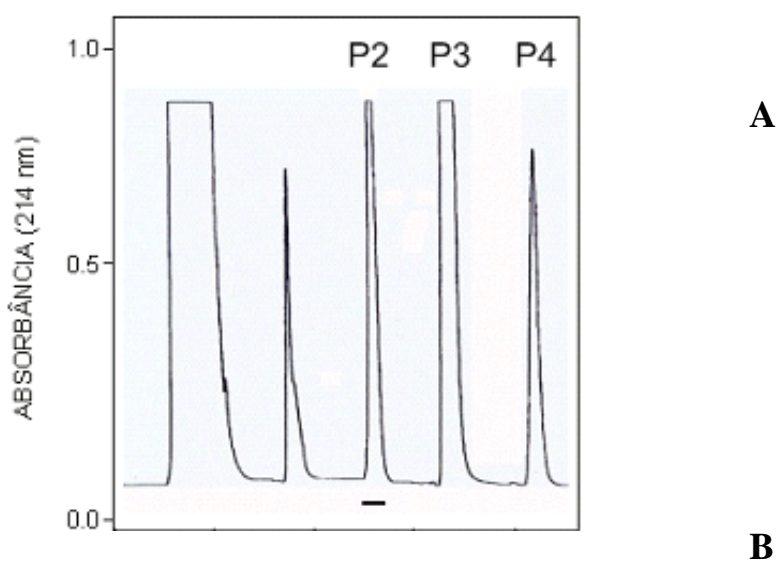


Figura 12. Perfil de eluição das frações 2 (telocinobufagina), 3 (marinobufagina) e 4 (bufalina) obtida do veneno de *Rhinella jimi*.

5.4. Perfusão Renal *ex vivo*

5.4.1. Preparação do Perfusato

Ratos normotensos Wistar pesando entre 250-300g foram anestesiados com a mistura de xilazina (10 mg/Kg; i.p) e cetamina (90 mg/Kg; i.p) e mantidos em mesa

cirúrgica aquecida (37° C). Após abertura da cavidade abdominal, foi implantado um catéter de polietileno (PE 20) e após a dissecação da artéria renal e mesentérica superior, o rim direito foi preparado para perfusão após dissecação cuidadosa, e inserção de uma cânula através da artéria mesentérica superior, sem interrupção de fluxo, como descrito por Bowman (1970) e modificado por Fonteles et al. (1983).

O perfusato consistiu de uma solução Krebs-Henseleit modificada (MKHS), adicionada de 6g% de albumina e com a seguinte composição (em mM): 118 NaCl, 1,2 KCl, 1,18 KH₂PO₄, 1,18 MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂.2H₂O e 25 NaHCO₃. Imediatamente antes do início de cada experimento, uréia (0.1g%), inulina (0,05g%) e glicose (0.05g%) foram adicionadas à solução de perfusão, a qual, após o ajuste do pH para 7,4 foi introduzida no reservatório do sistema de perfusão (Figura 13).

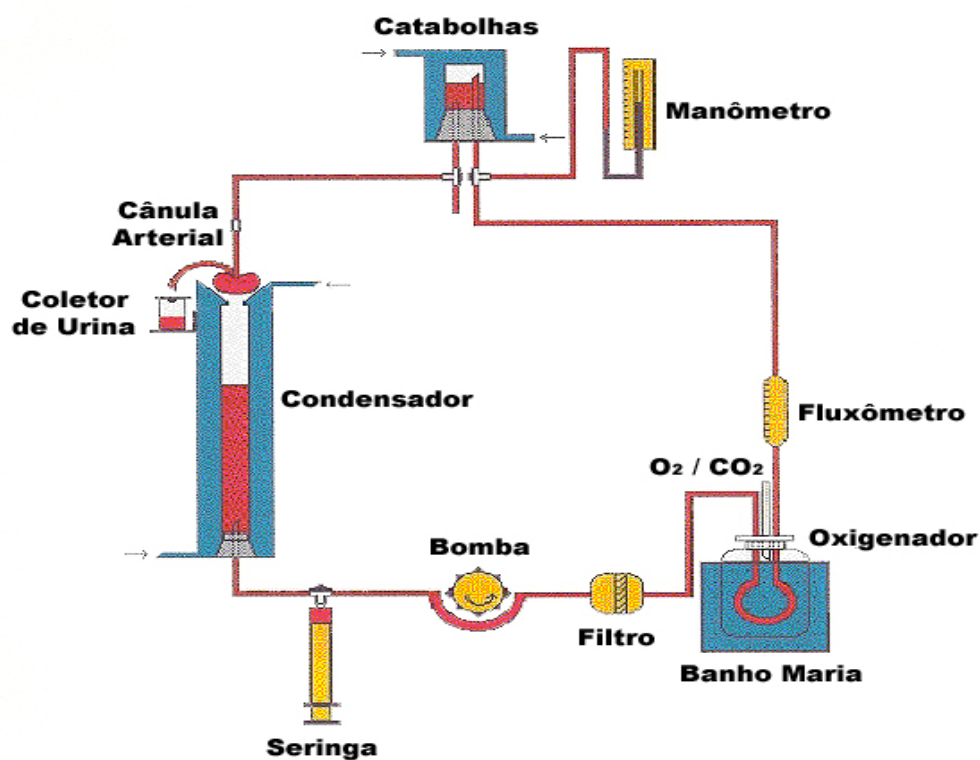


Figura 13. Sistema de Perfusão Renal.

Fonte: Fonteles et al., 1983.

5.4.2. Protocolo Experimental

Terminado o período de 20 minutos (permitido para adaptação do rim às novas condições de perfusão), os experimentos foram executados em um tempo total de 120 minutos. Os hormônios Bufalina, Marinobufagina, Ouabaína e Telocinobufagina (1µM,

3 μ M e 10 μ M) foram adicionadas em experimentos independentes após 30 minutos do início do experimento. A cada dez minutos, conforme mostrado na escala experimental (figura 14), amostras de urina e perfusato, foram coletadas para determinação dos níveis de sódio e de potássio.

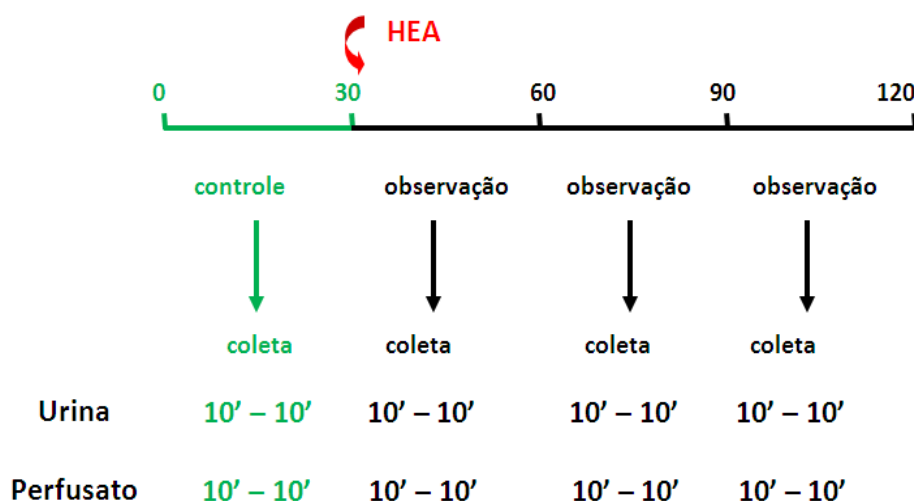


Figura 14. Escala experimental de observação quando adicionado os hormônios bufalina, marinobufagina, ouabaína, telocionobufagina (1 μ M, 3 μ M e 10 μ M) no sistema de perfusão.

O hormônio Bufalina (1 μ M, 3 μ M e 10 μ M), diferente dos demais hormônios, foi adicionado um bloqueador de src-quinase (PP2) no início do experimento e após 30 minutos a bufalina ao sistema de perfusão para avaliação do efeito da via de sinalização deste hormônio. A cada dez minutos, conforme mostrado na escala experimental (figura 15), amostras de urina e perfusato, foram coletadas para determinação dos níveis de sódio e de potássio.

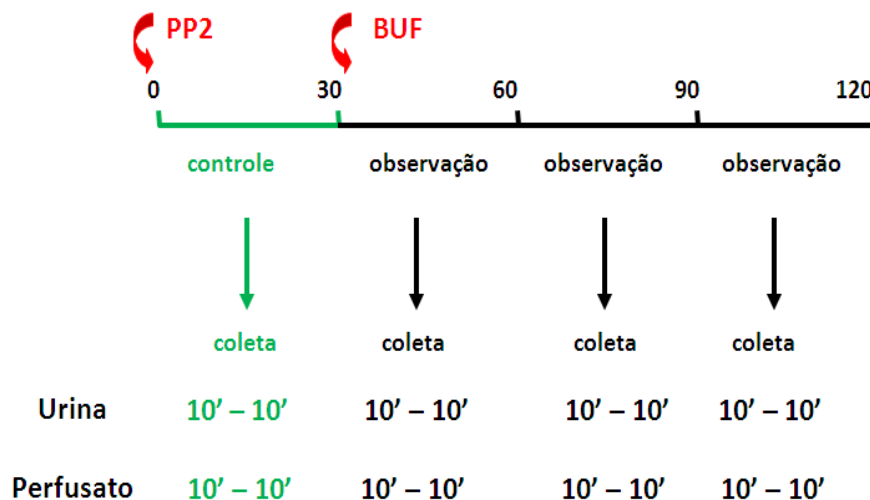


Figura 15. Escala experimental de observação quando adicionado o hormônio Bufalina ($1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) associada a um bloqueador de src-quinase (PP2) no sistema de perfusão.

Os níveis de inulina foram analisados de acordo com Martins et al. (2003) e Bowman (1970). Foram determinados também os parâmetros de pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), RFG e FU (Martinez-Maldonado e Opava-Stitzer, 1978). Os resultados foram comparados com um grupo-controle interno, e um grupo-controle externo, este tratado com o veículo (DMSO a 0,5% na solução de Krebs modificada).

5.5. Hemodinâmica renal *in vivo*

Para realização desse protocolo, ratos Wistar machos (200-250g) foram mantidos em jejum por um período de 24 horas, com livre acesso à água. Os animais foram anestesiados com cetamina (90mg/kg) e xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal, segundo as diretrizes éticas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e mantidos em sistema de placa aquecedora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Narco Biosystems, Houston, TX, USA) com registros periódicos da temperatura retal para controlar e manter a variação entre $36,5$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A seguir os animais foram traqueostomizados e receberam o implante de um catéter de polietileno (PE 20) na carótida para coleta de sangue e registro de pressão arterial, por intermédio de transdutores P23 Statham, (Gould, Oxnard, CA, USA). Um registro inicial (basal) da frequência cardíaca foi feito por aproximadamente

dois minutos. Imediatamente foi coletado sangue da carótida, através de um microtúbulo capilar com heparina (60µl), para mensurações iniciais de hematócrito (Hct₀) e proteínas plasmáticas.

A veia femoral foi também canulada a (PE10) para infusão dos marcadores, soro homólogo de rato e dos hormônios (MBG, OUA e TBG) nas taxas de 10, 30 ou 100nmoles/Kg/min. O protocolo experimental para avaliação dos efeitos dos hormônios se baseou no seguinte método: após estabilização do animal, 1 hora após a cirurgia, foi feito um período controle de 30 minutos com cálculo do clearance da inulina e PAH (período pré-infusão), em seguida feito infusão dos hormônios durante 30 minutos e recalculados os clearances (período de infusão) e depois interrompida a infusão e feito mais 30 minutos de coleta para análise dos clearances (período pós-infusão- “washout”).

Os capilares de heparina foram centrifugados para separação do soro e coagulado e então clivados na linha de separação desses dois componentes. Do plasma coletado, 20µl foi diluído em 500µl de água destilada e então se acrescentou 20µl de ácido tricloroacético (TCA) 10% com repouso subsequente de 10 minutos com a finalidade de favorecer a proteólise. Em seguida, centrifugou-se esse material por 15 minutos e armazenou-se o sobrenadante.

As concentrações plasmáticas e urinárias de inulina e PAH foram dosados por colorimetria para estimação da taxa de filtração glomerular e fluxo plasmático renal, respectivamente (FUHER et al., 1955; SMITH et al., 1945). O método de determinação, a cor desenvolvida e o comprimento de onda da inulina e PAH, são respectivamente: resorcinol (0,1%) e dehidrocloreto de etileno-diamina (NED) (0,1%); cor vermelha e magenta; 490 e 540nm (ALVING; MILLER, 1962; SZAKACS.; BAROWSKY, 1962).

A fração de filtração foi calculada pela fórmula: Taxa de Filtração Glomerular (RFG)/ Fluxo Plasmático Renal (RPF) x 100. A concentração de sódio e potássio no plasma e urina foi determinada utilizando-se fotometria de chama (Flame Photometer, Instrumentation Laboratories, Lexington, MA, USA). A excreção fracional de sódio (F% Na⁺) foi calculada utilizando-se a fórmula: $(V \times [Na^+]_u / [Na^+]_p \times GFR) \times 100$; onde V significa o fluxo urinário, [Na⁺]_u significa a concentração urinária de sódio e [Na⁺]_p significa a concentração plasmática de sódio (GOMES et al., 2005). A osmolaridade urinária e a concentração de proteína na urina foram determinadas em amostras de urina obtidas de animais mantidos em gaiola metabólica pelo método de Bradford após

precipitação com TCA e a osmolaridade medida por osmômetro de pressão de vapor (Wescor 5100C, Logan, UT, USA).

5.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos para cada grupo (BUF, MBG, OUA e TBG). As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando teste t-Student pareado (quando comparado ao controle-interno aos 30 minutos) e não-pareado (quando comparado com grupo controle-externo tratado somente por DMSO). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

As curvas de inibição foram plotadas utilizando análise computadorizada de regressão não-linear dos dados (Prism[®], GraphPad Software Inc., version 5).

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Perfusão Renal *ex vivo*

6.1.1. Efeito da Bufalina na Filtração Glomerular

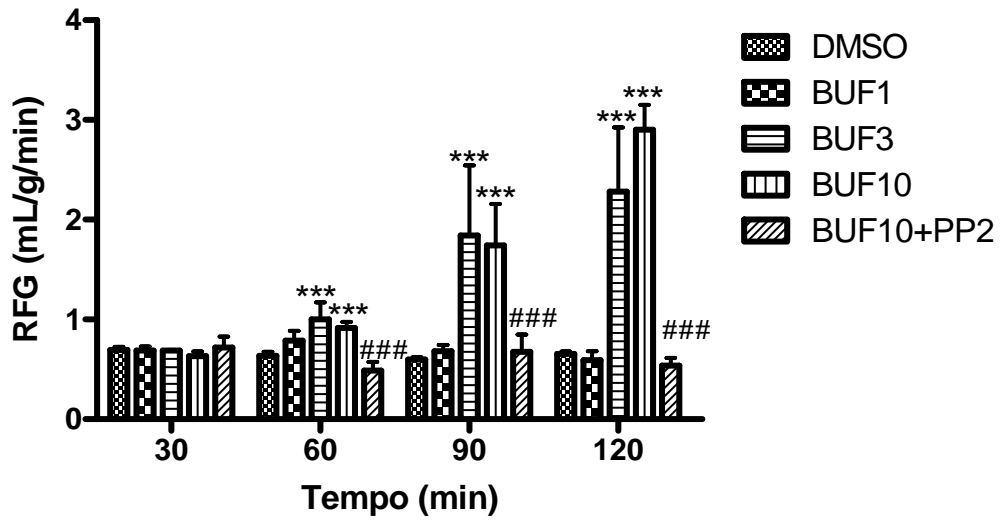


Figura 16. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e sua ação efeito quando associada a um bloqueador de src-quinase (PP2) no ritmo de filtração glomerular. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO; # $p < 0,05$ vs. BUF10.

A BUF aumentou o RFG logo no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. A concentração de 1 μ M (RFG₆₀= 0,78 \pm 0,09; RFG₉₀= 0,68 \pm 0,06; RFG₁₂₀= 0,59 \pm 0,08) não foi capaz de aumentar o RFG em relação ao grupo controle DMSO (RFG₆₀= 0,63 \pm 0,04; RFG₉₀= 0,59 \pm 0,02; RFG₁₂₀= 0,65 \pm 0,02). As concentrações de 3 μ M (**RFG₆₀= 1,00 \pm 0,17; *** RFG₉₀= 1,80 \pm 0,70; *RFG₁₂₀= 2,28 \pm 0,64) e 10 μ M (***RFG₆₀= 0,91 \pm 0,05; ***RFG₉₀= 1,74 \pm 0,41; **RFG₁₂₀= 2,90 \pm 0,25) induziram aumento significativo no RFG em todos os tempos em relação ao grupo controle DMSO (RFG₆₀= 0,63 \pm 0,04; RFG₉₀= 0,59 \pm 0,02; RFG₁₂₀= 0,65 \pm 0,02), mas é aos 90 e 120min, que fica clara a relação tempo-dependente dessas concentrações. A adição do PP2 (###RFG₆₀= 0,48 \pm 0,08; ####RFG₉₀= 0,67 \pm 0,16; ####RFG₁₂₀= 0,53 \pm 0,07) bloqueou completamente os efeitos da BUF10 μ M no RFG aos 60, 90 e 120min significativamente quando comparado ao grupo controle BUF10 (RFG₆₀= 0,91 \pm 0,05; RFG₉₀= 1,74 \pm 0,41; RFG₁₂₀= 2,90 \pm 0,25) (Figura 16).

6.1.2. Efeito da Marinobufagina na Filtração Glomerular

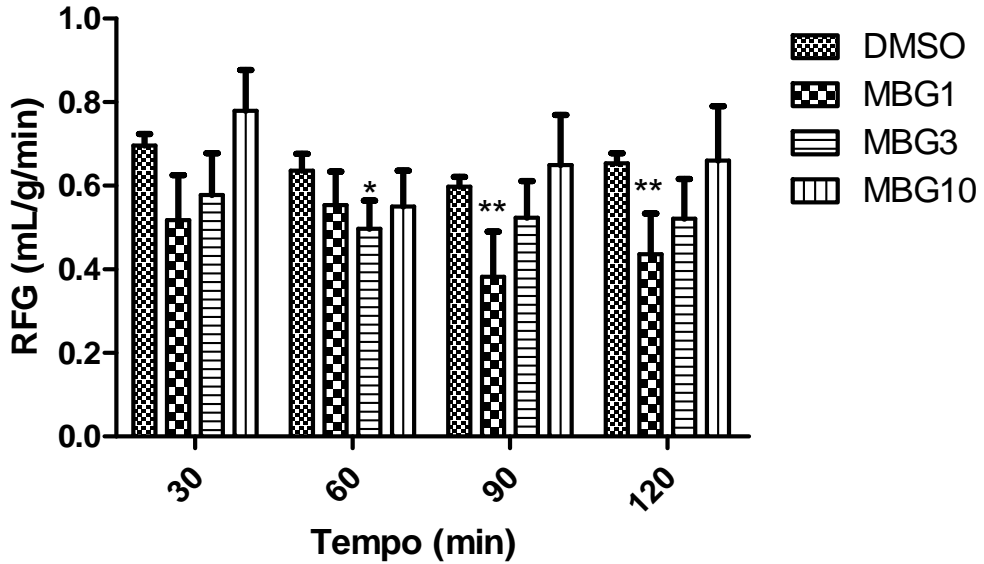


Figura 17. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M no ritmo de filtração glomerular. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO.

A MBG não aumentou o RFG em nenhuma das concentrações observadas (1, 3 e 10 μ M) em qualquer tempo de observação do experimento. Pelo contrário, a concentração de 1 μ M (RFG₆₀= 0,55 \pm 0,08; **RFG₉₀= 0,38 \pm 0,10; **RFG₁₂₀= 0,43 \pm 0,09) diminuiu significativamente o RFG aos 90 e 120min, enquanto a concentração de 3 μ M (*RFG₆₀= 0,49 \pm 0,06; RFG₉₀= 0,52 \pm 0,08; RFG₁₂₀= 0,52 \pm 0,09) diminuiu significativamente o RFG apenas aos 60 em relação ao grupo controle DMSO (RFG₆₀= 0,63 \pm 0,04; RFG₉₀= 0,59 \pm 0,02; RFG₁₂₀= 0,65 \pm 0,02) (Figura 17).

6.1.3. Efeito da Ouabaína na Filtração Glomerular

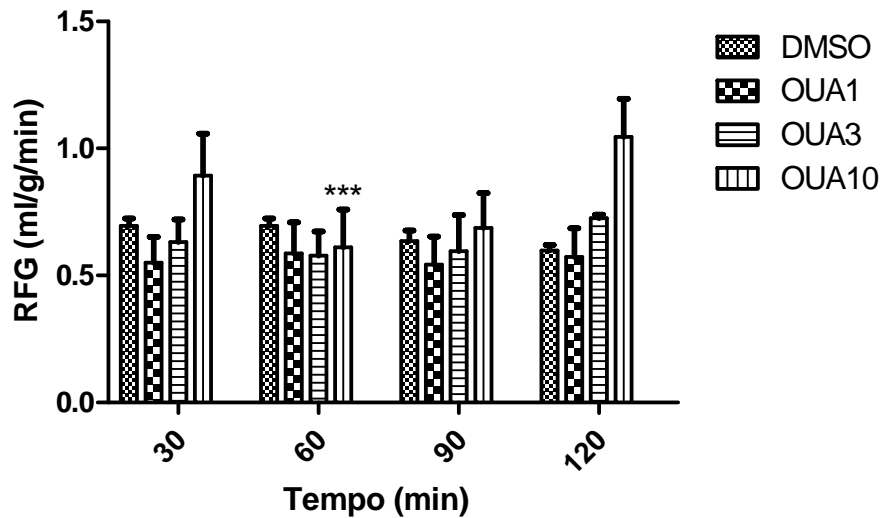


Figura 18. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M no ritmo de filtração glomerular. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. controle interno OUA10.

A OUA demonstrou um efeito marginal no RFG. Aos 60min, na concentração máxima de 10 μ M (***) $RFG_{60} = 0,61 \pm 0,1$ houve uma diminuição significativa no RFG quando comparado ao grupo controle interno OUA10 ($RFG_{30} = 0,89 \pm 0,16$). As demais concentrações (1 e 3 μ M) não produziram efeito positivo no RGF em qualquer dos tempos do experimento. As concentrações de 3 e 10 μ M mostram relação dose-tempo-dependente aos 90 e 120min (Figura 18).

6.1.4. Efeito da Telocinobufagina na Filtração Glomerular

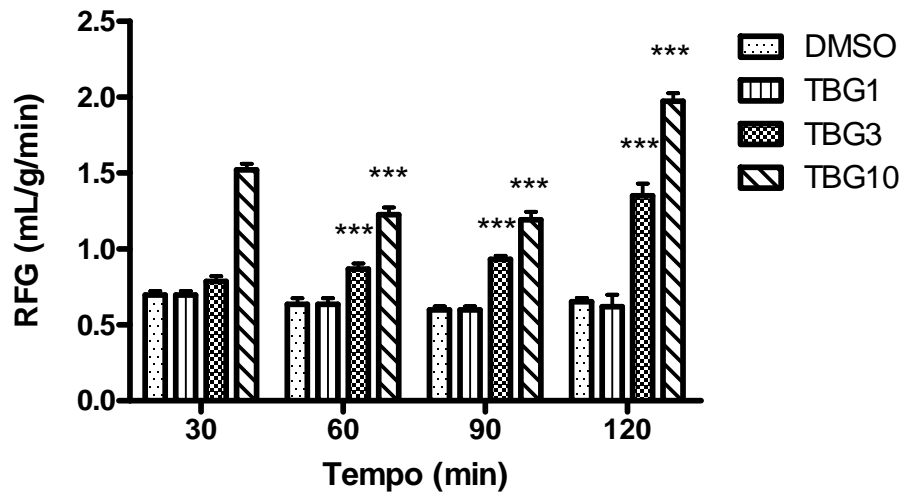


Figura 19. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M no ritmo de filtração glomerular. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO e controle interno TBG10.

A TBG aumentou o RFG a partir do primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. As concentrações de 3 μ M ($^{***}RFG_{60} = 0,86 \pm 0,03$; $^{***}RFG_{90} = 0,93 \pm 0,02$; $^{***}RFG_{120} = 1,35 \pm 0,08$) e 10 μ M ($^{***}RFG_{60} = 1,22 \pm 0,04$; $^{***}RFG_{90} = 1,19 \pm 0,05$; $^{***}RFG_{120} = 1,97 \pm 0,05$) foram capazes de aumentar significativamente o RFG em relação ao grupos controles respectivos, DMSO ($RFG_{60} = 0,63 \pm 0,04$; $RFG_{90} = 0,59 \pm 0,02$; $RFG_{120} = 0,65 \pm 0,02$) e controle interno TBG10 ($RFG_{30} = 1,52 \pm 0,04$). As concentrações de 3 e 10 μ M mostram relação dose-tempo-dependente aos 90 e 120min (Figura 19).

6.1.5. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Filtração Glomerular

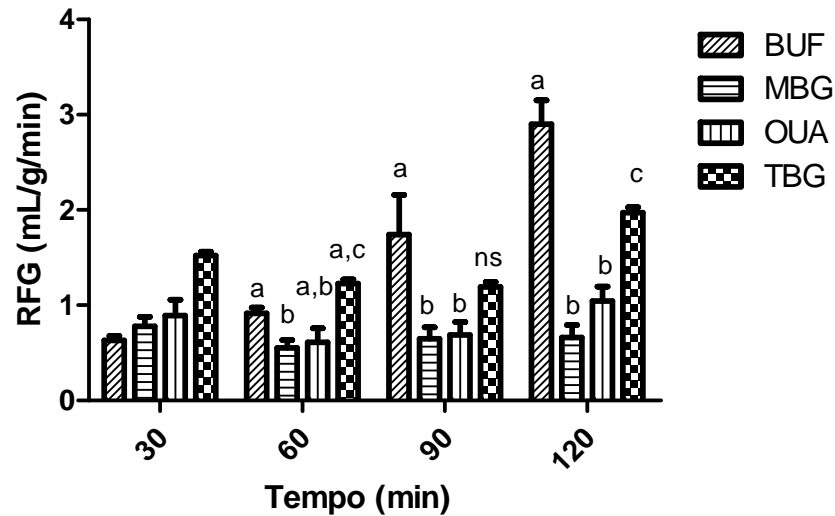


Figura 20. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina ($10\mu\text{M}$) no ritmo de filtração glomerular. Teste Anova seguido de Bonferroni. Letras iguais: não há diferença significativa; letras diferentes: há diferença significativa (a e c, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$); ns: não significativo.

Os HEA na concentração de $10\mu\text{M}$ causaram respostas diferentes no RFG. Aos 60min, a BUF tem um aumento significativo sob a MBG ($*p < 0,05$), mas não para os demais hormônios. Já a TBG tem um aumento significativo sob a MBG ($***p < 0,001$) e OUA ($***p < 0,001$), mas não para BUF. Aos 90 e 120min, a BUF tem um aumento significativo sob a MBG ($*p < 0,05$) e OUA ($*p < 0,05$). Neste mesmo tempo a TBG não mostrou aumento significativo em relação aos outros hormônios. Aos 120min, a BUF aumenta significativamente em relação a TBG ($**p < 0,01$). A BUF, interessante, apresenta um efeito tempo-dependente durante o experimento (Figura 20).

6.1.6. Efeito da Bufalina na Resistência Vascular Renal

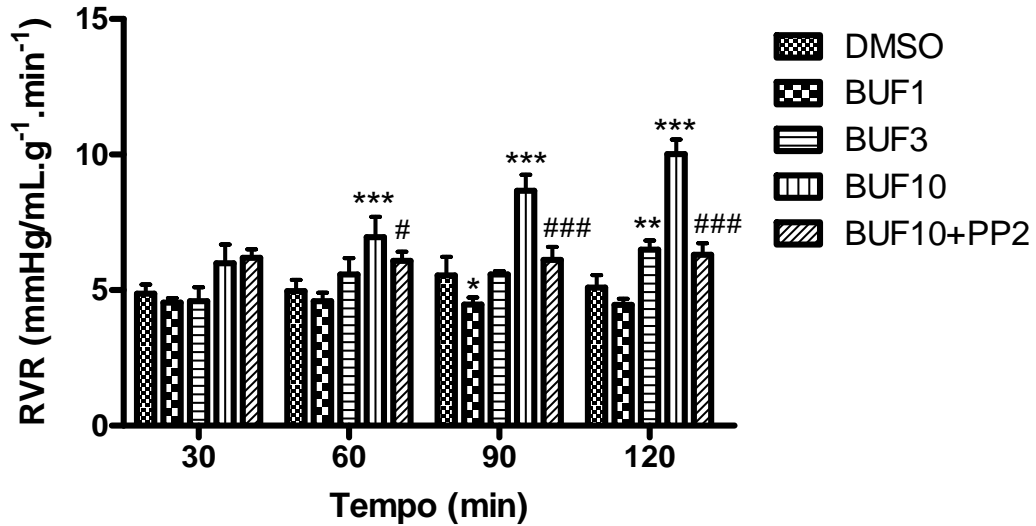


Figura 21. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e sua ação quando associada a um bloqueador de src-quinase (PP2) na resistência vascular renal. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ (BUF1, BUF3 e BUF10 vs. DMSO; # $p < 0,05$ vs. BUF10).

Apenas a BUF na concentração de 10 μ M aumentou a RVR significativamente a partir do primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão (** $RVR_{60} = 6,9 \pm 0,7$; ** $RVR_{90} = 8,6 \pm 0,5$; ** $RVR_{120} = 10,0 \pm 0,5$) em relação ao controle DMSO ($RVR_{60} = 4,9 \pm 0,4$; $RVR_{90} = 5,5 \pm 0,6$; $RVR_{120} = 5,1 \pm 0,4$). A concentração de 3 μ M só aumentou significativamente a RVR aos 120min (** $RVR_{120} = 6,4 \pm 0,3$). Apenas a concentração de 10 μ M demonstra relação tempo-dependente nos três tempos. A adição do bloqueador PP2 bloqueou a RVR significativamente em todos os tempos ($RVR_{60} = 6,0 \pm 0,3$; $RVR_{90} = 6,1 \pm 0,4$; $RVR_{120} = 6,3 \pm 0,4$) quando comparado ao grupo controle BUF10 ($RVR_{60} = 6,9 \pm 0,7$; $RVR_{90} = 8,6 \pm 0,5$; $RVR_{120} = 10,0 \pm 0,5$) (Figura 21).

6.1.7. Efeito da Marinobufagina na Resistência Vascular Renal

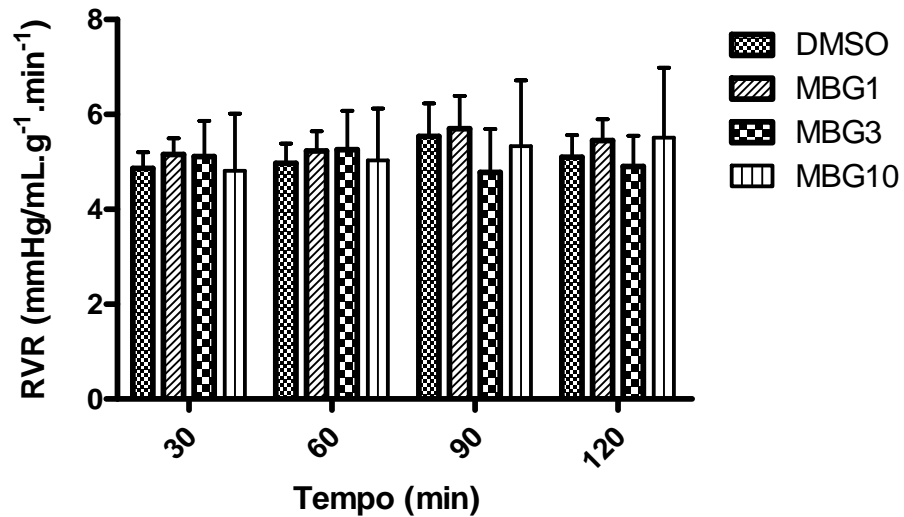


Figura 22. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na resistência vascular renal. Teste Anova seguido de Dunnet.

A MBG não foi capaz de alterar a RVR em nenhuma das concentrações administradas (1, 3 e 10 μ M) em qualquer tempo observado no experimento (60, 90 e 120min) quando comparada ao grupo controle DMSO (Figura 22).

6.1.8. Efeito da Ouabaína na Resistência Vascular Renal

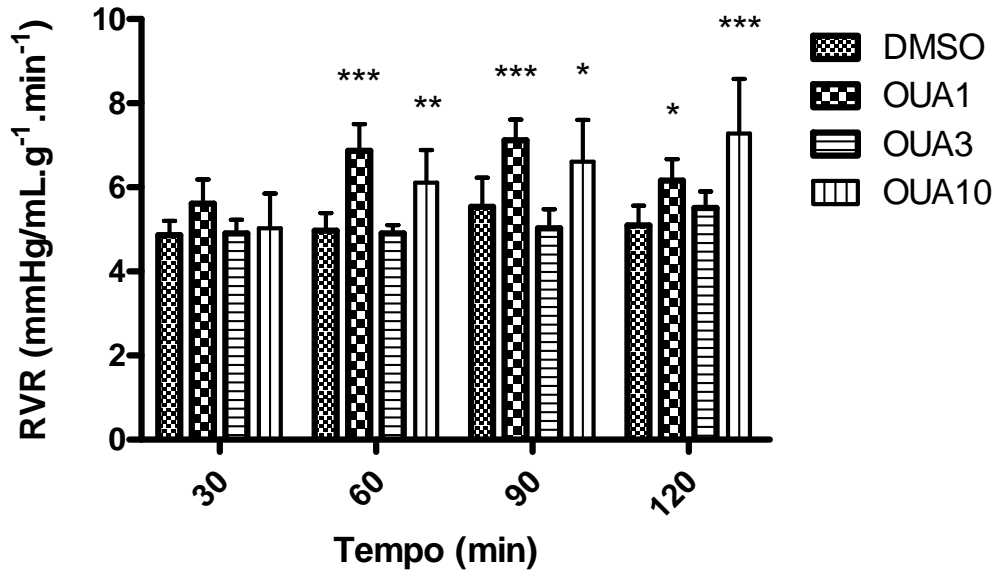


Figura 23. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na resistência vascular renal. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO.

A OUA aumentou a RVR logo no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. A concentração de 3 μ M ($RVR_{60} = 4,9 \pm 0,2$; $RVR_{90} = 5,0 \pm 0,4$; $RVR_{120} = 5,5 \pm 0,3$) não foi capaz de aumentar a RVR ao longo do experimento, no entanto, as concentrações de 1 μ M (** $RVR_{60} = 6,8 \pm 0,6$; ** $RVR_{90} = 7,1 \pm 0,4$; * $RVR_{120} = 6,1 \pm 0,5$) e 10 μ M (* $RVR_{60} = 6,1 \pm 0,3$; * $RVR_{90} = 6,4 \pm 0,4$; ** $RVR_{120} = 7,2 \pm 0,6$) se mostraram significativamente efetiva na RVR nos três tempos em relação ao grupo controle DMSO ($RVR_{60} = 4,9 \pm 0,4$; $RVR_{90} = 5,5 \pm 0,6$; $RVR_{120} = 5,1 \pm 0,4$) (Figura 23).

6.1.9. Efeito da Telocinobufagina na Resistência Vascular Renal

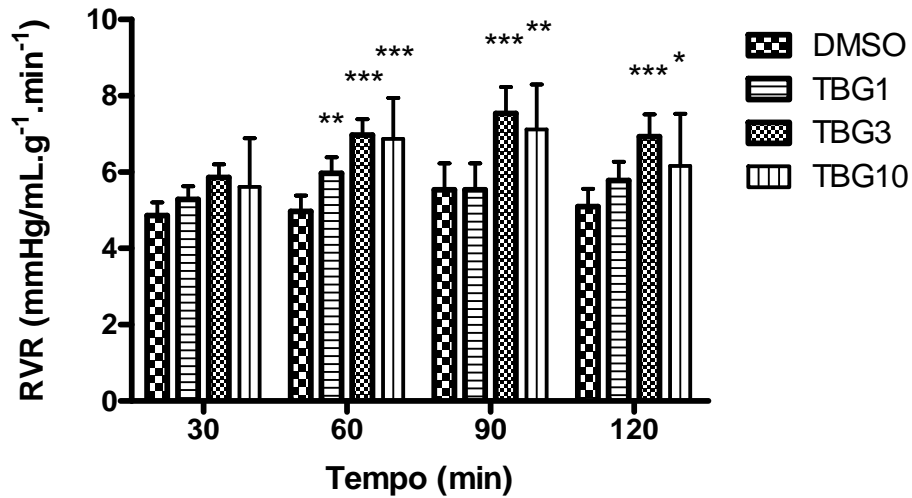


Figura 24. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na resistência vascular renal. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO.

A TBG aumentou a RVR logo no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. A concentração de 1 μ M (** $RVR_{60} = 5,9 \pm 0,4$) só aumenta significativamente em relação ao grupo controle aos 60min. Já as concentrações de 3 μ M (** $RVR_{60} = 6,9 \pm 0,4$; *** $RVR_{90} = 7,5 \pm 0,6$; *** $RVR_{120} = 6,9 \pm 0,5$) e 10 μ M (** $RVR_{60} = 6,8 \pm 0,4$; * $RVR_{90} = 7,1 \pm 0,4$; * $RVR_{120} = 6,1 \pm 0,5$) foram capazes de aumentar a RVR nos três tempos significativamente em relação ao grupo controle DMSO ($RVR_{60} = 4,9 \pm 0,4$; $RVR_{90} = 5,5 \pm 0,6$; $RVR_{120} = 5,1 \pm 0,4$) (Figura 24).

6.1.10. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Resistência Vascular Renal

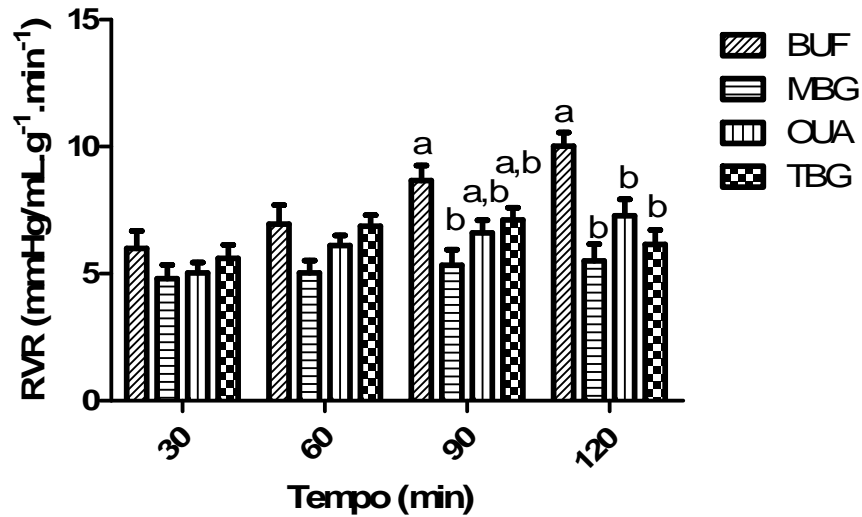


Figura 25. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina ($10\mu\text{M}$) na resistência vascular renal. Teste Anova seguido de Bonferroni. Letras iguais: não há diferença significativa; letras diferentes: há diferença significativa (a, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

A BUF na concentração de $10\mu\text{M}$ aumenta a RVR significativamente aos 90min em relação à MBG ($**p < 0,01$). Aos 120min, a BUF aumenta significativamente em relação à MBG ($***p < 0,001$) OUA ($*p < 0,05$) e TBG ($**p < 0,01$) e mostrou ter efeito tempo-dependente durante o experimento (Figura 25).

6.1.11. Efeito da Bufalina no Fluxo Urinário

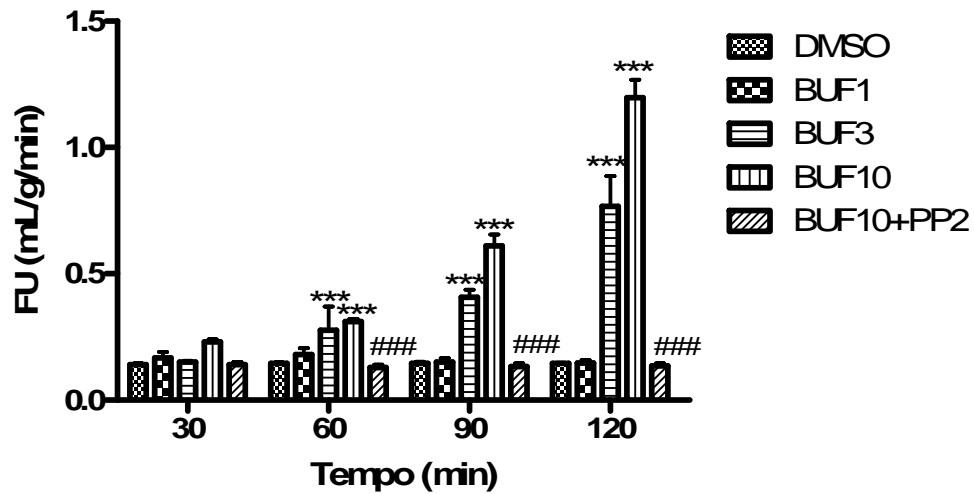


Figura 26. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e sua ação quando associada a um bloqueador de src-quinase (PP2) no fluxo urinário. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ (BUF3 e BUF10 vs. DMSO); # $p < 0,05$ vs. BUF10.

A BUF aumentou o fluxo urinário (FU) a partir do primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. As concentrações de 3 μ M (**FU₆₀= 0,27 \pm 0,09; **FU₉₀= 0,40 \pm 0,02; **FU₁₂₀= 0,76 \pm 0,1) e 10 μ M (**FU₆₀= 0,31 \pm 0,01; **FU₉₀= 0,61 \pm 0,04; **FU₁₂₀= 1,19 \pm 0,07) induziram aumento significativo no FU em todos os tempos, além de mostrar a relação dose-resposta dessas concentrações, quando comparado ao grupo controle DMSO (FU₆₀= 0,14 \pm 0,00; FU₉₀= 0,14 \pm 0,00; FU₁₂₀= 0,14 \pm 0,00). A adição do PP2 bloqueou completamente os efeitos da BUF10 μ M no FU em todos os tempos (###FU₆₀= 0,13 \pm 0,01; ###FU₉₀= 0,13 \pm 0,01; ###FU₁₂₀= 0,13 \pm 0,01) quando comparado ao grupo controle interno BUF10 (FU₆₀= 0,31 \pm 0,01; FU₉₀= 0,61 \pm 0,04; FU₁₂₀= 1,19 \pm 0,07) (Figura 26).

6.1.12. Efeito da Marinobufagina no Fluxo Urinário

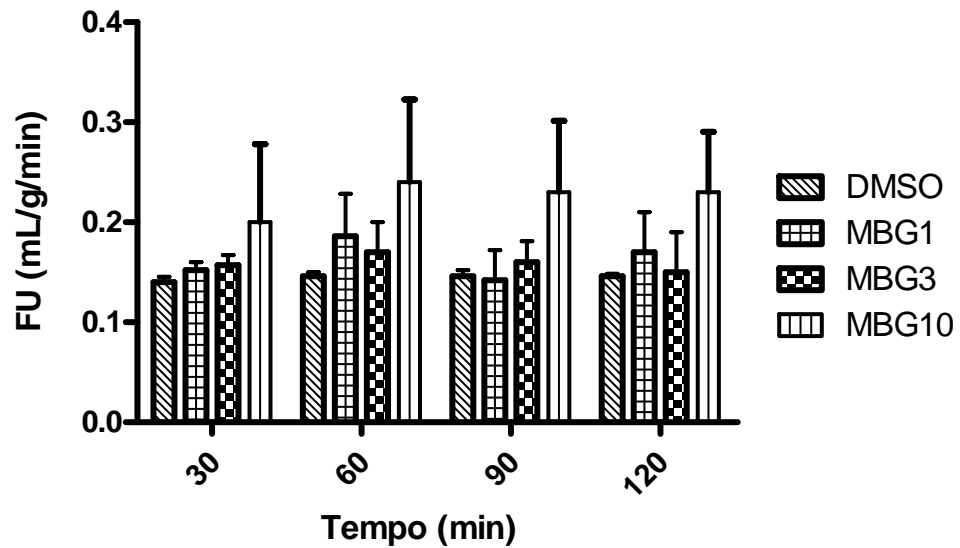


Figura 27. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M no fluxo urinário. Teste Anova seguido de Dunnet.

A MBG não foi capaz de alterar o fluxo urinário (FU) em nenhuma das concentrações administradas (1, 3 e 10 μ M) em qualquer tempo observado no experimento (60, 90 e 120min) quando comparada ao grupo controle DMSO e controle interno MBG10 (Figura 27).

6.1.13. Efeito da Ouabaína no Fluxo Urinário

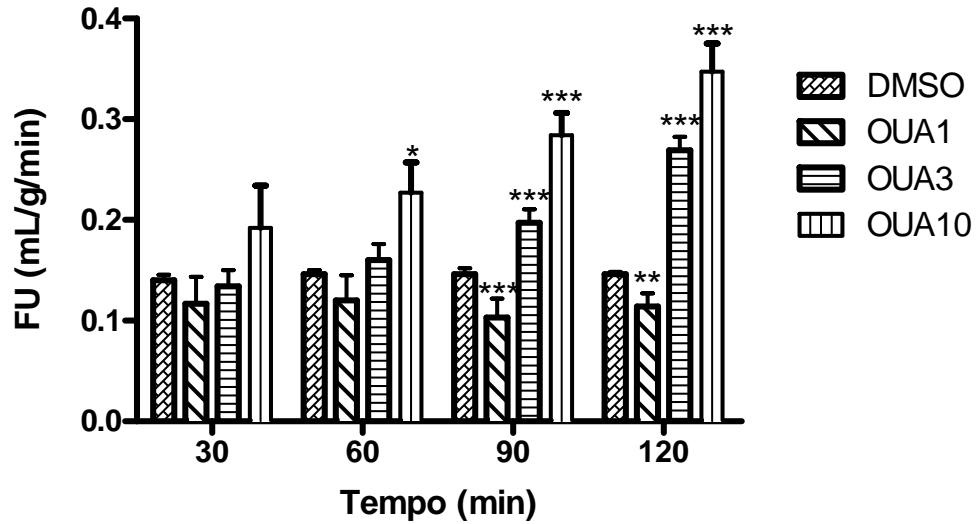


Figura 28. Efeito da ouabaína nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M no fluxo urinário. Teste Anova seguido de Dunnet, *p<0,05vs. DMSO e controle interno OUA10.

A OUA aumentou o fluxo urinário (FU) já no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. As concentrações de 1 μ M (**FU₉₀= 0,10 \pm 0,01; **FU₁₂₀= 0,11 \pm 0,01) e 3 μ M (**FU₉₀= 0,19 \pm 0,01; **FU₁₂₀= 0,26 \pm 0,01) aumentaram o UF significativamente aos 90 e 120min em relação ao grupo controle DMSO (FU₉₀= 0,14 \pm 0,0; FU₂₀= 0,14 \pm 0,0). Já a concentração de 10 μ M (*FU₆₀= 0,22 \pm 0,01; ***FU₉₀= 0,28 \pm 0,01 ***FU₁₂₀= 0,34 \pm 0,01) aumentou significativamente nos três tempos de experimento quando comparada ao grupo controle interno OUA10 (FU₃₀= 0,19 \pm 0,02). Aos 90 e 120min, as concentrações de 3 e 10 μ M demonstrou relação positiva no efeito dose-tempo-dependente nos três tempos de experimento (Figura 28).

6.1.14. Efeito da Telocinobufagina no Fluxo Urinário

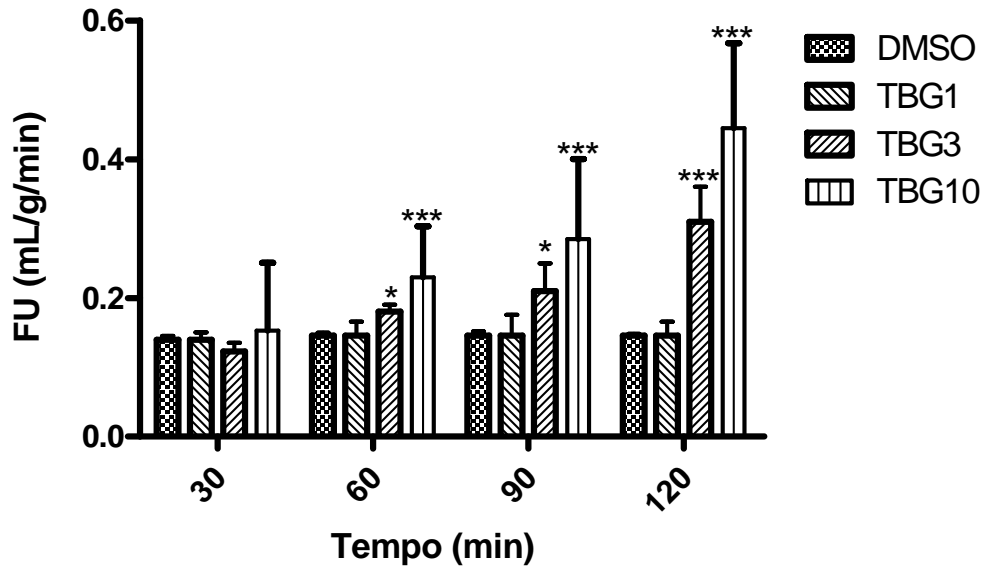


Figura 29. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M no fluxo urinário. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO.

A TBG aumentou o fluxo urinário (FU) já no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. A concentração de 1 μ M ($FU_{60} = 0,14 \pm 0,02$; $FU_{90} = 0,14 \pm 0,03$; $FU_{120} = 0,41 \pm 0,02$) não foi capaz de aumentar a diurese ao longo do experimento, no entanto, as concentrações de 3 μ M (* $FU_{60} = 0,18 \pm 0,01$; * $FU_{90} = 0,21 \pm 0,04$; *** $FU_{120} = 0,31 \pm 0,05$) e 10 μ M (*** $FU_{60} = 0,23 \pm 0,03$; *** $FU_{90} = 0,28 \pm 0,04$; *** $FU_{120} = 0,44 \pm 0,05$), aumentaram significativamente o FU nos três tempos de experimento, além de demonstrar uma relação positiva no efeito dose-tempo-dependente aos 90 e 120min, em relação ao grupo controle DMSO ($FU_{60} = 0,14 \pm 0,04$; $FU_{90} = 0,14 \pm 0,06$; $FU_{120} = 0,14 \pm 0,02$) (Figura 29).

6.1.15. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos no Fluxo Urinário

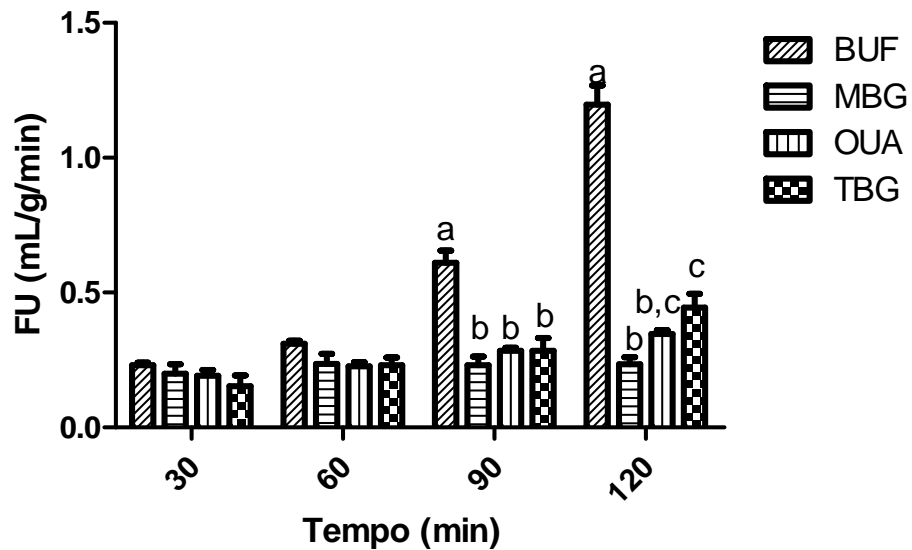


Figura 30. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina ($10\mu\text{M}$) no fluxo urinário. Teste Anova seguido de Bonferroni. Letras iguais: não há diferença significativa; letras diferentes: há diferença significativa (a e c, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

Os HEA na concentração de $10\mu\text{M}$ não produziram diferença significativa no fluxo urinário (FU) no primeiro tempo (60min) de medida após adição dos mesmos ao sistema de perfusão. A BUF aumentou a diurese significativamente aos 90min em relação aos demais hormônios, MBG ($***p < 0,001$), OUA ($**p < 0,01$) e TBG ($***p < 0,001$). Já aos 120min, a BUF aumentou a diurese significativamente em relação aos demais hormônios ($***p < 0,001$), enquanto a TBG aumentou a diurese significativamente em relação à MBG ($*p < 0,05$). A BUF mostrou ter efeito tempo-dependente na diurese durante o experimento (Figura 30).

6.1.16. Índice de Correlação do Efeito da Bufalina no Fluxo Urinário vs. Resistência Vascular Renal

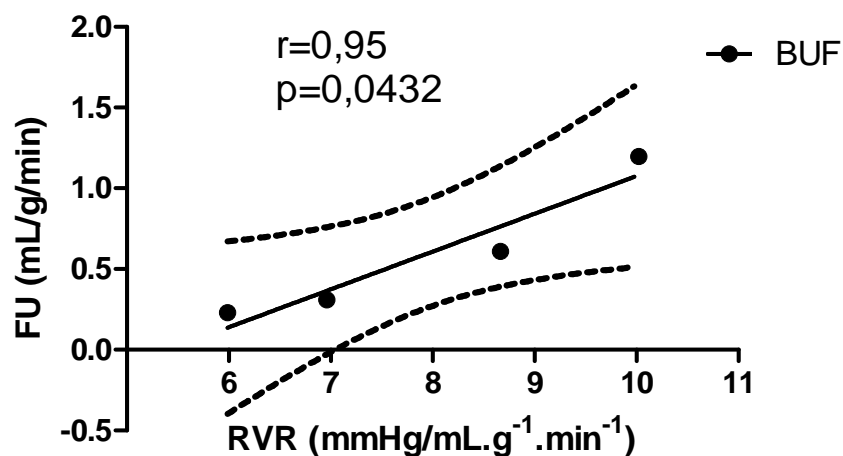


Figura 31. Correlação linear entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal causada pela bufalina (10 μ M), $p < 0,05$.

O gráfico mostra uma correlação positiva ($r= 0,95$) entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal de maneira estatisticamente significativa ($p= 0,0432$) (Figura 31).

6.1.17. Índice de Correlação do Efeito da Ouabaína no Fluxo Urinário vs. Resistência Vascular Renal

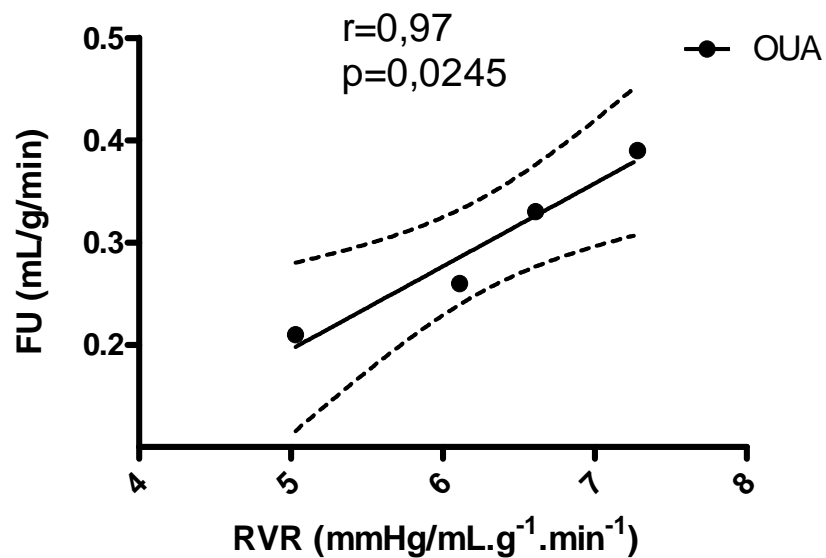


Figura 32. Correlação linear entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal causada pela ouabaína (10 μ M), $p < 0,05$.

O gráfico mostra uma forte correlação ($r = 0,97$) entre o fluxo urinário e a RVR de maneira estatisticamente significativa ($p = 0,0245$) (Figura 32).

6.1.18. Índice de Correlação do Efeito da Telocinobufagina no Fluxo Urinário vs. Resistência Vascular Renal

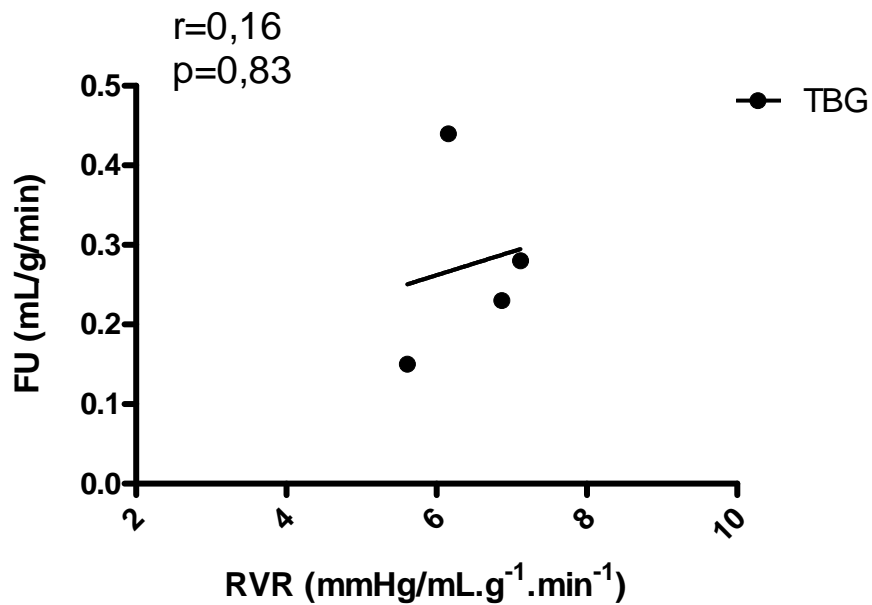


Figura 33. Correlação linear entre o fluxo urinário e a resistência vascular renal causada pela telocinobufagina (10 μ M), $p < 0,05$.

O gráfico mostra uma ausência na correlação ($r = 0,16$) entre o fluxo urinário e a RVR de maneira estatisticamente insignificante ($p = 0,83$) (Figura 31).

6.1.19. Índice de Correlação do Efeito da Bufalina no Fluxo Urinário vs. Ritmo de Filtração Glomerular

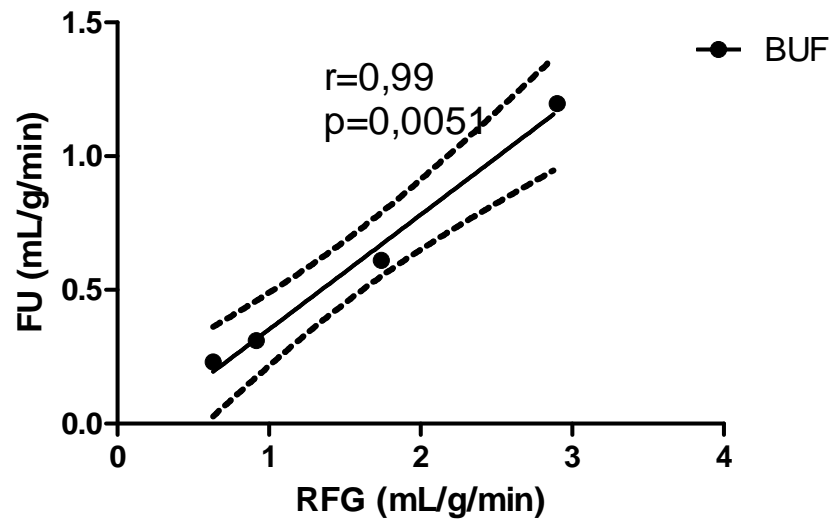


Figura 34. Correlação linear entre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular causada pela bufalina (10 μ M), $p < 0,05$.

O gráfico mostra uma forte correlação ($r = 0,99$) entre o fluxo urinário e o RFG de maneira estatisticamente significativa ($p = 0,0051$) (Figura 34).

6.1.20. Índice de Correlação do Efeito da Ouabaína no Fluxo Urinário vs. Ritmo de Filtração Glomerular

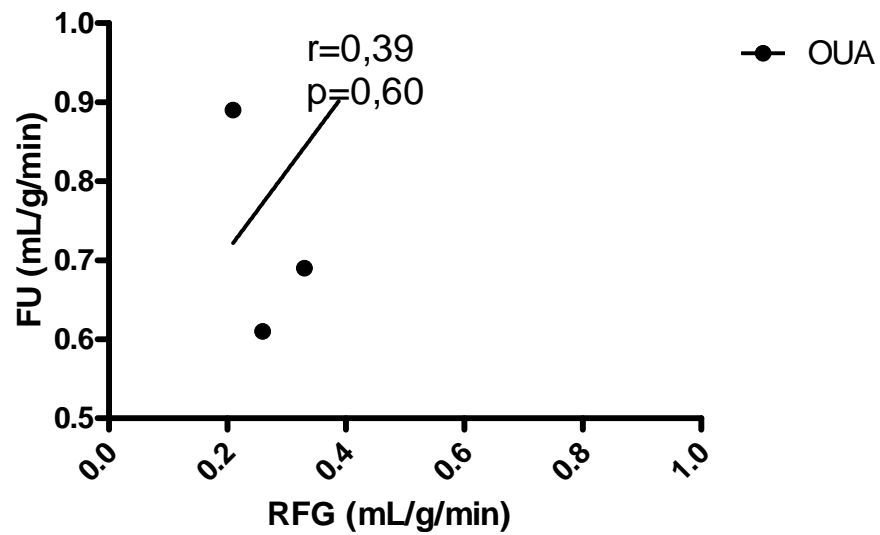


Figura 35. Correlação linear entre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular causada pela ouabaína (10 μ M), $p < 0,05$.

O gráfico mostra uma fraca correlação ($r= 0,39$) entre o fluxo urinário e o RFG de maneira estatisticamente significativa ($p= 0,60$) (Figura 35).

6.1.21. Índice de Correlação do Efeito da Telocinobufagina no Fluxo Urinário vs. Ritmo de Filtração Glomerular

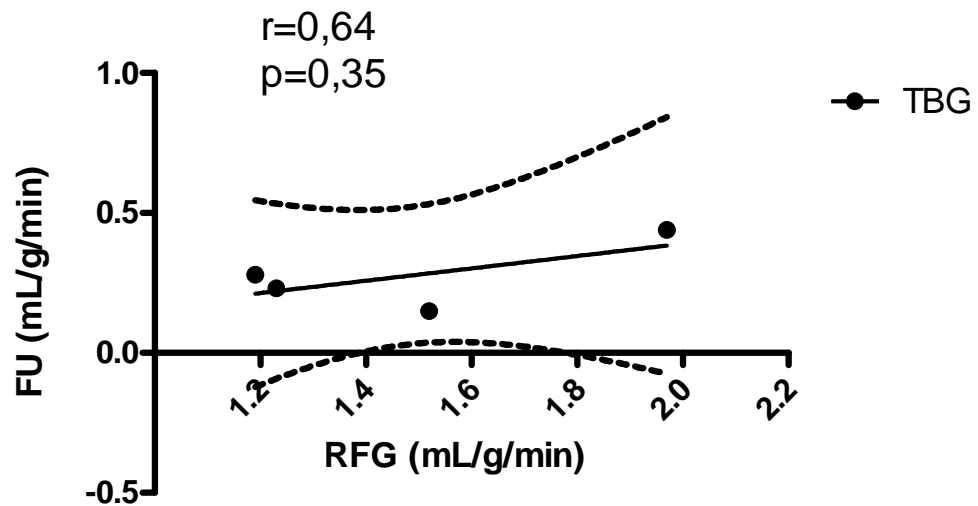


Figura 36. Correlação linear entre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular causada pela telocinobufagina (10µM), $p < 0,05$.

O gráfico mostra uma ausência de correlação ($r= 0,64$) entre o fluxo urinário e o RFG de maneira estatisticamente insignificante ($p= 0,35$) (Figura 36).

6.1.22. Efeito da Bufalina na Natriurese

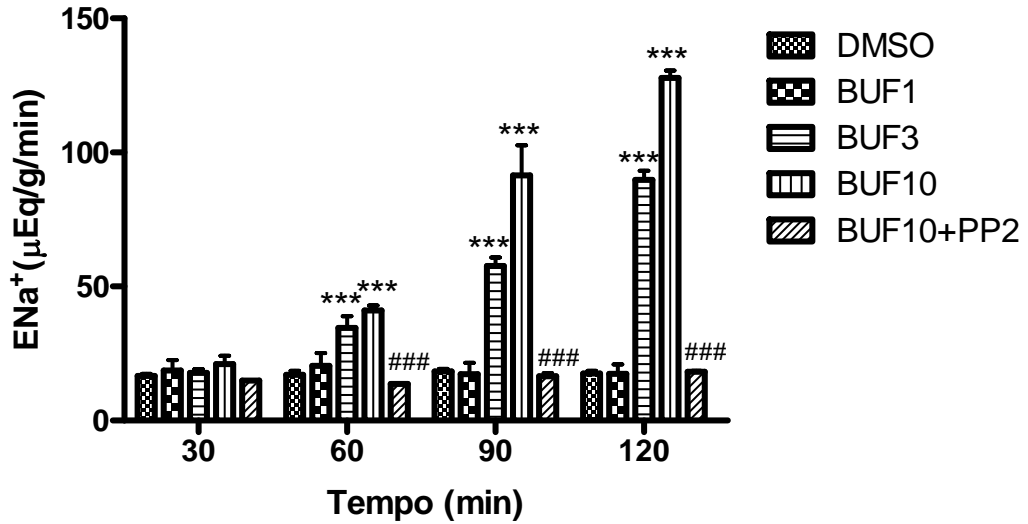


Figura 37. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) na excreção de sódio renal. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs DMSO # $p < 0,05$ vs. BUF10.

A BUF aumentou a natriurese já no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. As concentrações de 3 μ M ($^{***}Na_{60} = 34,5 \pm 4,4$; $^{**}Na_{90} = 57,7 \pm 3,1$; $^{***}Na_{120} = 89,8 \pm 3,3$) e 10 μ M ($^{***}Na_{60} = 41,0 \pm 1,9$; $^{***}Na_{90} = 91,4 \pm 11,2$; $^{***}Na_{120} = 127,8 \pm 2,7$) aumentaram a natriurese nos três tempos do experimento (60, 90 e 120min) relação ao grupo controle DMSO ($Na_{60} = 17,0 \pm 1,54$; $Na_{90} = 18,3 \pm 0,9$; $Na_{120} = 17,5 \pm 1,0$). As concentrações de 3 e 10 μ M demonstram uma relação dose-tempo-dependente aos 90 e 120min. A adição do PP2 ($^{###}Na_{60} = 13,6 \pm 0,1$; $^{###}Na_{90} = 16,6 \pm 1,1$; $^{###}Na_{120} = 18,2 \pm 0,3$) bloqueou a resposta natriurética significativamente da BUF10 em todos os tempos quando comparado ao grupo controle BUF10 ($Na_{60} = 41,0 \pm 1,9$; $Na_{90} = 91,4 \pm 11,2$; $Na_{120} = 127,8 \pm 2,7$) (Figura 37).

6.1.23. Efeito da Marinobufagina na Natriurese

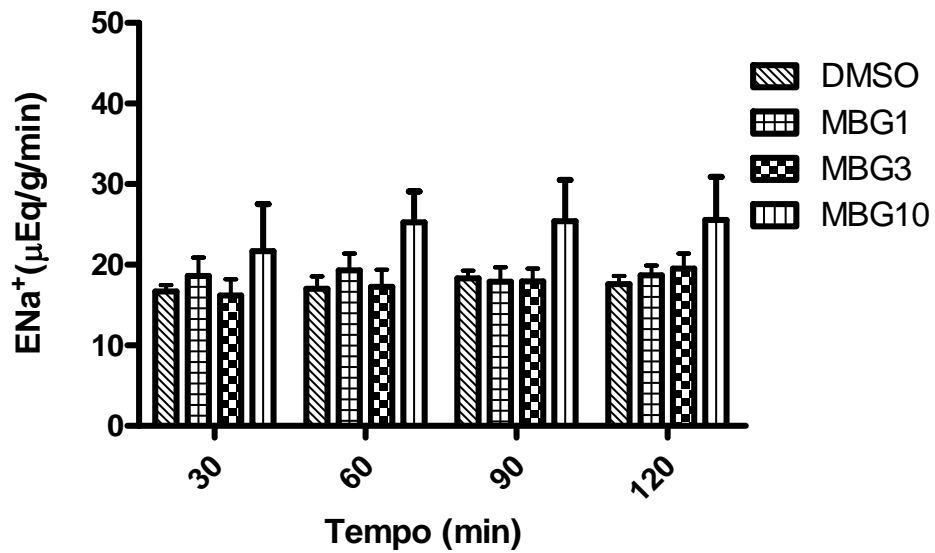


Figura 38. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μM na excreção de sódio renal. Teste Anova seguido de Dunnet,

A MBG não foi capaz de alterar a natriurese em nenhuma das concentrações administradas (1, 3 e 10 μM) em qualquer tempo observado no experimento (60, 90 e 120min) quando comparada ao grupo controle DMSO e controle interno MBG10 (Figura 38).

6.1.24. Efeito da Ouabáina na Natriurese

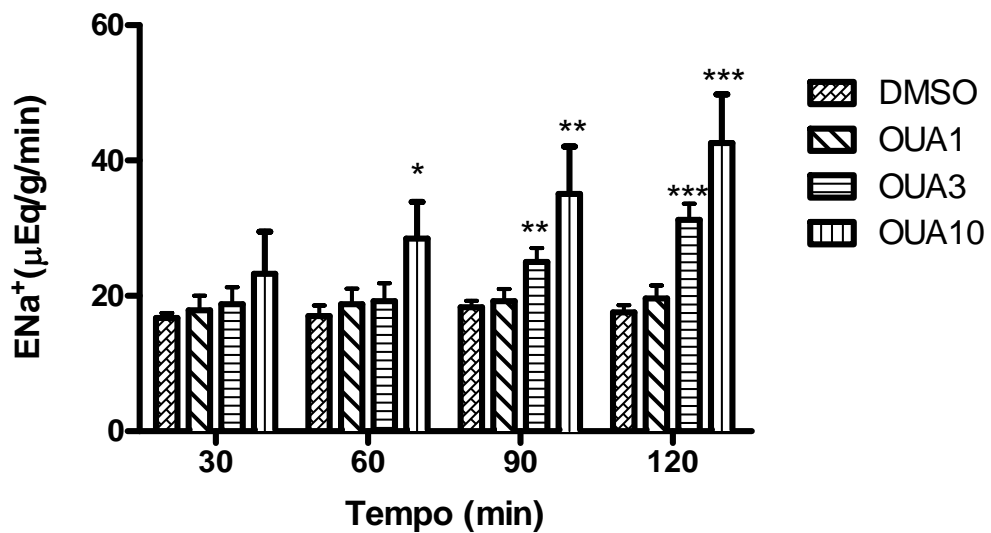


Figura 39. Efeito da ouabáina nas concentrações de 1, 3 e 10μM na excreção de sódio renal. Teste Anova seguido de Dunnet, *p < 0,05 vs. DMSO e controle interno OUA10.

A OUA aumentou a natriurese a partir do primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. A concentração de 3μM (^{**}Na₉₀= 25,0 ± 2,0; ^{***}Na₁₂₀= 31,2 ± 2,4) aumentou a natriurese significativamente aos 60 e 90min em relação quando comparado ao grupo controle DMSO (Na₆₀= 17,0 ± 1,54; Na₉₀= 18,3 ± 0,9; Na₁₂₀= 17,5 ± 1,0), enquanto a concentração de 10μM (^{*}Na₆₀= 28,4 ± 2,7; ^{**}Na₉₀= 35,0 ± 3,5; ^{***}Na₁₂₀= 42,5 ± 3,6) aumentou a natriurese significativamente nos três tempos quando comparado ao grupo controle interno OUA10 (Na₃₀= 23,2 ± 3,1). As concentrações de 3 e 10μM demonstram ter efeito na relação dose-tempo-dependente aos 90 e 120min (Figura 39).

6.1.25. Efeito da Telocinobufagina na Natriurese

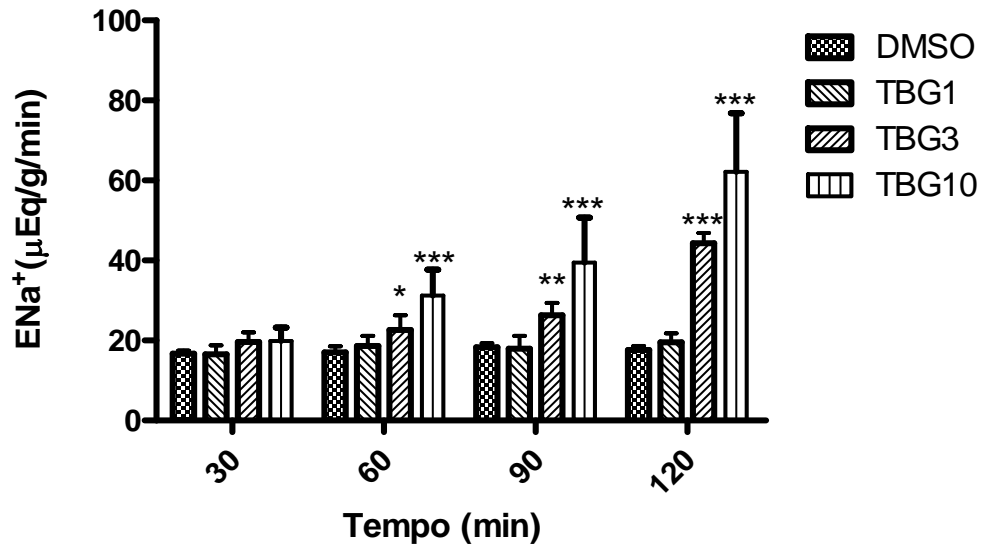


Figura 40. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na excreção de sódio renal. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO.

A TBG também aumentou a natriurese logo no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. As concentrações de 3 μ M ($^*Na_{60} = 22,6 \pm 3,7$; $^{**}Na_{90} = 26,3 \pm 3,1$; $^{***}Na_{120} = 44,3 \pm 2,6$) e 10 μ M ($^{***}Na_{60} = 31,2 \pm 2,6$; $^{***}Na_{90} = 39,4 \pm 4,6$; $^{***}Na_{120} = 62,1 \pm 5,9$) induziram aumento significativo na natriurese nos três tempos de experimento quando comparado ao grupo controle DMSO ($Na_{60} = 17,0 \pm 1,5$; $Na_{90} = 18,3 \pm 0,9$; $Na_{120} = 17,5 \pm 1,0$). Nos tempos de 60, 90 e 120min fica clara a relação do efeito dose-tempo-dependente entre as concentrações de 3 e 10 μ M (Figura 40).

6.1.26. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Natriurese

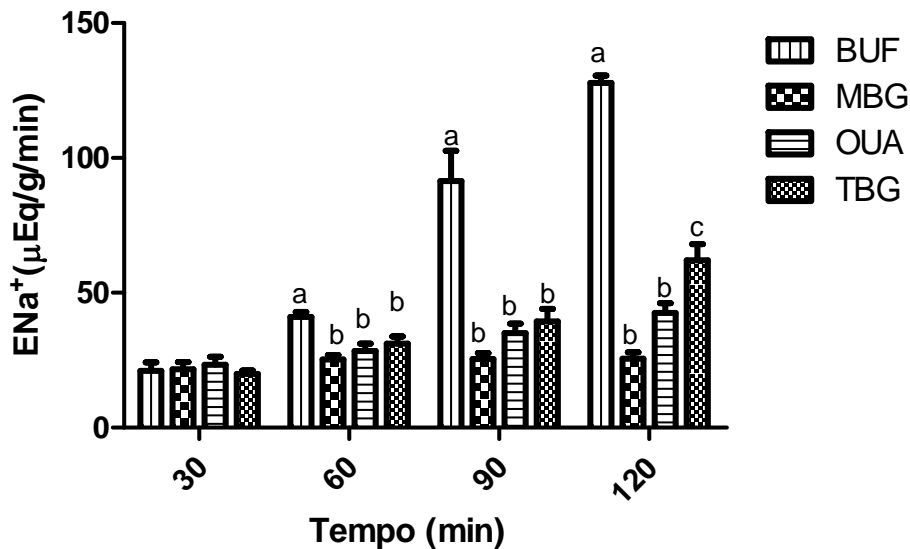


Figura 41. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina ($10\mu\text{M}$) na excreção de sódio renal. Teste Anova seguido de Bonferroni. Letras iguais: não há diferença significativa; letras diferentes: há diferença significativa (a e c, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

A BUF na concentração de $10\mu\text{M}$ aumentou a natriurese significativamente em relação aos outros hormônios: MBG ($**p < 0,01$), OUA ($*p < 0,05$) e TBG ($*p < 0,05$) aos 60min. Nos tempos seguintes (90 e 120min), a BUF aumentou a natriurese significativamente em relação aos demais hormônios ($***p < 0,001$). A telocinobufagina, aos 120min, sobrepõe a excreção de sódio renal significativamente em relação à MBG ($***p < 0,001$) e OUA ($*p < 0,05$). O efeito da BUF demonstrou efeito dose-tempo-dependente nos três tempos de experimento (60, 90 e 120min) (Figura 41).

6.1.27. Efeito da Bufalina na Caliurese

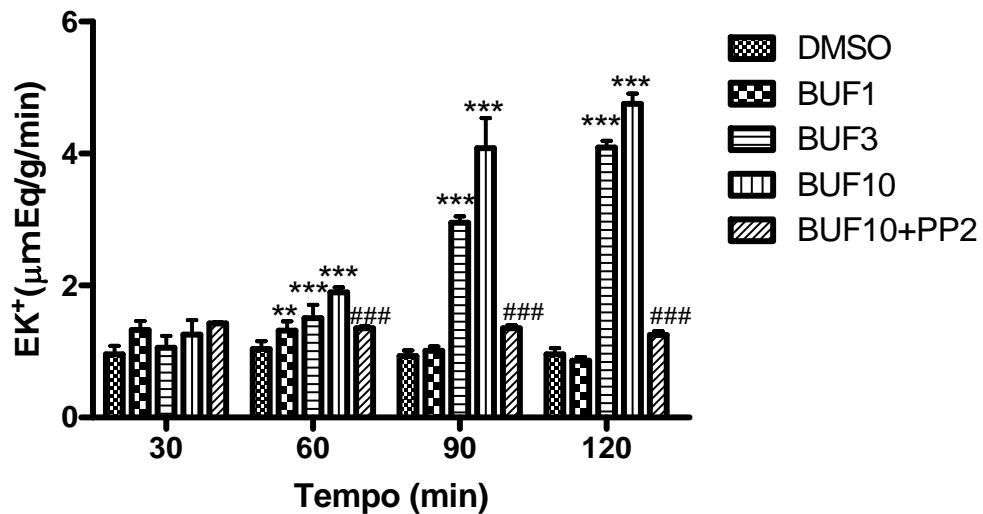


Figura 42. Efeito da bufalina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M e seu efeito quando associado a um bloqueador de src-quinase (PP2) na caliurese. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO; # $p < 0,05$ vs. BUF10.

A BUF aumentou a excreção de potássio logo no primeiro tempo (60min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. Apenas aos 60min, as concentrações 1 μ M (** $K_{60} = 1,31 \pm 0,14$), 3 μ M (** $K_{60} = 1,51 \pm 0,19$) e 10 μ M (** $K_{60} = 1,89 \pm 0,07$) aumentaram a caliurese significativamente em relação ao grupo controle DMSO ($K_{60} = 1,03 \pm 0,12$). Aos 90 e 120min, as concentrações 3 μ M (** $K_{90} = 2,95 \pm 0,09$; ** $K_{120} = 4,09 \pm 0,09$) e 10 μ M (** $K_{90} = 4,08 \pm 0,45$; ** $K_{120} = 4,75 \pm 0,15$) aumentaram a caliurese significativamente quando comparado ao grupo controle DMSO ($K_{90} = 0,93 \pm 0,08$; $K_{120} = 0,95 \pm 0,09$), além de demonstrar uma relação dose-resposta. Em relação ao PP2 tempos (### $K_{60} = 1,35 \pm 0,03$; ### $K_{90} = 1,35 \pm 0,04$; ### $K_{120} = 1,25 \pm 0,05$), este bloqueou a resposta de excreção de potássio significativamente em todos os quando comparado ao controle interno BUF10 ($K_{60} = 1,89 \pm 0,07$; $K_{90} = 4,08 \pm 0,45$; $K_{120} = 4,75 \pm 0,15$) (Figura 42).

6.1.28. Efeito da Marinobufagina na Caliurese

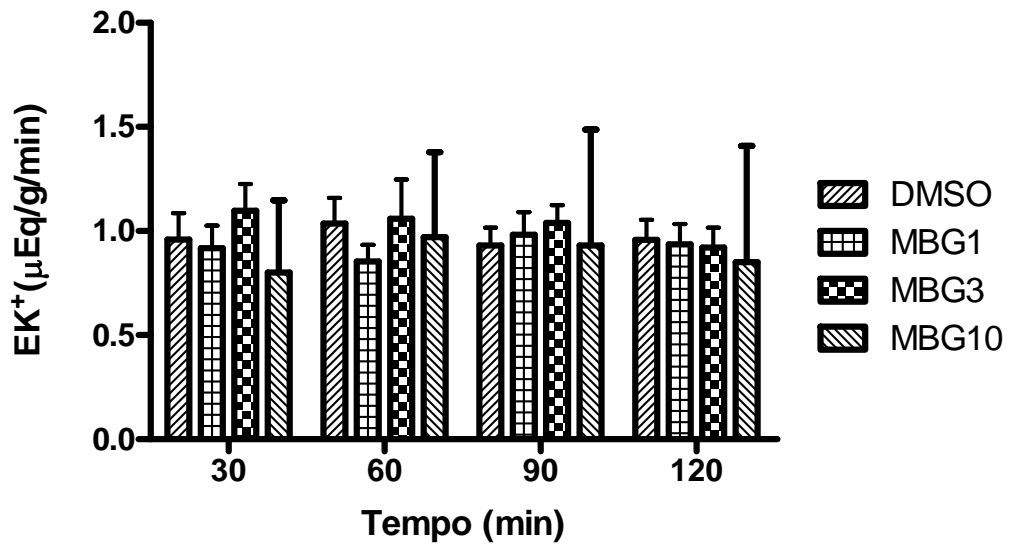


Figura 43. Efeito da marinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μM na caliurese. Teste Anova seguido de Dunnet.

A MBG, mesmo após a sua adição ao sistema de perfusão, não manifestou atividade significativa sob a caliurese em nenhuma das concentrações administradas (1, 3 e 10 μM) em qualquer tempo do experimento (60, 90 e 120min) quando comparada ao grupo controle DMSO (Figura 43).

6.1.29. Efeito da Ouabáina na Caliurese

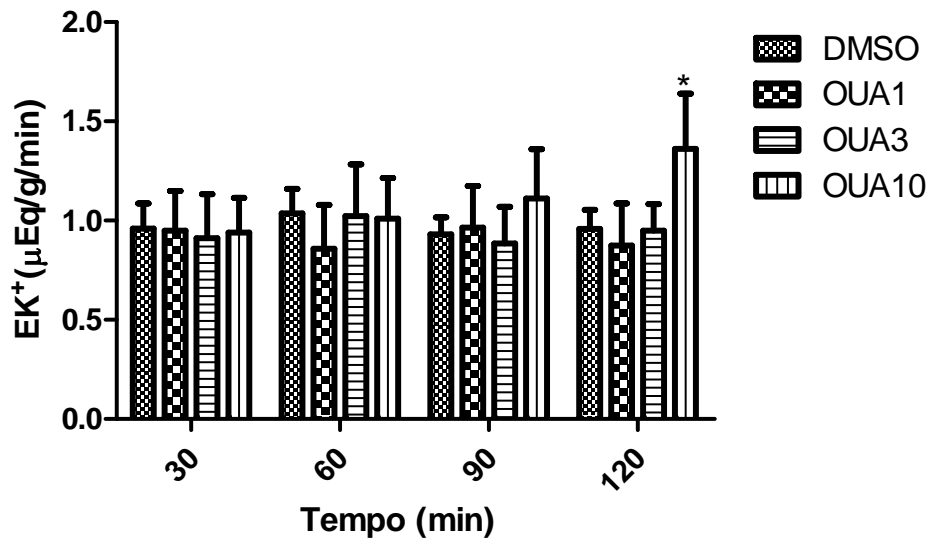


Figura 44. Efeito da ouabáina nas concentrações de 1, 3 e 10µM na caliurese. Teste Anova seguido de Dunnet, *p < 0,05 vs. DMSO.

A OUA manifestou atividade significativa na excreção de potássio renal apenas no último tempo de experimento (120min) e na sua concentração máxima de 10µM ($^{***}K_{120}=1,36 \pm 0,27$) quando comparado ao grupo controle DMSO ($K_{120}=0,95 \pm 0,09$) (Figura 44).

6.1.30. Efeito da Telocinobufagina na Caliurese

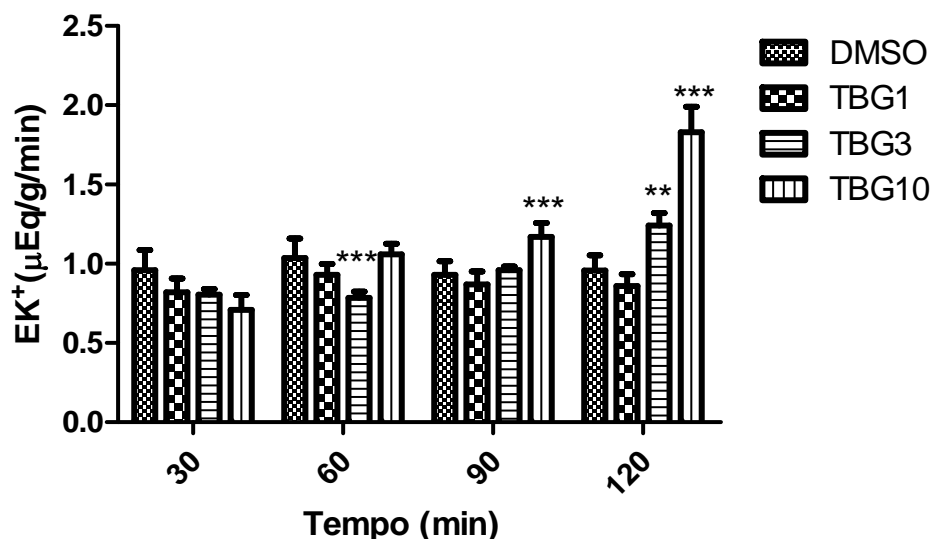


Figura 45. Efeito da telocinobufagina nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M na caliurese. Teste Anova seguido de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. DMSO.

A TBG aumentou a excreção de potássio somente a partir do segundo tempo de observação (90min) de medida após adição da mesma ao sistema de perfusão. Aos 60min, a concentração de 3 μ M ($^{***}K_{60} = 0,78 \pm 0,03$) diminuiu significativamente em relação ao grupo controle DMSO ($K_{60} = 1,03 \pm 0,12$). Essa mesma concentração aumentou a caliurese significativamente apenas aos 120min ($^{**}K_{120} = 1,24 \pm 0,08$), enquanto a concentração máxima de 10 μ M ($^{***}K_{90} = 1,17 \pm 0,08$; $^{***}K_{120} = 1,83 \pm 0,16$) aumentou significativamente em relação ao grupo controle significativamente em relação ao grupo controle DMSO ($K_{90} = 0,93 \pm 0,08$; $K_{120} = 0,95 \pm 0,09$). A relação tempo-dependente é melhor observada na concentração de 10 μ M nos dois últimos tempos de observação experimental (Figura 45).

6.1.31. Comparação do Efeito dos Hormônios Cardiotônicos na Caliuress

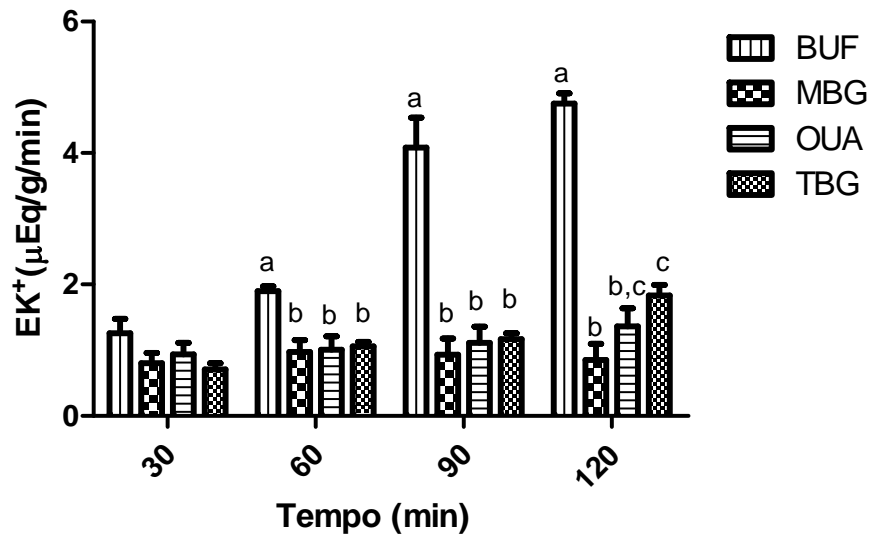


Figura 46. Efeito da bufalina, marinobufagina, ouabaína e telocinobufagina (10 μ M) na caliuress. Teste Anova seguido de Bonferroni. Letras iguais: não há diferença significativa; letras diferentes: há diferença significativa (a e c, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A BUF aumentou a caliuress significativamente em relação aos demais HEA nos três tempos de experimento. Aos 60min, aumentou significativamente a excreção de potássio renal em relação à MBG (** $p < 0,001$), OUA (** $p < 0,01$) e TBG (** $p < 0,01$). Aos 90 e 120min, este hormônio continuou aumentando significativamente em relação aos demais (** $p < 0,001$). A telocinobufagina, aos 120min, sobrepôs a caliuress significativamente apenas em relação à MBG (* $p < 0,05$) (Figura 46).

6.2. Sumário dos Resultados da Perfusão Renal *ex vivo*

10 μ M	BUF	MBG	OUA	TBG
RFG, mL/min/g	+++	NS	+	++
RVR, mmHg mL/min/g	+++	NS	+	+
FU mL/g/min	+++	NS	+	++
ENa	+++	NS	+	++
Ek	+++	NS	+	++

Quadro 1. Sumário dos Resultados: Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), Resistência Vascular Renal (RVR), Fluxo Urinário (FU), Excreção de Sódio (ENa), Excreção de Potássio (Ek); BUF (10 μ M), MBG (10 μ M), OUA (10 μ M), TBG (10 μ M); +++ (incremento intenso), ++ (incremento moderado), + (incremento discreto), NS (não significativo)

6.3. Hemodinâmica Renal *in vivo*

	Controle (n=6)	Bufalina (n=8)	Marinobufagina (n=8)
PAM, mmHg	106 ± 6	129 ± 5‡	120 ± 4*
RVR, mmHg/mLmin/g	19.73 ± 1.25	22.92 ± 2.68	22.20 ± 2.40
FSR, mL/min/g	5.50 ± 0.54	6.07 ± 0.60	5.78 ± 0.54
FPR, mLmin/g	2.96 ± 0.24	3.83 ± 0.32	2.95 ± 0.24
RFG, mL/min/g	1.00 ± 0.13	1.15 ± 0.10	1.29 0.10*
FF	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.04*
FU, µL/min/g	6.55 ± 0.72	10.80 ± 1.59†	9.76 ± 3.43

Quadro 2. Efeito da Bufalina e Marinobufagina (100µM) sobre a Pressão Arterial Média (PAM), Resistência Vascular Renal (RVR), Fluxo Sanguíneo Renal (FSR), Fluxo Plasmático Renal (FPR), Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), Fração de Filtração (FF) e Fluxo Urinário (FU). Valores apresentados como média ± SEM. *p < 0.05, † p < 0.01, ‡ p < 0.001 vs. Controle (Student-Newman-Keuls).

7. Discussão

Os esteróides cardiotônicos da adrenal são conhecidos por modular o metabolismo de sódio e água (KOMIYANA et al., 2005). Estes hormônios esteróides contribuem com a excreção de sódio sob condições de sobrecarga de sal devido a sua propriedade natriurética. Essa atividade natriurética está relacionada com a inibição da isoforma $\alpha 1$ da NKA renal, resultando assim na diminuição de transporte de sódio do fluido tubular para o capilar peritubular (BAGROV et al., 1995).

Estudos que avaliam o efeito dos hormônios cardiotônicos utilizando abordagens *in vitro* e *in vivo* se fundamentam na comparação do comportamento fisiológico em ambas as situações, enquanto que no primeiro os dados resultantes são oriundos de um sistema fechado e isolado e no segundo, os dados obtidos são produtos da interação de todos os sistemas juntos, conhecido por cross-talk. A infusão sistêmica de esteróides inibidores da NKA, por exemplo, produz grande incremento dos níveis séricos de noradrenalina (NECHAY, et al., 1981). Outro estudo que mostra importante “cross-talk” entre os bufodienolídeos e outros sistemas de regulação é a relação entre PAN e MBG relatado por Fedorova & colaboradores (2006). O PAN, por um mecanismo dependente de GMPc, desfosforila a NKA do sarcolema vascular e reduz a sensibilidade à MBG. Na medula renal, o PAN produz um efeito contrário, isto é, provoca a fosforilação da NKA e sensibiliza a mesma aos efeitos inibitórios da MBG. Este mecanismo pode ser importante como um “gatilho” para sensibilizar o rim a responder aos HEA em condições de sobrecarga de volume. Por outro lado, a BUF infundida em ratos em dose que não altera a diurese ou natriurese é capaz de incrementar a resposta natriurética da Ang II (BROWLEE, LEE & MILLS, 1987). Portanto, em virtude da possibilidade de interação entre os sistemas, estudos *in vitro* que investiguem a ação isolada da BUF são importantes.

Os relatos sobre o efeito diurético, natriurético e caliuréticos dos esteróides cardiotônicos são contraditórios com estudos mostrando resultados conflitantes. O estudo de seus efeitos na fisiologia renal é dificultado pelo grande número de efeitos sistêmicos principalmente no sistema cardiovascular e renal que dificultam a avaliação direta de seus efeitos próprios no rim.

Em nossos estudos, verificamos um aumento da RFG em rim de rato perfundido, resultado diferente do observado *in vivo* relacionado à infusão de BUF, a qual não aumentou o RFG em ovelhas (YATES & MACDOUGALL, 1993). Essas observações

parecem divergir da hipótese central de que a hipertensão em longo prazo induzida pelo aumento do débito cardíaco ou resistência periférica não pode ser sustentada sem prejuízos na capacidade excretória renal (PATEL et al., 1996). De acordo com Guyton et al. (1980) & Hall et al. (1986 e 1996), aumentos na pressão arterial normalmente elevam a excreção de sódio renal até a pressão arterial retornar ao estado de origem. Dessa forma, aumentos na pressão sanguínea que não estejam associados com o aumento da capacidade excretória renal poderia causar hipertensão crônica.

Por outro lado, Patel et al. (1996) relataram que a BUF não tem efeito sobre o RFG, FU e natriurese em ratos machos Sprague-Dawley recebendo infusão intravenosa de BUF (10µg/min por 40 min). A inibição da NKA vascular que resulta em prejuízos na regulação da hemodinâmica renal e natriurese pressórica poderia ser a explicação para resultados negativos como este, desde que o FSR fosse mais baixo em ratos tratados com BUF que ratos controle. Patel et al. (1996) ainda sugerem que a BUF não prejudica sozinha a auto regulação do FSR e o RFG, porém, pode diminuir estes parâmetros estudados da função renal.

Os dados são conflitantes, pois em estudos com BUF, o elemento mais examinado por induzir um aumento agudo e sustentado na pressão sanguínea, reduz o fluxo sanguíneo renal (FSR) em cachorros (ELIADES et al., 1991; PAMNANI et al., 1991b). Os efeitos no fluxo urinário e excreção de sódio não se alteraram ou aumentaram em ratos e não se alteraram em cachorros durante a infusão (ELIADES et al., 1989; ELIADES et al., 1991; PAMNANI et al., 1991b).

Embora estudos de Tamaki et al., (1986) mostrem que a BUF aumenta significativamente a RVR e prejudica a regulação do FSR e RFG, com conseqüente diminuição na natriurese pressórica e diurese em ratos, nossos achados os contradizem, pelo menos no que diz respeito aos prejuízos relacionado ao RFG. Corroboram com esta hipótese os trabalhos de Browlee et al. (1987) e Eliades et al. (1989), nos quais os efeitos diuréticos e natriuréticos dependam de incremento no RFG. A BUF infundida em ratos em dose que não altera a diurese ou natriurese é capaz de incrementar a resposta natriurética e diurética da angiotensina (BROWLEE, LEE & MILLS, 1987)

Pamnani & colaboradores (1991) infundiram BUF em taxas crescentes em ratos e observaram aumento de inotropismo cardíaco, frequência cardíaca e pressão arterial. Estes efeitos foram acompanhados do aumento da diurese e da carga excretada de sódio e potássio. Os efeitos renais destes esteróides no estudo de Pamnani devem ser possivelmente secundários ao aumento do débito cardíaco e pressão de perfusão renal.

Contudo, outra explicação é de que a BUF tem um largo efeito diurético em uma concentração cinco vezes maior que aquela *in vitro* para inibição da enzima. Uma estreita correlação entre efeito inibitório da NKA renal *in vitro* e efeito diurético direto *ex vivo* em rim perfundido foi observado, desde que ambas as drogas tenham potência similar para a inibição da NKA do rim de ratos *in vitro* em condições experimentais idênticas (POÇAS et al., 2003, 2007).

Usando um modelo de rim de rato perfundido isolado, mostramos que a adição de BUF ao perfusato exerce efeitos profundos na diurese e na natriurese, pelo menos quando usado nas concentrações de 3 e 10 μ M. Resultados qualitativos semelhantes foram obtidos por Brownlee et al. (1987) após infusão intravenosa de BUF em ratos que estavam sob sobrecarga de sal. Contudo, os efeitos natriuréticos observados em nosso estudo foram mais surpreendentes do que os outros autores, talvez porque perfundimos o rim em um sistema fechado sem intervenção do metabolismo hepático. Pamnani et al. (1991) também observaram que a infusão de BUF produz uma excreção muito maior de urina e sódio que a OUA, quando administrados em ratos em dose equimolar, o que corrobora com os nossos achados. Talvez este fenômeno se deva ao fato da BUF ter maior afinidade pela isoforma renal que a OUA como relatado por Pamnany & colaboradores (1991). Além disso, o largo efeito da BUF (tempo-dose-dependente) nos parâmetros estudados poderia ser justificado, provavelmente, à não ocorrência do metabolismo deste hormônio ou ainda um metabolismo lentificado.

O provável mecanismo molecular do efeito natriurético da BUF no modelo presente é a ativação da NKA do sinalossoma ligada a src-quinase. Os glicosídeos cardíacos também podem diminuir a reabsorção de sódio como consequência da diminuição da atividade e expressão da isoforma do trocador Na⁺/H⁺ (NHE3) (PIERRE & XIE, 2006). Isto é reforçado pelo fato do bloqueador seletivo src-quinase, PP-2 (LI et al., 2009) bloquear completamente todos os efeitos glomerulares e tubulares evocados por BUF em rim de rato perfundido.

O uso do PP2 mostrou que a sinalização da BUF na membrana basolateral ocorre tanto pela via ionotrópica como pela metabotrópica via src-quinase. A via metabotrópica pode ser reconhecida como uma sinalização mais duradoura que a ionotrópica, já que esta última está presente na membrana na NKA e pode se ligar e desligar aos HEC, enquanto a outra via, ao se ligar com os HEC se internalizam na célula tubular inibindo por um prazo maior a NKA renal.

Em nossos ratos Wistar, a MBG (1, 3 e 10 μ M) não modificou os parâmetros estudados da função renal. Segundo Fedorova et al., (1998), *in vitro* a MBG é um potente vasoconstritor e inibidor da NKA e na aorta de ratos exibem grande afinidade para a subunidade α 1 da NKA do que a OUA. Isto poderia se associar a falta da inibição da atividade da NKA renal *in vitro*, quando comparados à BUF (dados não mostrados).

O grupo de Bagrov & colaboradores (1995 e 1998), Fridman et al. (2002) e Fedorova et al. (2002) tem sugerido que a MBG é o mais importante HEA baseado em identificação por imunoenensaio e nos ensaios básicos e clínicos que realizaram utilizando o termo “reatividade imunológica similar a MBG” para se referir ao esteróide. No entanto, vários grupos têm questionado a real natureza do material referido como MBG por este grupo. Parte da dúvida se baseia na grande semelhança química entre vários destes hormônios esteróides como a 19-norBUF, MBG, proscilaridina A e BUF.

Um estudo recente, por exemplo, identificou reação cruzada de um anticorpo anti-BUF com vários bufodienolídeos (ODA et al., 2001). Diferenças estruturais muito sutis como um ou dois hidrogênios não são suficientes para construir um epítopo suficiente para garantir especificidade para MBG e, portanto, os dados sobre os prováveis efeitos natriuréticos da MBG são questionáveis em relação à natureza do verdadeiro agente natriurético.

A estrutura química de nossos bufodienolídeos foi identificada por dois químicos experientes em centros diferentes (Universidade Federal do Ceará e Universidade do Rio de Janeiro), de tal maneira que podemos dizer que a MBG não tem atividade natriurética e diurética na faixa de concentração e nas condições experimentais utilizados.

A MBG não apresentou efeito agudo em nossos estudos, mas pode ter um efeito natriurético após exposição crônica tanto pelo aumento da internalização da NKA como pela recém descrita capacidade de diminuir a atividade o receptor de membrana para o mineralocorticóide aldosterona. Este receptor é importante, pois regula a expressão da NKA no néfron distal e a expressão do canal epitelial de sódio (ENaC) na membrana apical, um dos principais responsáveis pela reabsorção de sódio no túbulo distal (SMITH et al., 2007). Essa diferença, segundo Pmnani et al. (1991) se baseia no fato de a MBG ter uma menor afinidade, aproximadamente 10 a 20 vezes, pelo receptor da NKA que a BUF. A configuração estrutural diferente da MBG e BUF provavelmente explique essa diferença de afinidade. Outra dúvida permeia sobre a MBG, que é a possibilidade da mesma gerar um metabólito em nível sistêmico, no qual só é possível observar nos resultados *in vivo*, que por sua vez demonstram resultados acentuados da MBG na função renal.

Em relação à OUA, esta tem grande efeito natriurético quando administrado *in vivo* em cachorros e este efeito é correlacionado com inibição da atividade enzimática da NKA (HOOK, 1969; TORRENTI et al., 1972).

Resultados encontrados por nosso grupo na adição aguda de OUA (1, 3 e 10 μ M) ao perfusato corroboram Tamaki et al., (1986), o qual demonstraram que a infusão aguda de OUA intra-renal prejudica tanto o FSR e RFG em cachorros à nossa semelhança, que mesmo em ratos, demonstramos que a OUA produz efeitos negativos sobre o RFG. Levando em consideração que a OUA diferentemente dos bufodienolídeos é hidrossolúvel e, portanto, este hormônio pode ser excretado mais facilmente e assim diminuir sua atividade enquanto inibidora da NKA. Além do mais, a OUA tem afinidade de ligação com a albumina, o que pode, em estudos *ex vivo*, ser excretada em grande parte ligada a proteína, o que não ocorre em situações *in vivo*, a qual não há passagem de proteínas para o filtrado glomerular, podendo-se assim, avaliar a ação *in locu* da OUA.

Em outro estudo, a infusão de OUA (5, 10 ou 20 μ g/min) na artéria renal de ratos por 30min produziu uma natriurese e diurese dose-dependente sem induzir mudanças significativas no RFG ou na pressão arterial sistêmica (HOOK, 1969). Este efeito foi acompanhado de inibição da atividade enzimática da NKA.

Nossos dados mostram que tanto BUF quanto TBG que têm sido identificados no plasma e urina de paciente humanos (ODA et al., 2001; KOMIYAMA et al., 2005) têm grande efeito diurético e natriurético e que o efeito da TBG não seja completamente dependente de incremento na RVR ou incremento do RFG, embora a adição aguda de TBG ao perfusato em ratos feita no nosso laboratório mostre como resultado uma ação no aumento em todos os índices de estudo renal, como RFG, RVR, FU, natriurese e caliurese.

Alguns autores sugerem que a MBG seja um metabólito da TBG e demonstram que os níveis de TBG plasmática sejam maiores que a MBG (KOMIYAMA et al., 2005), logo se pode interpretar que os efeitos da TBG nos parâmetros renais sejam mais potentes que a MBG. Por outro lado, a potência de ambos os hormônios pode estar associada à sua configuração estrutural. A MBG tem uma estrutura mais compacta que a TBG, logo essa diferença influencia na ligação desses hormônios à bomba.

Os efeitos dos bufodienolídeos de uma forma geral devem ser avaliados levando em consideração a sua interação com outros elementos presentes no ser estudado. Shal et al., 2009 relatam que níveis circulantes aumentados de Ang II, estimulam a secreção de OUA pelo tecido adrenal, que por conseguinte, a alta afinidade deste hormônio com a NKA adrenal favorece a sua ligação, culminando assim na inibição do transporte de sódio e

diminuindo sua auto produção pela adrenal. Em resposta a esta situação, mais Ang II é formada e conseqüentemente aldosterona, o que aumenta a reabsorção de sódio pelo tecido renal. Laredo et al. (1997), também concordam com as observações de Shal et al. (2009), no qual diz que níveis de níveis séricos aumentados de OUA pode ampliar os efeitos da aldosterona que pode repercutir criticamente na manutenção do tônus vascular e na pressão sanguínea.

A subunidade $\alpha 1$ da NKA é o receptor dos esteróides da adrenal. O efeito deste hormônio depende da sensibilidade destes receptores aos ligantes. O aumento da sensibilidade destes receptores por técnicas de genética molecular desenvolveu camundongos com resposta natriurética aumentada à sobrecarga salina (LOREAUX et al., 2008).

Estes hormônios esteróides endógenos podem estar implicadas na patogênese da hipertensão associada a baixos níveis de renina e pré-eclâmpsia (HADDY & OVERBECK, 1976; BAUSTEIN, 1977; PUSCHETT, 2008) e portanto o entendimento de seus efeitos na fisiologia renal e como seus receptores são regulados pode ser a chave para a compreensão das falhas deste sistema que contribuem para a hipertensão pré-eclâmpsia.

Os comentários sobre os resultados de correlação dos parâmetros que estudam a função renal podem levantar algumas proposições que ajudam no reconhecimento particular da atividade dos HEA no rim perfundido *ex vivo*. O FU se correlaciona bem com o RFG e RVR quando a BUF é adicionada ao perfusato, sugerindo que seu alvo de ação acontece em nível glomerular com forte inibição da NKA renal. Além do mais, o aumento da resistência (constrição), como demonstrado em nossos dados, provavelmente, foi mais acentuado na arteríola eferente que na aferente, pois se o aumento da RVR fosse mais acentuado na arteríola aferente, ocorreria diminuição do FSR e conseqüente queda do RFG, diferente do que foi observado em nossos resultados. Além do mais, o provável aumento da constrição da arteríola eferente pode não ser causada apenas pela BUF por si só, mas por um mecanismo indireto causado pela endotelina. Segundo Lanese et al. (1992) e Endlich et al. (1996), a arteríola aferente são menos responsivas à endotelina quando comparadas à arteríola eferente, o que provavelmente justifica o evento outrora explicado. No entanto, ainda não está bem elucidada a correlação entre os HEA e a endotelina (SAUNDERS & SCHEINER-BOBIS, 2004). Além disso, o aumento da resistência provocada pelo aumento da BUF e dos demais hormônios avaliados neste estudo pode estar relacionada à fisiologia dos trocadores (NKA/Na-Ca) e seus efeitos na ação contrátil do músculo liso com conseqüente aumento na RVR. Esses dois trocadores, embora

diferentes no tipo de transporte, agem em conjunto na manutenção do equilíbrio iônico intra e extracelular ou luminal. A NKA ao utilizar o transporte ativo, diminui a concentração intracelular de sódio e o trocador Na-Ca, por transporte passivo, permite a entrada de sódio no meio intracelular com conseqüente saída de cálcio. No entanto, quando a BUF inibe a NKA em nível dos capilares glomerulares e nas arteríolas, há um aumento da concentração de sódio intracelular, o que provoca uma reversão do trocador Na-Ca com aumento da entrada de cálcio intracelular o que facilita a vasoconstrição e conseqüente aumento da RVR.

A OUA também se correlacionou bem com a RVR, levantando a possibilidade de o seu efeito acontecer secundariamente à alterações glomerulares. No entanto, o aumento no RFG promovido pela adição de OUA foi bastante atenuado, o que sugere a existência de sítios de ação tubulares que justifiquem o acentuado efeito natriurético e diurético observado. Por outro lado, a OUA parece se conjugar à albumina e talvez por esse motivo o efeito da OUA não se mostrou tão acentuado como os demais hormônios. Corroborando essa suposição, Smith (1972) em seus estudos descreveu a imunização de coelhos com albumina de soro humano quando submetidos à OUA, assim como Ciofalo & Ashe (1971), que observaram que a conjugação de OUA à albumina de soro bovino parece ser protetora à doses letais de OUA em coelhos.

Como mencionado anteriormente, a TBG não mostrou correlação entre o FU e o RFG e RVR, sugerindo que sua atividade ocorra em nível tubular e independente de alterações glomerulares.

Ficou claro que dos hormônios esteróides cardiotônicos estudados neste trabalho, a BUF é o hormônio que mais exerce efeito direto em nível renal, contribuindo para a excreção de sódio e indiretamente nos níveis pressóricos. Uma colaboração no entendimento sobre a atividade da BUF é aquela relacionada à forma de ligação deste hormônio na NKA renal, a qual se verificou que a BUF se liga à estruturas chamadas de sinalossoma na membrana plasmática. Essas estruturas se internalizam quando ligadas a BUF (via metabotrópica) e por isso seu efeito na inibição da NKA fica mais exacerbado que aquela ligação superficial na membrana plasmática (via ionotrópica) A questão, ainda é saber por qual mecanismo exato esse hormônio atua com mais eficiência em detrimento dos demais. Alguns fatores talvez contribuam para os resultados encontrados neste trabalho, *in vitro*, como por exemplo a quantidade dos hormônios administrados e a facilidade do acesso direto desses hormônios à artéria renal, o que não acontece em potencial em situações *in vivo*.

A importância de trabalhos *in vivo* concomitantes a trabalhos *in vitro* nos dá a possibilidade de examinar o comportamento fisiológico destes hormônios levando em consideração a sua ação associadas aos seus aspectos interativos teciduais, bem como sua ação isolada sem interferência com outros hormônios e da interferência do metabolismo hepático.

Semelhante ao comentado, podemos citar a Ang II, um octapeptídeo que potencializa a ação dos HEA, refletindo um resultado superestimado da ação destes hormônios *in vivo*, diferentemente do que ocorre *in vitro*, no qual podemos verificar a natureza real da sua atividade.

Elevação na pressão sanguínea também inibe a formação de Ang II e aldosterona, o que promove maior excreção de sódio (HALL, MIZELLE & WOODS, 1986). Embora a natriurese pressórica atue para estabilizar a pressão sanguínea, anormalidades na hemodinâmica renal ou reabsorção tubular podem alterar o controle da pressão arterial e excreção de sódio. Dessa forma, o acúmulo de volume aumenta a pressão sanguínea que por sua vez aumenta a natriurese pressórica com a finalidade de restaurar a pressão arterial (HALL et al., 1990).

Mudanças na natriurese pressórica, em modelos experimentais de hipertensão (ex. Hipertensão de Goldblatt), podem ser causadas pelo aumento da resistência pré-glomerular. Outra possibilidade para queda da natriurese pressórica pode ser devido à redução do coeficiente de filtração glomerular (k_f) (OKEN, 1989).

Ao contrário do que acontece, em muitos pacientes com hipertensão tem uma diminuição na taxa de atividade plasmática da renina. Isto pode ser explicado pelo aumento de reabsorção tubular ou pela vasoconstrição renal. Experimentalmente, esse fenômeno ocorre em animais DS (GUYTON, 1980).

Além da função sobre a homeostase, os bufodienolídeos têm se mostrado importantes enquanto elemento anestésico, antimicrobiano (CUNHA FILHO et al., 2005), anti-neoplásico (KAMANO et al., 2002), indutor apoptótico (JING et al., 1994) e antiviral (NAKANISHI et al., 1999), além de terem sido relacionados com a inibição da produção de testosterona pela pituitária e testículo de ratos (WANG et al., 1997).

Kaskin et al. (2002), mostraram que a MBG consegue penetrar na barreira capilar cerebral e inibir a NKA deste tecido, diminuindo os efeitos de etanol sobre o sistema nervoso central (SNC). Estes resultados começam a iluminar o campo da neurociência, que almeja manipular as alterações dos mecanismos neurobiológicos em situações abusivas de consumo de etanol.

Diante a variedade de efeitos dos HEA comentados nesse trabalho, como por exemplo, no SNC, sistema reprodutor masculino, tecido cardíaco, tecido renal e até no próprio tecido adrenal, as linhas de estudo mostram que ainda há bastante para se descobrir sobre esses hormônios, principalmente no que tange seu mecanismo de ação.

CONCLUSÃO

8. Conclusão

8.1. *Ex vivo*

- O efeito da BUF se sobrepôs a atividade dos demais hormônios em todos os parâmetros avaliados (RFG, RVR, FU, natriurese e caliurese);
- O uso do PP2 bloqueou os efeitos da BUF sobre os parâmetros de estudo renal (RFG, RVR, FU, natriurese e caliurese);
- A MBG não tem ação significativa sobre os parâmetros de estudo renal (RFG, RVR, FU, natriurese e caliurese);
- A OUA aumentou significativamente os parâmetros de estudo renal (RVR, FU, natriurese e caliurese), com exceção do RFG.
- A TBG aumentou significativamente os parâmetros de estudo renal (RFG, RVR, FU, natriurese e caliurese), no entanto, com efeito menor que a BUF.

8.2. *In vivo*

- A BUF aumentou significativamente a pressão arterial média e o fluxo urinário, à semelhança dos resultados *ex vivo*;
- A MBG aumentou significativamente a pressão arterial média, GRF e a fração de filtração, contrastando os resultados *ex vivo*.

9. Perspectivas

Em estudos posteriores verificaremos a interação entre a atividade do NHE3 (principal responsável pela reabsorção de sódio através da membrana apical de túbulo proximal renal) e a inibição da NKA pelos HEA. Avaliaremos o nível de fosforilação tanto do permutador NHE3 como da bomba de sódio, já que importante mecanismo de regulação da função destes transportadores se faz por fosforilação.

Investigaremos também se a PP2 é capaz de inibir a via metabotrópica, assim como no tecido renal, no tecido cardíaco, além de verificar o papel da PP2 no efeito diurético e natriurético de TBG e OUA.

Avaliaremos também qual seria o efeito de sobrecarga salina no nível dos HEA e na atividade da NKA no tecido renal e vascular, além do mecanismo de ação de sinalização dos mesmos na atividade de NKA, tanto na função renal quanto na vasculatura, na resposta às doses que não provocam diurese *in vitro*, mas sim *in vivo*, já que os mecanismos adaptativos devem operar apenas quando a necessidade de incrementar a excreção de sódio pela sobrecarga na dieta ou pelo acúmulo (por insuficiência cardíaca, por exemplo) estão presentes. Por exemplo, a uroguanilina, hormônio natriurético intestinal, atua como diurético em níveis de centena de nanomol no rim de animais controle, mas seu efeito é aumentado em animais que sofreram sobrecarga de sódio (FONTELES et al., 2009).

Verificaremos também a participação da PP2 no efeito de TBG e OUA, bem como o efeito de sobrecarga salina na sensibilidade renal a estes hormônios, assim como a interação destes com outros sistemas natriuréticos como atriopeptinas, urodilatina, bradicinina e guanilinas.

Diante os cross-talks que já são claros na literatura científica, nossos resultados sugeriram a ocorrência de novas interações entre os hormônios, no entanto, uma nova dúvida se faz presente e, portanto, tentaremos elucidar; se a MBG não atua como antagonista para os outros hormônios como BUF e TBG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. Referências Bibliográficas

AIZMAN, O; UHLEN, P; LAL, M; BRISMAR, H; APERIA, A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 98, v. 23, p.13420-13424, 2001.

AKIMOVA, OA; BAGROV, AY; LOPINA, OD; KAMERNITSKY, AV. TREMBLAY, J.HAMET, P; ORLOV, SN. Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na⁺ and [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent signaling in C7- MDCK cells. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 7, p. 280, v. 1, p. 832-839, 2005.

AKIYAMA, M; OGURA, M; IWAI, M; IJIMA, M; NUMAZAWA, S; YOSHIDA, T. Effect of bufalin on growth and differentiation of human skin carcinoma cells in vitro, **Human cell**, n. 12, p. 205–209, 1999.

ANTMAN, EM; SMITH, TW. Digitalis toxicity. **Annual Review of Medicine**, n.36, p. 357-367, 1985.

AVERINA, IV; TAPILSKAYA, NI; REZNIK, VA; FROLOVA, EV; FEDOROVA, OV; LAKATTA. EG; BAGROV. AY. Endogenous Na/K-ATPase inhibitors in patients with preeclampsia. **Cellular and molecular biology**, n. 52, v. 8, p. 19-23, 2006.

AYDEMIR-KOKSOY, A; ABRAMOWITZ, J; ALLEN, JC. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. **The Journal of biological chemistry**, n. 276, v. 49, p. 46605-46611, 2001.

BAGROV, AY; FEDOROVA, OV; DMITRIEVA, RI; FRENCH, AW; ANDERSON, DE. Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity during saline volume expansion in anaesthetized dogs. **Cardiovascular research**, n. 31, v. 2, p. 296-305, 1996.

BADR, KR; MURRAY, JJ; BREYER, MD; TAKAHASHI, K; INAGAMI, T; HARRIS, RC. Mesangial Cell, Glomerular and Renal Vascular Responses to Endothelin in the Rat Kidney - Elucidation of Signal Transduction Path. **The American Society for Clinical Investigation**, v. 83, p. 336-342, 1989.

BAGROV, AY; FEDOROVA, OV; DMITRIEVA, RI; HOWALD, WN; HUNTER, AP; KUZNETSOVA, EA; SHPEN, VM. Characterization of a urinary bufodienolide Na⁺/K⁺/ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **Hypertension**, n. 31, v. 5, p. 1097-1103, 1998.

BAGROV, AY; ROUKOYATKINA, NI; FEDOROVA, OV; PINAEV, AG; UKHANOVA, MV. Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of *Bufo marinus* toad. **The European Journal of Pharmacology**, n. 234, v. 2-3, p. 165-172, 1993.

BAGROV, AY; ROUKOYATKINA, NI; PINAEV, AG; DMITRIEVA, RI; FEDOROVA, OV. Effects of two endogenous Na⁺,K(+)-ATPase inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. **European journal of pharmacology**, n. 274, v. 1-3, p. 151-158, 1995.

BAGROV, AY; SHAPIRO, JI; FEDOROVA, OV. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. **Pharmacological Reviews**, n. 61, v.1, p. 9-38, 2009.

- BAGROV, YY; MANUSOVA, NB; EGOROVA, IA; FROLOVA, EV; FEDOROVA, OV; BAGROV, AY. Marinobufagenin, an endogenous inhibitor of alpha-1 Na/K-ATPase, is a novel factor in pathogenesis of diabetes mellitus. **Doklady biological sciences**, n. 404, p. 333-337, 2005.
- BAUER, N; MÜLLER-EHMSEN, J; KRÄMER, U; HAMBARCHIAN, N; ZOBEL, C; SCHWINGER, RH; NEU, H; KIRCH, U; GRÜNBAUM, EG; SCHONER, W. Ouabain-like compound changes rapidly upon physical exercise in man and dog-effects of b-blockade and ACE-inhibition. **Hypertension**, n. 45, p. 1024-1028, 2005.
- BAUMGARTEN, G. **Die herzwirksamen glykoside v.e.b.** Georg Thieme, Leipzig, 1963.
- BERTORELLO, AM; KATZ, AI. Short-term regulation of renal Na-KATPase activity: Physiological relevance and cellular mechanisms. **The American journal of physiology**, n. 265, p. 743-755, 1993.
- BLANCO, G; BERBERIAN, G; BEAUGE, L. Detection of a highly ouabain sensitive isoform of rat brainstem Na⁺/K⁺-ATPase, **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1027, p. 1-7, 1990.
- BLANCO, G; MERCER, RW. Isozymes of the Na/K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology**, n. 275, p. 633-650, 1998.
- BLAUSTEIN MP, ZHANG J, CHEN L, HAMILTON BP. How does salt retention raise blood pressure? **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, n.290, v. 3, p. 514-523, 2006.
- BLAUSTEIN, MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, n. 264, p. 1367-1387, 1993.
- BLAUSTEIN, MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and a hypothesis. **American Journal of Physiology**, n. 232, v. 5, p. 167-173, 1977.
- BLAUSTEIN, MP; LEDERER, WJ; BLAUSTEIN, MP; LEDERER, WJ. **Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiological reviews**, n. 79, v. 3, p. 763-854, 1999.
- BOWMAN, RH. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. **The Journal of biological chemistry**, n.245, p. 1604-1612, 1970.
- BRACE, RA; ANDERSON, DK; CHEN, WT; SCOTT, J; HADDY, F. Local effects of hypokalemia on coronary resistance and myocardial contractile force. **The American journal of physiology**, n.227, p. 590-559, 1974.
- BRENDER, D, STRONG, CG, SHEPHERD, JT. Effects of acetylstromphanthidin on isolated veins of the dog. **Circulation research**, n. 26, v. 5, p. 647-655, 1970.
- BROWNLEE, AA; JOHNSON, P; MILLS, IH. Actions of bufalin and cinobufotalin, two bufadienolides respectively more active and less active than ouabain, on ouabain binding and 86Rb uptake by human erythrocytes. **Clinical science**, n. 78, v. 2, p. 169-174, 1990.
- BROWNLEE, AA; LEE, G; MILLS, IH. Marked inhibition of canine renal Na/K ATPase by a bufodienolide but weak natriuretic activity in the rat. **The Journal of Physiology**, n. 28, p. 390-394, 1987.
- BUCKALEW VM, MARTINEZ FJ, GREEN WE. The effect of dialysates and ultrafiltrates of plasma of saline-loaded dogs on toad bladder sodium transport. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 49, v. 5, p. 926-935, 1970.

BUCKALEW VM; HADDY FJ. Circulating natriuretic factors in hypertension. In Laragh JH, Brenner EM (eds). Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. New York: Raven Press, p. 939–954. **Cell Physiology**, v. 293, p. 509-536, 1990.

BUCKALEW, VM. Atrial Peptides Modify the Effect of Marinobufagenin on Sodium Pumps: Implications for Blood Pressure Control. **Hypertension**, n. 48, v. 6, p. 1029-1030, 2008.

BURNETT, JC JR; GRANGER, JP; OPGENORTH, TJ. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. **The American journal of physiology**, n. 247, p. 863-866, 1984.

CANTLEY, LC. Structure and mechanism of the Na⁺/K⁺-ATPase. **Current Topics in Bioenergetics**, n. 1; p. 201-237, 1981.

CHAPARRO, JC; PRAMUK, JB; GLUESENKAMP, AG. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud Forest of southeastern Peru. *Herpetologica*, 63 (2), 203-212.

CHEN KK; KORARIKOVA A. Pharmacology and toxicology of toad venom. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 56, v. 12, p.1535-1541, 1967.

CHEN, W-T; BRACE, RA; SCOTT, JB; ANDERSON, DK; HADDY, FJ. The mechanism of the vasodilator action of potassium. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n. 140, p. 820-824, 1972.

CIOFALO, F; ASHE, H. Ouabain-induced ventricular arrhythmia in rabbit: influence of antibodies. **Life Sciences**, n. 10, v. 341, 1971.

CORT JH; LICHARDUS B. The natriuretic activity of jugular vein blood during carotid occlusion. **Physiologia Bohemoslovaca**, n.12; p. 497-501, 1963.

CRABOS, M; AUSIELLO, DA; HAUPERT, GT JR; CANTIELLO, HF. Atrial natriuretic peptide regulates release of Na⁺-K⁺-ATPase inhibitor from rat brain. **American journal of physiology**, n. 254, p. 912-917, 1988.

CUNHA FILHO,GA; SCHWARTZ, CA; RESCK, IS; MURTA, MM; LEMOS, SS; CASTRO, MS; KYAW, C; PIRES JR., OR; LEITE, JRS; BLOCH JR., C; SCHWARTZ, EF. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, n. 45, p. 777–782, 2005.

CURRIE, MG.; FOK, KF; KATO, J; MOORE, RJ; HAMRA, FK; DUFFIN, KL; SMITH, CE. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 89, v. 3, p. 947-951, 1992.

DANIEL, EE; EL-YAZBI, A; CHO, WJ. Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. **Journal of cellular and molecular medicine**, n. 10, p. 529–544, 2006.

DE ANGELIS, C; HAUPERT, GT JR. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na⁺-K⁺-ATPase from midbrain and adrenal. **American journal of physiology**, n. 274, p. 182-188, 1998.

DE BOLD, AJ; BORENSTEIN, MB; VERESS, AT; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, n. 28, p. 89-94, 1981.

- DE WARDENER HE. The concept of the natriuretic hormone and its relation to hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, n. 7, v. 5-6, p. 647-62, 1985.
- DIETRICH, B; ASTER, U; GREIDZIAK, N; ROOS, W; LUCKNER, M. Glucosylation of digitoxin and other cardenolides in cell cultures of *D. lanata*. **Biochemistry and Physiology**, n. 182, p. 245-255, 1987.
- DMITRIEVA, RI; BAGROV, AY; LALLI, E; SASSONE-CORSI, P; STOCCO, DM; DORIS, PA. Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. **Hypertension**, n. 36, v. 3, p. 442-448, 2000.
- DOHERTY, JE; DE SOYZA, N; KANE, JJ; BISSETT, JK; MURPHY, ML. Clinical pharmacokinetics of digitalis glycosides. **Progress in cardiovascular diseases**, n. 21, v. 2, p. 141-158, 1978.
- DORIS, PA. Immunological evidence that the adrenal gland is a source of an endogenous digitalis-like factor. **Endocrinology**, n. 123, v. 5, p. 2440-2244, 1988.
- DORIS, PA. Regulation of Na,K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n. 205, v.3, p. 202-212, 1994.
- DOSTANIC, I; PAUL, RJ; LORENZ, JN; STEVEN, THERIAULT; HUYSSSE, JWV; LINGREL, JB. The $\alpha 2$ -isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility *in vitro*. **American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology**, n. 288, v. 2, p. 477-485, 2005.
- D'URSO, G; FRASCARELLI, S; BALZAN, S; ZUCCHI, R; MONTALI, U. Production of ouabain-like factor in normal and ischemic rat heart. **Journal of cardiovascular pharmacology** 2004; 53: 657-662.
- DVELA, M; ROSEN, H; FELDMANN, T; NESHER, M; LICHTSTEIN, D. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. **Pathophysiology**, n. 14, v. 3-4, p. 159-166, 2007.
- ELIADES, D; PAMNANI, MB; SWINDALL, BT; HADDY, FJ. Effects of bufalin on renal venous outflow urine flow and natriuresis in the anesthetized dog. In: Cox RH, ed. **Cellular and Molecular Mechanisms in Hypertension**, p. 205-210, 1991.
- ELIADES, D; SWINDALL, B; JOHNSTON, J; PAMNANI, M; HADDY, F. Hemodynamic effects of bufalin in the anesthetized dog. **Hypertension**, n. 13, v. 6, p. 690-695, 1989.
- ELKAREH, J; KENNEDY, DJ; YASHASWI, B; VETTETH, S; SHIDYAK, A; KIM, EG; SMAILI, S; PERIYASAMY, SM; HARIRI, IM; FEDOROVA, L; LIU, J; WU, L; KAHALEH, MB; XIE, Z; MALHOTRA, D; FEDOROVA, OV; KASHKIN, VA; BAGROV, AY; SHAPIRO, JI. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. **Hypertension**, n. 49, v. 1, p. 215-224, 2007.
- EL-MASRI, MA; CLARK, BJ; QAZZAZ, HM; VALDES, R JR. Human adrenal cells in culture produce both ouabain-like and dihydroouabainlike factors. **Clinical chemistry**, n. 48, v. 2, p. 1720-1730, 2002.
- ENDLICH, K; HOFFEND, J; STEINHAUSEN, M. Localization of endothelin ETA and ETB receptor-mediated constriction in the renal microcirculation of rats. **The Journal of Physiology**, n. 497, p. 211-218, 1996.

FEDOROVA OV, KOLODKIN NI, AGALAKOVA NI; ; LAKATTA, EG; BAGROV, AY. Marinobufagenin, an endogenous α -1 sodium pump ligand, in hypertensive Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension**, n. 37, p. 462-466, 2001a.

FEDOROVA, OV; AGALAKOVA, NI; MORRELL, CH; LAKATTA, EG; BAGROV, AY. ANP differentially modulates marinobufagenin-induced sodium pump inhibition in kidney and aorta. **Hypertension**, n. 48, p. 1160–1168, 2006.

FEDOROVA, OV; ANDERSON, DE; BAGROV, AY. Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity in adrenocorticotropin-treated rats. **American journal of hypertension**, n. 11, p 796–802, 1998.

FEDOROVA, OV; ANDERSON, DE; LAKATTA, EG; BAGROV, AY. Interaction of NaCl and behavioral stress on endogenous sodium pump ligands in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, n. 281, p. 352-358, 20001b.

FEDOROVA, OV; BAGROV, AY. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different α -subunit isoforms, **American Journal of Hypertension**, n.10, v. 8, p. 929-935, 1997.

FEDOROVA, OV; TALAN. MI; AGALAKOVA, NI; LAKATTA, EG; BAGROV, AY. Endogenous ligand of α (1) sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride--dependent hypertension. **Circulation**, n. 105, v. 9, p. 1122-1127, 2002.

FERRANDI, M; MANUNTA, P; BALZAN, S; HAMLYN, JM; BIANCHI, G; FERRARI P. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: Comparison of two independent assays. **Hypertension**, n. 30, v. 4, p. 886-896, 1997.

FERRARI P, FERRANDI M, VALENTINI G, BIANCHI, G. Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, n 290, v. 3, p.529-535, 2006.

FLIER J, EDWARDS MW, DALY JW, MYERS CW. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{-ATPase}$. **Science**, n.208, v. 4443, p. 503-505, 1980.

FONTELES, MC; GANAPATHY, V; PASHLEY, DH; LEIBACH, FH. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Science**, n. 33, v. 5, p. 431-436, 1983.

FONTELES, MC; HAVT, A; PRATA, RB; PRATA, PH; MONTEIRO, HS; LIMA, AA; JORGE, AR; SANTOS, CF; GREENBERG, RN; NASCIMENTO, NR. High-salt intake primes the rat kidney to respond to a subthreshold uroguanylin dose during ex vivo renal perfusion. **Regulatory peptides**, n.23, 2009.

FRIDMAN, AI; MATVEEV, SA; AGALAKOVA, NI; FEDOROVA, OV; LAKATTA, EG; BAGROV, AY. Marinobufagenin, an endogenous ligand of α -1 sodium pump, is a marker of congestive heart failure severity. **Hypertension**, n. 20, v. 6, p. 1189-1194, 2002.

FROHLICH ED. The Salt Conundrum: a hypothesis. **Hypertension**, n. 50, v. 1, p. 161-166, 2007.

GLITSCH; HG. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. **Physiological reviews**, n. 81, v. 4, p. 1791-826, 2001.

GONZALEZ-CAMPOY, JM; ROMERO, JC; KNOX, FG. Escape from the sodium retaining effects of mineralocorticoids: Role of ANF and intrarenal hormone systems. **Kidney International**, n. 35, p. 767-777, 1989.

GOTO, A; ISHIGURO, T; YAMADA, K; ISHII, M; YOSHIOKA, M; EGUCHI, C; SHIMORA, M; SUGIMOTO, T. Isolation of an urinary digitalis like factor indistinguishable from digoxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 173, v. 3, p. 1093-1101, 1990a.

GRANDINETTI, L. Biodiversity Sciences Technology. University of California, Berkeley, 2004. Disponível em: < http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?query_src=photos_fauna_sci-Amphibian&enlarge=0000+0000+0704+0152.

GRIFFITHS, NM; OGDEN, PH; CORMACK, R; LAMB, JF; GRIFFITHS, NM; OGDEN, PH; CORMACK, R; LAMB, JF. Discrepancy between the short and long term effects of ouabain on the sodium pumps of human cells grown in culture. **British journal of pharmacology**, n. 104, v. 2, p.:419-27, 1991.

GUNTERT, TW; LINDE, HHA. **Chemistry and Structure-Activity Relationships of Cardioactive Steroids**, Springer Verlag, Berlin, 1981.

GUYTON, AC. **Arterial Pressure and Hypertension**. Philadelphia, WB Saunders Co, 1980.

HAAS, M; ASKARI, A; XIE, Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. **The Journal of biological chemistry**, n. 275, v. 36, p. 27832-27837, 2000.

HADDY, F; PAMNANI, M. Role of dietary salt in hypertension. **Journal of the American College of Nutrition**, n. 14, v. 15, p. 428-438, 1995.

HADDY, FJ. Role of dietary salt in hypertension. **Life Sciences**, n. 79, v. 17, p.1585-1592, 2006.

HADDY, FW; OVERBECK, HW. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. **Life Sciences**, n.19, v. 7, p. 935-948, 1976.

HALL, JE; GUYTON, AC; COLEMAN, TG; MIZELLE, HL; WOODS, LL. Regulation of arterial pressure: Role of pressure natriuresis and diuresis. **Federation proceedings**, n.45, p. 2897-2903, 1986.

HALL, JE; MIZELLE, HL; HILDEBRANDT, DA; BRANDS, MW. Abnormal pressure natriuresis: a cause or a consequence of hypertension? **Hypertension**, n. 15, p. 547-559, 1990.

HALL, JE; MIZELLE, HL; WOODS, LL. The renin-angiotensin system and long-term regulation of arterial pressure. **Hypertension**, n. 4, p. 387-397, 1986.

HAMLYN JM; BLAUSTEIN MP; BOVA S; DUCHARME DW; HARRIS DW; MANDEL F; MATHEWS WR; LUDENS JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n. 88, v. 14, p. 6259-6263, 1991.

HAMLYN JM; RINGEL R; SCHAEFFER J; LEVINSON PD; HAMILTON BP; KOWARSKI AA; BLAUSTEIN MP. A circulating inhibitor of Na⁺/K⁺/ATPase associated with essential hypertension. **Nature**, n. 300, v. 5893, p. 650-652, 1982.

HAMRA, FK; FORTE, LR; EBER, SL; PIDHORODECKYJ, NV; KRAUSE, WJ; FREEMAN, RH; CHIN, DT; TOMPKINS, JA; FOK, KF; SMITH CE. Uroguanylin: structure and activity of a

second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 90, v. 22, p. 10464-10468, 1993.

HAN, KQ; HUANG, G; GU, W; SU, YH; HUANG, XQ; LING, CQ. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, n. 13, v. 24, p. 3374-3379, 2007.

HANSEN, O. No evidence for a role in signal-transduction of Na⁺/K⁺-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. **European Journal of Biochemistry**, n. 270, v. 90, p. 1916-1919, 2003.

HAUPTMAN PJ, KELLY RA. Digitalis. **Circulation**, n. 99, v. 9, p.1265-1270, 1999.

HELLER, M. Cardiac glycosides: new/old ideas about drugs. **Biochemical Pharmacology**, n. 40, v. 5, p. 919-925, 1990.

HENDLER, ED; TORRETTI, J; EPSTEIN, FH. The distribution of sodium-potassium--activated adenosine triphosphatase in medulla and cortex of the kidney. **The Journal of clinical investigation**, n. 50, v. 6, p. 1329-1337, 1971.

HOOK, JB. A positive correlation between natriuresis and inhibition of renal Na-K adenosine triphosphatase by ouabain. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n. n. 131, v. 3, p. 731-734, 1969.

HUANG, BS; AMIN, MS; LEENEN, FHH. The central role of the brain in salt-sensitive hypertension. **Current opinion in cardiology**, n. 21, 4, p. 295-304, 2006.

HUANG, BS; HARMSSEN, E; YU, H; LEENEN, FH. Brain ouabain-like activity and the sympathoexcitatory and pressor effects of central sodium in rats. **Circulation research**, n. 71, v. 5, p. 1059-1066, 1992.

HYMAN, AL; HYMAN, ES; JAQUES, WE. Observation on the direct effect of digoxin on renal excretion of sodium and water. **American heart journal**, n. 52, v. 4, p. 592-608, 1956.

JANZEN, P. Biodiversity Sciences Technology. University of California, Berkeley, 2008. Disponível em: < http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?query_src=photos_fauna_sci-Amphibian&enlarge=1111+1111+1111+7485.

JING, Y; OHIZUMI, H; KAWAZOE, N; HASHIMOTO, S; MASUDA, Y; NAKAJO, S., YOSHIDA, T., KUROIWA, Y; NAKAYA, K. Selective inhibitory effect of bufalin and growth of human tumor cells in vitro: association with the induction of apoptosis in Leukemia HL-60 cells. **Journal of Cancer Research**. n. 85, p. 645-651, 1994.

KAIDE, J; URA, N; TORII, T; NAKAGAWA, M; TAKADA, T; SHIMAMOTO, K. Effect of digoxin-specific antibody fab fragment (Digibind) on blood pressure and renal water. Sodium metabolism in 5/6 reduced renal mass hypertensive rats. **American journal of hypertension**, n. 12, v. 6, p. 611-619, 1999.

KAMANO, Y; YAMASHITA, A; NOGAWA, T; MORITA, H; TAKEYA, K; ITOKAWA, H; SEGAWA, T; YUKITA, A; SAITO, K; KATSUYAMA, M; PETTIT, G.R. QSAR evaluation of the Ch'an Su and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5. **Journal of Medicinal Chemistry**. n. 45, p. 5440-5447, 2002.

KASHKIN, VA; BAGROV, AY; FEDOROVA, OV; BAGROV, YY; AGALAKOVAC, NI; PATKINAA, NA; ZVARTAU, EE. Marinobufagenin (MBG) suppression of ethanol-seeking behavior is associated with inhibition of brain cortex Na/K-ATPase in mice. **European Neuropsychopharmacology**, n. 12, p. 217–223, 2002.

KAWAMURA, A; GUO, J; ITAGAKI, Y; BELL, C; WANG, Y; HAUPERT, GT JR; MAGIL, S; GALLAGHER, RT; BEROVA, N; NAKANISHI, K. On the structure of endogenous ouabain. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. n. 96, v. 12, p. 6654-6659, 1999.

KELLY RA; SMITH TW. Is ouabain the endogenous digitalis? **Circulation**, n.86, v. 2, p. 694-697, 1992.

KELLY, RA.; SMITH, TW. **Pharmacological Treatment of Heart Failure**, 9 ed, McGraw-Hill Comp, 1996.

KENNEDY, D; OMRAN, E; PERIYASAMY, SM; NADOOR, J; PRIYADARSHI, A; WILLEY, JC; MALHOTRA, D; XIE, Z; SHAPIRO, JI. Effect of chronic renal failure on cardiac contractile function, calcium cycling, and gene expression of proteins important for calcium homeostasis in the rat. **Journal of the American Society of Nephrology**, n. 14, v. 1, p. 90-97, 2003.

KENNEDY, DJ; VETTETH, S; XIE, M; PERIYASAMY, SM; XIE, Z; HAN, C; BASRUR, V; MUTGI, K. FEDOROV, V; MALHOTRA, D; SHAPIRO, JI. Ouabain decreases sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2a) activity in rat hearts by a process involving protein oxidation. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, n. 291, v.6, p. 3003-3011, 2006b.

KOMIYAMA, Y; DONG, XH; NISHIMURA, N; MASAKI, H; YOSHIKA, M; MASUDA, M; TAKAHASHI, H; A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure, **Clinical Biochemistry**, n. 38, v. 1, p. 36-45, 2005.

KOMIYAMA, Y; NISHIMURA, N; MUNAKATA, M; MORI, T; OKUDA, K; NISHINO, N; HIROSE, S; KOSAKA, C; MASUDA, M; TAKAHASHI, H; Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells. **J Hypertension**, n.19, p. 29–236, 2001.

KRAMER HJ; GONICK HC. Effect of extracellular volume expansion on renal Na-K-ATPase and cell metabolism. **Nephron**, n.12, p. 281-296, 1974.

KRENN, L; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, n. 1, v. 48, p. 1-29, 1998.

KREIS, W; REINHARD, E. Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glucosides by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. **Journal of Plant Physiology**, n. 128, p. 311-326, 1987.

KREIS, W; REINHARD, E. Uptake, metabolism, and storage of cardenolides by *Digitalis lanata* cells. **Pharm. Z.**, n. 130, v. 2315–2316, 1985.

LANESE, DM; YUAN, BH; MCMURTRY, IF; CONGER, JD. Comparative sensitivities of isolated rat renal arterioles to endothelin. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, n. 263, p. 894-899, 1992.

LAREDO, J; SHAH, JR; LU, Z-R; HAMILTON, BP; HAMLYN, JM . Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension**, n. 29, p. 401-407, 1997.

LAREDO, J; HAMILTON, BP; HAMLYN, JM. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, n.135, p. 794-797, 1994.

LAREDO, J; HAMILTON, JP; HAMLYN, JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochemical and biophysical research communications**, n. 212, p. 487-493, 1995.

LI, Z; CAI, T; TIAN, J; XIE, JX; ZHAO, X; LIU, L; SHAPIRO, JI; XIE, Z. NaKtide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes ouabain-activated signal transduction in cultured cells. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 31, v. 284, p. 21066-21076, 2009.

LIANG, M; CAI, T; TIAN, J; QU, W; XIE, ZJ. Functional characterization of Src-interacting Na/K-ATPase using RNA interference assay. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 281, p. 19709–19719, 2006.

LIANG, M; TIAN, J; LIU, L; PIERRE, S; LIU, J; SHAPIRO, J; XIE, ZJ. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **The Journal of biological chemistry**, n. 282, v. 14, p.10585-10593, 2007.

LIARD, JF. Cardiogenic **Hypertension**, in Guyton AC, Young DB (eds): Cardiovascular Physiology III, International Review of Physiology, vol 18. Baltimore, University Park Press, p. 317-355, 1979.

LICHTSTEIN, D; GATI, I; SAMUELOV, S; BERSON, D; ROZENMAN, Y; LANDAU, L; DEUTSCH J. Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses. **European Journal of Biochemistry**, n. 216, v.1, p. 261-268, 1993.

LICHTSTEIN, D; KACHALSKY, S; DEUTSCH, J. Identification of a ouabain-like compound in toad skin and plasma as a bufodienolide derivative. **Life Science**, n. 8, p. 1261-1270, 1986.

LIMA, LAA. **Estudos dos efeitos das toxinas do V. Cholerae e E. coli no rim isolado do rato**. 1983. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)– Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1983.

LING, G. History of the membrane (pump) theory of the living cell from its beginning in mid-19th century to its disproof 45 years ago—though still taught worldwide today as established truth. **Physiological Chemistry & Physics & Medical**, n. 39, v. 1, p. 1-67, 2007.

LINGREL, JB. Na⁺/K⁺-ATPase: isoform structure, function, and expression. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, n. 24, v. 3, p. 263-270, 1992.

LIU, J; PERIYASAMY, SM; GUNNING, W; FEDOROVA, OV; BAGROV, AY; MALHOTRA, D; XIE, Z; SHAPIRO, JI. Effects of cardiac glycosides on sodium pump expression and function in LLC-PK1 and MDCK cells. **Kidney international**, n. 62, v. 6, p. 2118-2125, 2002.

LIU, J; SHAPIRO, JI. Regulation of sodium pump endocytosis by cardiotonic steroids: molecular mechanisms and physiological implications. **Pathophysiology**, n.; 14, v. 3-4, p. 171-181, 2007.

LIU, J; TIAN, J; HAAS, M; SHAPIRO, JI; ASKARI, A; XIE, Z. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. **The Journal of biological chemistry**, n.5, v. 36, p. 27838-27844, 2000.

LOPATIN, DA; AILAMAZIAN, EK; DMITRIEVA, RI; SHPEN, VM; FEDOROVA, OV; DORIS, PA; BAGROV, AY. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in pre-eclampsia. **Journal of hypertension**, n. 17, v. 8, p. 1179-1187, 1999.

- LOREAUX, EL; KAUL, B; LORENZ, JN; LINGREL, JB. Ouabain-Sensitive alpha Na,K-ATPase enhances natriuretic response to saline load. **Journal of the American Society of Nephrology**, n. 9, v. 10, p. 1947-1954, 2008.
- LUDENS, JH; CLARK, MA; DUCHARME, DW; HARRIS, DW; LUTZKE, BS; MANDEL, F; MATHEWS, WR; SUTTER, DM; HAMLYN, JM. Purification of an endogenous digitalis-like factor from human plasma for structural analysis. **Hypertension**, n.17, v., p. 923-929, 1991.
- MANUNTA, P; HAMILTON, BP; HAMLYN, JM. Structure-activity relationship for hypertensinogenic activity of ouabain. Role of the sugar and lactone ring. **Hypertension**, n. 37, p. 472-477, 2001.
- MANUNTA, P; HAMILTON, J; ROGOWSKI, AC; HAMILTON, BP; HAMLYN, JM. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. **Hypertension research**, n.23, p. 77-85, 2000.
- MANUNTA, P; IACOVIELLO, M; FORLEO, C; MESSAGGIO, E; HAMLYN, JM; LUCARELLI, K; GUIDA, P; ROMITO, R DE TOMMASI E; BIANCHI, G; RIZZON, P; PITZALIS, MV. High circulating levels of endogenous ouabain in the offspring of hypertensive and normotensive individuals **Journal of hypertension**, n. 23, v. 9, p. 1677-1681, 2005.
- MARTINEZ-MALDONADO, M; OPAVA-STITZER, S. Urine concentration and dilution in the rat: contribution of papillary structures during high rates of urine flow. **Kidney International**, n. 13, v. 3, p. 194-200, 1978.
- MARTINS, JP; MONTEIRO, JC; PAIXÃO, AD. Renal function in adult rats subjected to prenatal dexamethasone. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, n. 30, v. 1-2, p. 32-37, 2003.
- MATHEWS, WR; DUCHARME, DW; HAMLYN, JM; HARRIS, DW; MANDEL, F; CLARK, MA; LUDENS, JH. Mass spectral characterization of an endogenous digitalis-like factor from human plasma, **Hypertension**, n. 17, v. 6, p. 930-935, 1991.
- MCGRATH M; DE BOLD M; DE BOLD A. The endocrine function of the heart. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, n.16, v. 10, p. 469-477, 2005.
- MENEZES, JC; DICHTCHEKENIAN, V. Digoxin antibody prevents cerebral hemorrhage-induced hypertension. **American journal of hypertension**, n. 16, p. 1062- 1065, 2003.
- MEYER, K.; LINDE, H. **Collection of Toad Venoms and Chemistry of the Toad Venom Steroids**, Academic Press, New York, 1971.
- MEYER, K; LINDE, H. Collection of toad venoms and chemistry of the toad venom steroids, in Buhcerl W, Buckley E (eds): **Venomous Animals and Their Venoms**. London, Academic Press, p 521-537, 1970.
- MICK, VE; ITANI, OA; LOFTUS, RW; HUSTED, RF; SCHMIDT, TJ; THOMAS, CP. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct *cis*-elements in the 5' -flanking region of the gene. **Molecular endocrinology**, n. 15, v. 4, p. 575-588, 2001.
- MIYAKAWA-NAITO, A; UHLÉN, P; LAL, M; AIZMAN, O; MIKOSHIBA, K; BRISMAR, H; ZELENIN, S; APERIA A.,Cell signaling microdomain with Na, K-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. **The Journal of biological chemistry**, n. 278, v. 50, p. 50355-50361, 2003.

MOHAMMADI, K; KOMETIANI, P; XIE, Z; ASKARI, A. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na₂/K₂-ATPase to ERK1/2. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 276, p. 42050–42056, 2001.

MURRELL, JR; RANDALL, JD; ROSOFF, J; ZHAO, JL; JENSEN, RV; GULLANS, SR; HAUPERT, GT JR. Endogenous ouabain. Upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. **Circulation**, n; 112: 1301-1308, 2005.

NAKANISHI, T; NISHINO, H; ICHIISHI, E; MUKAINAKA, T; OKUDA, M; TOKUDA, H. Inhibitory effects of bufadienolides on Epstein–Barr virus early antigen activation and on growth of mouse skin and mouse pulmonary tumors. *Nature Medicine*, n. 53, p. 324-328, 1999.

NECHAY, BR; JACKSON, RE; ZIEGLER, MG; NELDON, SL; THOMPSON, JD. Effects of chronic digitalization on cardiac and renal Na⁺ + K⁺-dependent adenosine triphosphate activity and circulating catecholamines in the dog. **Circulation Research**. n. 49, v. 3, p. 655-660, 1981.

NECHAY, BR; PALMER, RF; CHINOY, DA; POSEY, VAJ. The problem of Na⁺ + K⁺ adenosine triphosphatase as the receptor for diuretic action of mercurials and ethacrynic acid. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. 167, v. 3, p. 599-617, 1967.

NESHER, M; SHPOLANSKY, U; ROSEN, H; LICHTSTEIN, D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. **Life Sciences**, n. 80, p. 20932107, 2007.

NOBLE, D. Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. **Cardiovascular Research**, n. 14, p. 495–514, 1980.

NUMAZAWA, S; HONMA, Y; YAMAMOTO, T; YOSHIDA, T; KUROIWA, Y. A cardiotoxic steroid bufalin-like factor in human plasma induces leukemia cell differentiation. **Leukemia Research**, n. 19, v. 12, p. 945-953, 1995.

NYHOF, R; DABNEY, J; HADDY, FJ. Effect of ouabain on skin and skeletal muscle vascular beds in the dog forelimb. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n.158, p. 161-165, 1978.

O'BRIEN, WJ; LINGREL, JB; WALLICK, ET. Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium–potassium adenosine triphosphate. **Archives of biochemistry and biophysics**, n. 310, v. 1, p 32-39, 1994.

ODA, M; KUROSAWA, M; NUMAZAWA, S; TANAKA, S; AKIZAWA. T; ITO, K; MAEDA, M; YOSHIDA T. Determination of bufalin-like immunoreactivity in serum of humans and rats by time-resolved fluoroimmunoassay for using a monoclonal antibody. **Life Science**, n. 68, v. 10, p.:1107-1017, 2001.

OGIMOTO, G; YUDOWSKI, GA; BARKER, CJ; KÖHLER, M; KATZ, AI; FÉRAILLE, E; PEDEMONTE, CH; BERGGREN, PO; BERTORELLO, AM. G protein-coupled receptors regulate Na⁺/K⁺-ATPase activity and endocytosis by modulating the recruitment of adaptor protein 2 and clathrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 97, v. 7, p. 3242-3247, 2000.

OKEN, DE. Does the ultrafiltration coefficient play a key role in regulating glomerular filtration in the rat. **The American journal of physiology**, n. 256, p. 505-515, 1989.

- O'NEILL, J; INCIARTE, D; SWINDALL, B; HADDY, F. Effect of ouabain on norepinephrine vasoconstriction in the dog forelimb. **Federation proceedings**, n. 39, p. 582, 1980.
- ORLOV, SN; HAMET, P. The death of cardiotoxic steroid-treated cells: evidence of Na⁺,K⁺-independent H⁺-sensitive signalling. **Acta Physiologica**, n.187, v. 1-2, p. 231-240, 2006.
- PAMNANI, M; HADDY, F; ELIADES, D; SWINDALL, B. A comparison of the acute effects of two putative endogenous Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors on cardiorenal function in the dog and rat. **Hypertension**, n. 17, p. 438-439, 1991a.
- PAMNANI, MB; CHEN, S; YUAN, CM; HADDY, FJ. Chronic blood pressure effects of bufalin, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in rats. **Hypertension**, n. 23, p. 106-109, 1994.
- PANDEY, KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. **Peptides**, n. 26, v. 6, p. 901–932, 2005.
- PATEL, AR; KURASHINA, T; GRANGER, JP; KIRCHNER, KA. Acute Na⁺,K⁺-ATPase inhibition with bufalin impairs pressure natriuresis in the rat. **Hypertension**, n. 27, v. 3, p. 668-671, 1996.
- PERIYASAMY, SM; LIU, J; TANTA, F; KABAK, B; WAKEFIELD, B; MALHOTRA, D; KENNEDY, DJ; NADOOR, A; FEDOROVA, OV; GUNNING, W; XIE, Z; BAGROV, AY; SHAPIRO, JI. Salt loading includes redistribution of the plasmalemmal Na/K-ATPase in proximal tubule cells. **Kidney international**, n. 67, v. 5, p. 1868–1877, 2005.
- PFEIFFER, B; ROOS, W; LUCKNER, M. Accumulation of purpureaglycoside A in vacuoles of *Digitalis lanata* cells cultivated in vitro. **Planta Medica**, n. 45, v. 7, p. 154, 1982.
- PIERRE SV; XIE Z. The Na⁺/K⁺ATPase receptor complex: its organization and membership. **Cell Biochemistry and Biophysics**, n.46, v. 3, p. 303-316, 2006.
- PITZALIS, MV; HAMLYN, JM; MESSAGGIO, E; IACOVIELLO, M; FORLEO, C; ROMITO, R DE TOMMASI E; RIZZON, P; BIANCHI, G; MANUNTA, P. Independent and incremental prognostic value of endogenous ouabain in idiopathic dilated cardiomyopathy. **European journal of heart failure**, n. 8, v. 2, p. 179-186, 2006.
- PUSCHETT JB. Vascular effects of the bufodienolides. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, n. 119, p. 103-12, 2008.
- QAZZAZ, HM; CAO, Z; BOLANOWSKI, DD; CLARK, BJ; VALDES JR, R. De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, n. 50, v. 3, p. 612-620, 2004.
- RAUCH, AL; CAMPBELL, WG JR. Adrenal and vascular tyrosine hydroxylase activity in Goldblatt hypertension. **Hypertension**, n. 12, v. 4, p. 434-442, 1988.
- RIETBROCK, N; WOODCOCK, B. Two hundred years of foxglove therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, n. 6, p. 267-269, 1985.
- ROMAN, RJ. Pressure diuresis mechanism in the control of renal function and arterial pressure. **Federation proceedings**, n. 45, v. 13, p. 2878-2884, 1986.
- SAUNDERS, R; SCHEINER-BOBIS, G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. **European journal of biochemistry**, n. 271, v. 5, p.1054-1062, 2004.

SCHNEIDER R; ANTOLOVIC, R; KOST, H; SICH, B; KIRCH, U; TEPEL, M; ZIDEK, W; SCHONER, A. Proscillaridin, Immunoreactivity: its purification, transport in blood by a specific binding protein and its correlation with blood pressure. **Clinical and Experimental Hypertension**, n. 20, p. 593-599, 1998b.

SCHNEIDER, R; WRAY, V; NIMTZ, M; LEHMANN, WD; KIRCH, U; ANTOLOVIC, R; SCHONER, W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 273, v. 2, p. 784792, 1998a.

SCHONER W. Endogenous digitalis-like factors. **Clinical and Experimental Hypertension**, n. 14, v. 5; p. 767-856, 1992.

SCHONER W; SCHEINER-BOBIS G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. **American Journal of Physiology – Cellular Physiology**, n. 293, v. 2, p. 509-536, 2007.

SCHONER, W; SCHEINER-BOBIS, G. Role of endogenous cardiogenic steroids in sodium homeostasis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, n. 23, v. 9, p. 2723-2729, 2008.

SCHRIER RW, BERL T. Nonosmolar factors affecting renal water excretion (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, n. 292, v. 2, p. 81-88, 1975.

SCHRIER RW. Body fluid volume regulation in health and disease: a unifying hypothesis. **Annals of Internal Medicine**, n.113, v. 2, p. 155-159, 1990.

SHAH, JR; LAREDO, J; HAMILTON, BP; HAMLYN, JM. Effects of angiotensin II on sodium potassium pumps, endogenous ouabain, and aldosterone in bovine zona glomerulosa cells. **Hypertension**, n. 33, p. 373-377, 1999.

SICH, B; KIRCH, U; TEPEL, M; ZIDEK, W; SCHONER, W. Pulse pressure correlates with a proscillaridin A immunoreactive compound. **Hypertension**, n. 27, p. 1073-1078, 1996.

SILVA, LB; FERREIRA, CA; BLACHER, C; LEÃES, P. HADDAD, H. Peptídeo natriurético tipo-B e doenças cardiovasculares. *Arquivos Brasileiros de* **Cardiologia**, vol.81, n.5, p. 529-534, 2003.

SKOU, JC. The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 23, p. 394-401, 1957.

SMITH, TH. Ouabain - Specific Antibodies: Immunochemical Properties and Reversal of Na⁺, K⁺-Activated Adenosine Triphosphatase Inhibition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 51, 1972.

SMITH, CL; HE, Q; HUANG, L; FOSTER, E; PUSCHETT, JB. Marinobufagenin interferes with the function of the mineralocorticoid receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, n. 356, v. 4, p. 930-934, 2007.

SMITH, TW. The fundamental mechanism of inotropic action of digitalis. **Therapie**, n. 44, v. 6, 431-435, 1989.

SONGU-MIZE, E; NASH, CB; ELAM, JT; CALDWELL, RW. Metabolism and cardiac actions of a polar aminocardenolide and digoxin in the conscious dog. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, n. 226, p. 65-70, 1983.

- STOLL, A; SUTER, E; KREIS, W; BUSSEMAKER, BB; HOFMANN, A. Die herzaktiven substanzen der meerzwiebel - Scillaren A. **Helvetica Chimica Acta**, n. 16, p. 703, 1933.
- STOLL, A; HOFFMANN, A; KREIS, W. Über glykosidspaltende Enzyme der Digitalisblätter. 12.Mitt. über Herzglykoside. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, n. 235, p. 249-264, 1935.
- TAMAKI, T; FUKUI, K; FUJIOKA, S; IWAO, H; OKAHARA, T; ABE, Y. Effects of ouabain on autoregulation of renal blood flow in dogs. **The American journal of physiology**, n. 250, p. 109-114, 1986.
- TAYLOR, CB. The effect of mercurial diuretics on adenosinetriphosphatase of rabbit kidney in vitro. **Biochemical Pharmacology**. n. 12, v. 539, 1963.
- THEURER, C; TREUMANN, H-J; FAUST, T; MAY, U; KREIS, W. Glycosylation in cardenolide biosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 2-3, v, 38, p. 327-335, 1994.
- THOMAS, W; MCENEANEY, V; HARVEY, B. Aldosterone-induced signaling and cation transport in the distal nephron. **Steroids**, n. 73, p. 979-984, 2008.
- THOMPSON, JMA; DICKINSON, CJ. The relation between the excretion of sodium and water and the perfusion pressure in the isolated, blood-perfused, rabbit kidney, with special reference to changes occurring in clip-hypertension. **Clinical science and molecular medicine**, n. 0, p. 223-236, 1976.
- TIAN, X; LOU, Y; LIU, YP; HOU, KZ; JIN, B; ZHANG, JD; WANG, S. Down regulation of Bcl-2 and survivin expression and release of Smac/DIABLO involved in bufalin-induced HL-60 cell apoptosis. **Zhonghua Xueyexue Zazhi**, n. 27, p. 21-24, 2006.
- TORRETTI, J; HENDLER, E; WEINSTEIN, E; LONGNECKER, RE; EPSTEIN, FH. Functional significance of Na- K-ATPase in the kidney: effects of ouabain inhibition. **The American journal of physiology**, n. 222, v. 6, p. 1398-1405, 1972.
- VATNER, SF; HIGGINS, CB; FRANKLIN, D; BRAUNWALD, E. Effects of digitalis glycoside on coronary and systemic dynamics in conscious dogs. **Circulation research**, n. 28, v. 4, p. 470-479, 1971.
- WALLICK, ET; LANE, KL; SCHWARTS, A: Biochemical mechanism of the sodium pump. **Annual review of physiology**, n. 41, p. 397-411, 1979.
- WANG, YW; CHIAO, YC; TSAI, SC; LU, CC; CHEN, JJ; SHIH, HC; CHEN, YH; LIN, H; HWU, CM; WANG, PS. Inhibition of Bufalin on Pituitary and Testicular Function in Rats. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. 283, p. 528-532, 1997.
- WANG, H; YUAN, W; LU, Z. Effects of ouabain and digoxin on gene expression of sodium pump alpha-subunit isoforms in rat myocardium. **Chinese medical journal**, n.114, v. 10m p. 1055-1059, 2001.
- WASSERSTROM, JA; AISTRUP, GL. Digitalis: new actions for an old drug. **American. Journal of Physiology**, n. 289, p. 1781-1793, 2005.
- WICHTL M.;BTIHL W; HUESMANN G; FINGERHUT, *Digitalis L.* - bekannte und wenig bekannte Vertreter einer wichtigen Arzneipflanzengattung, **Deutsche Apotheker Ztg**, n. 46 p. 2391-2400, 1987.

WILLIAM, M; VIEN, J; HAMILTON, E; GARCIA, A; BUNDGAARD, H; CLARKE, RJ; RASMUSSEN, HH. The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na/K-pump in isolated rabbit cardiac myocytes. **The Journal of physiology**, n. 565, p. 815-825, 2005.

WILLIAMS, MH JR; ZOHMAN, LR; RATNER, AC. Hemodynamic effects of cardiac glycosides on normal human subjects uring rest and exercise. **Journal of applied physiology**, n.13, p. 417-421, 1958.

WOOLFSON, RG; GRAVES, J; LABELLA, FS; TEMPLETON, JF; POSTON, L. Effect of bufalin and pregnanes on vasoreactivity of human resistance arteries.

Biochemical and biophysical research communications, n.186, p. 1-7, 1992.

XIAO, AY; WEI, L; XIA, S; ROTHMAN, S; YU, SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. **Journal of Neuroscience**, n. 22, p. 1350–1362, 2002.

XIE Z; ASKARI A. Na⁺/K⁺ATPase as a signal transducer. **European Journal of Biochemistry**, n. 269, p. 2434-2439, 2002.

XIE, Z; CAI, T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. **Molecular interventions**, n. 3, p.157-168, 2003.

XIE, Z; XIE, J. The Na/K-ATPase-mediated signal transduction as a target for new drug development. **Frontiers in bioscience**, n.10, p. 3100-3109, 2005.

YAMADA, K; HINO, K; TOMOYASU, S; HONMA, Y; TSURUOKA, N. Enhancement by bufalin of retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells in primary culture. **Leukemia research**, n. 22, p. 589-395, 1998.

YATES, NA; MCDOUGALL, JG. Effects of direct renal arterial infusion of bufalin and ouabain in conscious sheep. **British Journal of Pharmacology**, n. 108, v. 3, p. 627-630, 1993.

YOSHIKA, M; KOMIYAMA, Y; KONISHI, M; AKIZAWA, T; KOBAYASHI, T; DATE, M; KOBATAKE, S; MASUDA, M; MASAKI, H; TAKAHASHI, H. Novel digitalis-like factor, marinobufotoxin, isolated from culturedY-1 cells, and its hypertensive effect in rats. **Hypertension**, n; 49, v. 1, p. 209-214, 2007.

YUAN, CM; MANUNTA, P; HAMLYN, JM; CHEN, S; BOHEN, E; YEUN, J; HADDY, JF; PAMNANI, MB. Long-term ouabain administration produces hypertension in rats. **Hypertension**, n. 22, p.178-187, 1993.

ZHANG, L; NAKAYA, K; YOSHIDA, T; KUROIWA, Y. Bufalin as a potent inducer of differentiation of human myeloid leukemia cells. **Biochemical and biophysical research communications**, n.178, p. 686–693, 1991.

ZHANG, L; NAKAYA, K; YOSHIDA, T; KUROIWA, Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. **Cancer Res**, n. 52, p. 4634–4641, 1992.

ANEXOS

Anexo – Parecer do Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “*Efeitos de hormônios esteróides da adrenal na função renal e vascular de ratos*” registrado sob o número **47/2009 (09172555-0)**, tendo como pesquisador principal **Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética para o Uso de Animais** da Universidade Estadual do Ceará (CEUA - UECE), tendo sido aprovado em **18 de setembro de 2009**. Este certificado expira-se em **18 de setembro de 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled “*Efeitos de hormônios esteróides da adrenal na função renal e vascular de ratos*” registered with the **protocol 47/2009 (09172555-0)**, under the supervision of **Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** of Ceará State University (CEUA - UECE), and was approved in **September 18, 2009**. This certificate will expire in **September 18, 2013**.

Fortaleza, Ceará, Brasil, 18 de setembro de 2009.


José Mário Girão Abreu
Presidente CEUA-UECE

Anexo 2 – Método de Diluição da Urina

DIURESE	DILUIÇÃO	
	INULINA	PAH
0,0010	40X	10X
0,0015	40X	10X
0,0017	40X	10X
0,0020	30X	8X
0,0022	30X	8X
0,0025	25X	6X
0,0027	25X	6X
0,0030	20X	6X
0,0032	20X	6X
0,0035	20X	6X
0,0037	20X	6X
0,0040	15X	5X
0,0042	15X	5X
0,0045	15X	5X
0,0050	15X	5X
0,0055	10X	4X
0,0060	10X	4X
0,0065	10X	4X
0,0070	10X	4X
0,0075	10X	4X

Quadro 3. Diluição da Urina

Obs.:

INULINA

10X – 1mL:10mL

15X – 1mL:15mL

20X – 0,5mL:10mL

25X – 1mL:25mL

30X – 0,5mL:15mL

40X – 0,25mL:10mL

PAH

2X – 1mL:2mL

4X – 1mL:4mL

6X – 1mL:6mL

8X – 1mL:8mL

10X – 1mL:10mL

Plasma

Velocidade Rápida: 10mL/Kg/h

Velocidade Lenta: 1mL/Kg/h

Inulina

Velocidade: 1,2mL/h

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](#)