

HELANE SANTOS TITO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS
DE RESISTÊNCIA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO CRÔNICO COM OUABAÍNA**

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

São Paulo
2013

HELANE SANTOS TITO DE OLIVEIRA

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

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

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

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Helane Santos Tito de.

Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao tratamento crônico com ouabaína / Helane Santos Tito de Oliveira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do sistema vascular.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the vascular reactivity in mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats submitted to chronic ouabain treatment.

1. Hipertensão 2. Ouabaína 3. Endotélio vascular 4. Disfunção endotelial 5. Artérias mesentéricas de resistência I. Rossoni, Profa. Dra. Luciana Venturini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0180/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Helane Santos Tito de Oliveira.

Título da Tese: Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao tratamento crônico com ouabaína.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

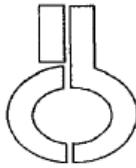
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **001** nas fls. **53** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Luciana Venturini Rossoni, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Alterações funcionais em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao tratamento crônico com ouabaina: avaliação do possíveis mecanismos envolvidos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Helane Santos Tito de Oliveira** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **24.03.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 25 de março de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Of.CEUA.024.11

São Paulo, 21 de junho de 2011.

REF.: Protocolo nº001/08.

"Alterações funcionais em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao tratamento crônico com ouabaina: avaliação do possíveis mecanismos envolvidos"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 24.03.2014.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,


Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB /USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. LUCIANA VENTURINI ROSSONI
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus Pais, maiores motivadores
do início, percurso e conclusão
desta etapa da minha vida.

A minha irmã, por acreditar
que eu poderia finalizar
esta Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Luciana Veturini Rossoni, pela orientação deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e amizade, que contribuíram de forma significativa para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier, por despertar o interesse pela Fisiologia Vasculuar, e por apresentar-me a Profa. Dra. Luciana V. Rossoni, influenciando diretamente na decisão de fazer a seleção do Doutorado em Fisiologia Humana da Univesidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Eliana H. Akamine, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade para discussão de assuntos da farmacologia.

Aos Professores do Instituto de Ciências Biomédicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Profa. Dra. Lisete C. Micheline e a Profa. Dra. Maria O. de Souza, pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas.

Às amigas: Camilla Ferreira Wenceslau, Emília Cristina Peres, Gisele Kruger Couto, importantes durante essa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vasculuar: Aldair Neto, Angelo Bernak, Carol Catto, Dieniffer Neves e Suliana Mesquita, por proporcionar troca de conhecimentos e momentos de descontração.

Aos colegas da Pós-graduação em Fisiologia Humana da USP, pela troca de conhecimentos nas disciplinas e nos laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas.

As amigas de residência: Eveline Fonseca, Maíra Valle, Ana Paula Freitas e Rosélia Damasceno pelos momentos de descontração, muito importante, para quem está longe da família.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, pela disposição, atenção e auxílio sempre que precisei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado. Foi fundamental na realização dessa Pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro e tecnológico, imprescindível ao desenvolvimento deste projeto.

Enfim, agradeço a todos, que ao longo desses anos fizeram parte de minha vida, contribuindo, direta ou indiretamente, com este trabalho e com meu crescimento pessoal e profissional.

"Todos os dias, Deus nos dá um momento em que é possível mudar tudo que nos deixa infelizes. O instante mágico é o momento em que um 'sim' ou um 'não' pode mudar toda a nossa existência".

Mahatma Gandhi

"Não somos o que deveríamos ser; não somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que eramos".

Martin Luther King

RESUMO

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

O tratamento crônico de ratos normotensos e/ou espontaneamente hipertensos (SHR) com ouabaína (OUA) é capaz de induzir hipertensão arterial (HA) ou elevar os níveis pressóricos desses animais, respectivamente. Nos SHR a HA adicional induzida pela administração crônica de OUA está associada ao aumento da sensibilidade à fenilefrina em anéis de artéria caudal. Assim, considerando que alterações no estado contrátil dos vasos de resistência são importantes para regulação da pressão arterial, o objetivo desse estudo foi avaliar se o tratamento crônico com OUA é capaz de modificar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de SHR e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos. SHR com 45 dias de vida foram submetidos ao tratamento por cinco semanas com: veículo (CT, N=39) ou OUA (30 µg/kg/dia, sc, N=42); adicionalmente, grupos CT e OUA foram co-tratados com ácido acetilsalicílico (AAS, 100 mg/kg/dia, gavagem) constituindo os grupos CT-AAS (N=18) e OUA-AAS (N=16); ou nimesulida (NID, 20 mg/Kg/dia, gavagem) formando os grupos CT-NID (N=11) e OUA-NID (N=10). Durante os tratamentos, a pressão arterial caudal (PAC) foi medida semanalmente por pletismografia de cauda. Ao final do tratamento, mediante eutanásia, o leito mesentérico foi removido e os terceiros ramos da artéria mesentérica foram dissecados e montados em um miógrafo de arame. A técnica de *Western-blot* foi utilizada para avaliar a expressão protéica da sintase de óxido nítrico (NOS) endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) (* $p < 0,05$, Teste *t*). O tratamento com OUA elevou a PAC dos SHR (CT: $171 \pm 1,7$ vs. OUA: $184 \pm 3,3^*$ mmHg). A resposta contrátil à noradrenalina (NOR, $10 \eta\text{M}$ - $30 \mu\text{M}$) foi avaliada na ausência e na presença de L-NAME (100 µM), um inibidor da NOS; de indometacina (INDO, $10 \mu\text{M}$), um inibidor da ciclooxigenase 1/2 (COX1/2), do furagrelato (FURA, $10 \mu\text{M}$), um inibidor da sintase do tromboxano A_2 (TXA₂), do SQ 29,548 (1 µM), um antagonista do receptor de TXA₂, dentre outros fármacos. Na ausência dos inibidores, a contração induzida pela NOR foi maior nas AMR dos animais tratados com OUA quando comparado aos CT (CT: $3,70 \pm 0,10$ vs. OUA: $4,12 \pm 0,07^*$ mN/mm). A incubação com L-NAME aumentou a reatividade à NOR nos dois grupos. Porém, a magnitude desse aumento foi menor nas AMR do grupo OUA. Na presença de INDO, FURA e SQ 29,548 a contração à NOR foi reduzida apenas nas AMR do grupo OUA. A expressão protéica da eNOS (32%*) e da nNOS (36%*) foram reduzidas nas AMR no grupo OUA. Os tratamentos com AAS e NID preveniram o aumento na PAC e na reatividade à NOR nas AMR dos SHR tratados com OUA; sugerindo que, nesse modelo, as alterações pressóricas e vasculares são mediadas por produtos da COX-2. Esse aumento da resposta contrátil das AMR à NOR deve-se a uma redução da modulação nitrérgica, via redução da síntese de NO, e a um aumento da vasoconstrição mediada pelo TXA₂ via COX-2. Assim, o aumento da pressão arterial observado em SHR tratados com ouabaína por cinco semanas é decorrente do prejuízo da modulação endotelial em artérias mesentéricas de resistência.

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

ABSTRACT

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

Chronic treatment of normotensive and/or spontaneously hypertensive rats (SHR) with ouabain (OUA) induces arterial hypertension or raising blood pressure levels in these animals, respectively. Additionally, in SHR, hypertension induced by chronic administration of OUA is associated with an increased sensitivity to phenylephrine in caudal artery rings. Thus, whereas changes in the contractile state of resistance vessels are important for blood pressure regulation, the aim of this study was to evaluate whether chronic treatment with OUA is able to modify vascular reactivity in mesenteric resistance arteries (MRA) of SHR and assess the possible mechanisms involved. Thus, male, SHR at 45 days old were treated for five weeks with: vehicle (CT, N=39) or OUA (30 mg/kg/day, sc, N=42); additionally CT and OUA groups were co-treated with acetylsalicylic acid (ASA 100 mg/kg/day, gavage) constituting CT-ASA (N=18) and OUA-ASA (N=16) groups; or nimesulide (NID 20 mg/kg/day, gavage) forming CT-NID (N=11) and OUA-NID (N=10) groups. During this period, the caudal blood pressure (BP) was measured weekly by the tail cuff method. At the end of treatment, after euthanasia, mesenteric bed was removed and third branches of the superior mesenteric artery were dissected and mounted on a wire myograph. Western blot technique was used to evaluate the protein expression of nitric oxide synthase (NOS), endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) (* $p < 0.05$, t -Test). At the end of the treatment BP was higher in the OUA group (CT: 171 ± 1.7 vs. OUA: $184 \pm 3.3^*$ mmHg). The contractile response to norepinephrine (NOR 10^{-7} M - 30μ M) was evaluated in the presence and absence of L-NAME (100μ M), a NOS inhibitor, indomethacin (INDO 10μ M), an inhibitor the cyclooxygenase1/2 (COX1/2), furegrelate (FURE 10μ M), an inhibitor of thromboxane synthase A_2 (TXA₂), SQ 29.548 (1μ M), an antagonist of TXA₂ receptor, among other drugs. In the absence of inhibitors, the NOR-induced contraction was higher in the MRA of OUA treated animals compared as to CT (CT: 3.70 ± 0.10 vs. OUA: $4.12 \pm 0.07^*$ mN/mm). The incubation with L-NAME increased the NOR-induced contraction in the MRA of both groups. However, the magnitude of this increase was lower in the MRA of OUA group. In the presence of INDO, FURE and SQ 29.548 the contraction evoked by NOR was reduced only in the MRA of OUA group. The protein expression of eNOS (32%*) and nNOS (36%*) were reduced in the MRA of OUA group. Co-treatment with ASA and NID prevented the increase in BP and in reactivity to NOR in MRA of SHR treated with OUA, suggesting that, vascular and pressure changes are mediated by products of COX-2. This increase in contractile response of the NOR in MRA of OUA treated SHR is due to a reduction in the nitrergic modulation, through reduction of NO synthesis; and an increase in vasoconstriction mediated by TXA₂ via COX-2. Thus, increased blood pressure observed in SHR treated with ouabain for five weeks is due to the impairment of endothelial modulation in MRA.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hipertensão arterial	15
1.1.1 Ouabaína	17
1.1.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	22
1.2 Objetivo	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Modelos experimentais	27
2.2 Avaliação do peso corporal	27
2.3 Avaliação da pressão arterial pelo método indireto de pletismografia de cauda	28
2.4 Estudo da reatividade vascular em artérias de resistência do leito vascular mesentérico	28
2.4.1 Normalização das artérias de resistência	28
2.4.2 Protocolos experimentais	29
2.4.2.1 Avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio	29
2.4.2.2 Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina	30
2.4.2.2.1 Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina	30
2.4.2.2.2 Efeito do bloqueio dos canais para potássio ativados por Ca⁺² sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina	30
2.4.2.2.3 Efeito das espécies reativas derivadas do oxigênio sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina	31
2.4.2.2.4 Efeito do bloqueio de prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina	31
2.5 Estudo da expressão proteica	32
2.6 Drogas e Diluições	33
2.7 Expressão dos resultados e análise estatística	34
3 RESULTADOS	36
3.1 Efeito do tratamento crônico com ouabaína	36
3.1.2 Peso Corporal	36
3.1.2 Pressão Arterial	37

3.1.3 Reatividade Vasculiar	38
3.1.3.1 <i>Diâmetro interno e Tensão ativa</i>	38
3.1.3.2 <i>Avaliação dos relaxamentos dependente e independente do endotélio</i>	38
3.1.3.3 <i>Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina</i>	39
3.1.4 Expressão proteica da eNOS e nNOS	48
3.2 Efeito do tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS) e nimesulida (NID) associado ao tratamento crônico com ouabaína	49
3.2.1 Peso Corporal	49
3.2.2 Pressão Arterial	50
3.2.3 Reatividade Vasculiar	52
3.2.3.1 <i>Diâmetro interno e Tensão ativa</i>	52
3.2.3.2 <i>Avaliação dos relaxamentos dependente e independente do endotélio</i>	53
3.2.3.3 <i>Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina</i>	54
4 DISCUSSÃO	56
4.1 Efeito do tratamento crônico com ouabaína	56
4.2 Efeito do tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS) e nimesulida associado ao tratamento crônico com ouabaína	64
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS*	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.1 Ouabaína

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A hipertensão arterial induzida pela ouabaína tem um componente central. Além da hipertensão arterial, o tratamento com ouabaína por duas semanas resulta em aumento no conteúdo de ouabaína no hipotálamo e nas adrenais (Huang et al., 1994; Manunta et al., 1994; Veerasingham, Leenen 1999). Os efeitos centrais da ouabaína envolvem a hiperatividade simpática e a participação do sistema renina-angiotensina (Huang, Leenen 1999). A hipertensão arterial e a hiperatividade simpática causada pela hipertensão arterial induzida pela ouabaína ou pela infusão de líquido cefalorraquidiano rico em Na⁺ são revertidas com o tratamento com um antagonista do receptor AT₁ (Zhang, Leenen 2001) comprovando a participação do sistema renina-angiotensina nesse modelo experimental. A administração de ouabaína subcutânea, por duas semanas, aumenta o conteúdo de angiotensina II e reduz a densidade da enzima conversora de angiotensina e do receptor AT₁ no hipotálamo (Cheung et al., 2006).

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

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

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

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

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

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

1.1.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Objetivo

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelos experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com 45 dias de vida, comprados do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Esses ratos foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP, em gaiolas, sob condições controle de temperatura (22 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação. Os protocolos experimentais foram realizados nesses animais, mediante aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas/ USP em 24/03/2008 sob protocolo número 001 na folha 53 do livro 02.

Os SHR foram divididos em seis grupos experimentais: controle (CT, N=39), ouabaína (OUA, N=42), controle tratado com ácido acetilsalicílico (CT-AAS, N=18), ouabaína tratado com ácido acetilsalicílico (OUA-AAS, N=16), controle tratado com nimesulida (CT-NID, N=11) e ouabaína tratado com nimesulida (OUA-NID, N=10). Os animais dos grupos CT e OUA foram submetidos ao tratamento por cinco semanas, com veículo (óleo de soja) ou ouabaína (30 µg/kg/dia, s.c.), respectivamente, como descrito previamente por Manunta et al. (1994). Os SHR dos grupos CT e OUA, CT-AAS e OUA-AAS, CT-NID e OUA-NID adicionalmente ao tratamento com veículo ou ouabaína, também foram tratados diariamente, por gavagem, com veículo (carboximetilcelulose 5%) ou ácido acetilsalicílico (100 mg/kg/dia) ou nimesulida (20 mg/kg/dia), respectivamente (Abdelrahman, Al Suleimani, 2008; Al Suleimani et al., 2010; Wu et al., 2002).

2.2 Avaliação do peso corporal

A avaliação do peso corporal dos ratos estudados foi realizada antes do início de cada tratamento: veículo ou ouabaína ou ácido acetilsalicílico ou nimesulida; e semanalmente, durante todo período experimental, totalizando seis medidas em cada animal. Para isso, os animais foram colocados sobre uma balança (Balança Contadora CI, Filizola, São Paulo, Brazil) e o peso foi aferido.

2.3 Avaliação da pressão arterial pelo método indireto de pletismografia de cauda

A pressão arterial indireta foi medida pelo método de pletismografia de cauda (LE 5001, Panlab - Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha). Primeiramente, os animais foram adaptados ao procedimento de insuflação e desinsuflação do manguito acoplado a cauda, enquanto, permaneciam aquecidos (27-32 °C) e em contenção. Em seguida, foi iniciado o procedimento de registro da pressão arterial caudal (PAC). Assim, a PAC foi obtida por meio da média de 10 procedimentos sequenciais de insuflação e desinsuflação do manguito. Antes do início do tratamento, a PAC foi representada pelo valor médio obtido após o terceiro dia de adaptação dos animais ao sistema de pletismografia; e após o início do tratamento, essa medida foi obtida, semanalmente, durante cinco semanas, em cada animal.

2.4 Estudo da reatividade vascular em artérias de resistência do leito vascular mesentérico

Ao final de cinco semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados com uma mistura anestésica contendo cetamina, xilazina e acepromazina (64,9; 3,2; 0,78 mg/kg, *i.p.*, respectivamente) e, em seguida, mortos por exsanguinação. Os experimentos de reatividade vascular foram realizados de acordo com o método descrito por Mulvany e Halpern (1977). Dessa forma, o leito mesentérico foi removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit (KHS) gaseificada (95% O₂ e 5% CO₂), com a seguinte composição (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,5; glicose 11; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2 e EDTA 0,01, a 4°C. Os terceiros ramos da artéria mesentérica superior foram dissecados e cortados em segmentos de 2,0 mm de comprimento e, em seguida, montados em um miógrafo para registro de tensão isométrica em artérias de resistência (Modelo 610M, Danish Myo Tech, Dinamarca), o qual estava conectado a um sistema de aquisição e registro de dados (PowerLab Chart 5.5.6, ADInstruments, Sydney, Austrália).

2.4.1 Normalização das artérias de resistência

Após um período de estabilização de 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), as artérias foram estiradas em uma tensão de repouso

considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Esta tensão foi determinada com base na razão circunferência interna: tensão de parede em cada segmento. A circunferência interna (L) foi ajustada para 90% daquela que os vasos teriam quando estivessem submetidos a uma pressão transmural de 100 mmHg (Mulvany e Halpern, 1977). O diâmetro luminal efetivo (D) foi determinado de acordo com a equação $D = L/\pi$.

Depois do processo de normalização, as artérias permaneceram em repouso por 30 minutos, e, em seguida, foram contraídas com cloreto de potássio (KCl, 120 mM) para avaliar sua integridade funcional. Os anéis de artérias mesentéricas de resistência foram submetidas a mais duas exposições ao KCl (120 mM), com intervalos de 15 minutos entre cada exposição. A média da diferença entre a tensão de repouso e tensão máxima desenvolvida na 2ª e na 3ª exposição ao KCl, correspondeu a tensão ativa (mN/mm) desenvolvida por cada anel.

2.4.2 Protocolos experimentais

Todos os protocolos experimentais descritos a seguir foram realizados nas artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA. Contudo, nas artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT-AAS, OUA-AAS, CT-NID e OUA-NID foram avaliados apenas os relaxamentos dependente e independente do endotélio e a resposta vasoconstritora à noradrenalina, esta no entanto, na ausência de qualquer inibidor ou antagonista.

2.4.2.1 Avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio

Após 30 minutos da última contração induzida pelo KCl, foram avaliadas as respostas de relaxamento dependente do endotélio. Para isso, inicialmente, os anéis foram pré-contraídos com noradrenalina (10 μ M, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). Como descrito por Xavier et al. (2008), essa concentração de noradrenalina produz contrações mais estáveis que aquelas produzidas por concentrações mais baixas desse agonista ou pela construção de uma curva concentração-resposta para obtenção de um platô de contração em artérias mesentéricas de resistência. A função endotelial foi avaliada por meio do

relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (0,1 η M a 30 μ M, Sigma-Aldrich) após a obtenção do platô de contração à noradrenalina.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado nos anéis, com endotélio íntegro, os quais foram submetidos a avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina, sem a adição de nenhum fármaco bloqueador ou inibidor das vias que foram avaliadas durante o presente estudo. Assim, 1 hora após a construção da curva de contração à noradrenalina, os anéis foram pré-contraídos com U46619 (1 μ M, Sigma-Aldrich), mimético do tromboxano A_2 , e após a obtenção de uma resposta contrátil estável, as curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 η M a 100 μ M, Sigma-Aldrich) foram obtidas.

2.4.2.2 Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina

Sessenta minutos após a avaliação da função endotelial, e confirmação da viabilidade do endotélio, curvas concentração-resposta à noradrenalina (10 η M a 30 μ M), foram realizadas de forma cumulativa, em anéis denominados E+.

2.4.2.2.1 Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.

A influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi avaliada pela incubação dos anéis com um inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico (NOS), o N^G -Nitroarginina Metil Éster (L-NAME, 100 μ M, Sigma-Aldrich), que foi adicionado ao banho 30 minutos antes do início da construção curva concentração-resposta à noradrenalina.

2.4.2.2.2 Efeito do bloqueio dos canais para potássio ativados por Ca^{+2} sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.

A influência do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) sobre a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi avaliada pela incubação dos anéis de artérias mesentéricas de resistência com o tetraetilamônio (TEA, 5 mM, Sigma-Aldrich), um bloqueador não-seletivo de canais para potássio, que foi adicionado ao banho 30 minutos antes do início da construção da curva concentração-resposta à noradrenalina.

2.4.2.2.3 Efeito das espécies reativas derivadas do oxigênio sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.

A influência do ânion superóxido sobre a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi avaliada pela pré-incubação de alguns anéis de artéria mesentérica de resistência com um varredor de ânion superóxido, a superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL, Sigma-Aldrich). Por sua vez, a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina, foi estudada por meio da pré-incubação de alguns anéis com catalase (CAT, 1000 U/mL, Sigma-Aldrich), uma oxidorreductase que catalisa a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 . Alguns anéis também foram pré-incubados com SOD e CAT (SOD+CAT), com o objetivo de inibir tanto a produção do ânion superóxido como do H_2O_2 . Em todas as situações, os fármacos foram adicionados no banho 30 minutos antes do início da construção da curva concentração-resposta à noradrenalina.

2.4.2.2.4 Efeito do bloqueio de prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina.

A participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi avaliada pela pré-incubação de alguns anéis vasculares com: indometacina (INDO, 10 μ M, Sigma-Aldrich), um inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase 1/2 (COX1/2); 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-trifluorometilpirazola (SC-560, 9 η M, Cayman Chemical, Ann Arbor, Estados Unidos), inibidor seletivo da COX-1; N-(2ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metansulfonamida (NS-398, 10 μ M, Cayman Chemical), inibidor seletivo da COX-2; ridogrel (RIDO, 1 μ M, Sigma-Aldrich), um inibidor da sintase do trombonaxo A_2 (TXA_2) e da prostaglandina H_2 (PGH_2) e antagonista do receptor de TXA_2 (TP); furagrelato (FURA, 10 μ M, Cayman Chemical), um inibidor da sintase do tromboxano A_2 ; ou 1S-[1a,2a(Z),3a,4a]-7-[3-[[2-(fenilamino carbonol]hidrazino]metil]-7-oxabicyclo [2.2.1] hepto-2-yl]-5-ácido heptanóico (SQ 29,548), um antagonista do receptor TP (SQ, 1 μ M, Cayman Chemical). Cada fármaco foi adicionado ao banho 30 minutos antes do início da construção de cada curva concentração-resposta à noradrenalina.

2.5 Estudo da expressão proteica

A técnica de *Western blot* foi utilizada para avaliar a expressão proteica das isoformas endotelial e neuronal da sintase de óxido nítrico (eNOS e nNOS) nos grupos CT e OUA.

As artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram homogeneizadas em um tampão contendo RIPA Lysis buffer, Fenilmetil Sulfonil Fluoreto (PMSF, 100 mM), Na_3VO_4 (100 mM), coquetel inibidor de proteases (PIC, Sigma-Aldrich) e centrifugadas a 3000 RPM à 4°C por 15 minutos. O total de proteína em cada amostra foi mensurado utilizando o kit de proteína BCATM (Pierce Protein Research, Rockford, Estados Unidos). Em seguida, 100 μg de proteína, diluídas 1:1 em Laemmli, foram aplicadas em um gel com SDS (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 3% e submetidas à eletroforese em um gel com SDS a 7,5% no sistema Mini-Protean II (Eletrophoresis Cell, BioRad, EUA) durante aproximadamente 2 horas, com voltagem de 100V (Power Pac 200, BioRad, Hercules, Estados Unidos). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (Amersham Biosciences, Piscataway, Estados Unidos) previamente ativada com metanol, utilizando um sistema de sanduíche e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Módulo de transferência, BioRad) contendo a solução de transferência. Nesse procedimento, o sistema foi submetido a uma corrente de 180 mA durante 18 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finalizada a transferência, as membranas foram lavadas com ácido acético (1%) por cinco minutos, e em seguida coradas em Ponceau (0,1% em ácido acético), por vinte minutos para confirmar a transferência. Após a confirmação da transferência, as membranas foram novamente lavadas com ácido acético (1%), e depois com água destilada. Posteriormente, foram incubadas por 12h, a 4°C , com anticorpos anti eNOS e nNOS. Para isso, primeiramente, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% dissolvido em tampão Tris (Tris 10 mM; NaCl 100 mM e Tween 20 0,1 %) por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas por toda noite, sob agitação, a 4°C , com solução bloqueante contendo os anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas: anticorpo primário monoclonal contra a isoforma eNOS (1:1000, BD Transduction Laboratories, San Jose, Estados Unidos); e anticorpo primário monoclonal contra a isoforma nNOS (1:1000, BD Transduction Laboratories).

Depois disto, as membranas foram submetidas a quatro lavagens (cada uma com 10 minutos de duração) com solução de Tris, sob agitação. Posteriormente, estas foram incubadas com anticorpos secundários específicos para as proteínas estudadas: imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado à peroxidase (1:1000, Bio-Rad) para as isoformas nNOS e eNOS. Ao final, o excesso dos anticorpos secundários foi lavado quatro vezes por 10 minutos com solução de Tris. Os imunocomplexos foram detectados por um sistema de detecção de quimioluminescência para peroxidase (ECL Plus, Amersham International; Little Chalfont, Reino Unido) seguida de autoradiografia (Hyperfilm ECL, Amersham International).

As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram gravados por um scanner conectado a um computador e os blots de proteínas foram quantificados pelo programa Scion Image. A mesma membrana foi usada para detectar a expressão da proteína α -actina (1:10000, Sigma-Aldrich), e esta foi usada como controle interno para a normalização da expressão protéica das isoformas eNOS e nNOS em cada amostra. Os resultados (média \pm EPM) da expressão proteica das isoformas eNOS e nNOS, normalizadas pela α -actina, foram expressos em porcentagem do CT.

2.6 Drogas e Diluições

As drogas utilizadas no presente estudo foram: ouabaína, ácido acetilsalicílico, nimesulida, noradrenalina, acetilcolina, nitroprussiato de sódio, L-NAME, TEA, SOD, catalase e indometacina, obtidas da Sigma-Aldrich (EUA); U46619, SC-560, NS-398, ridogrel, furagrelato e SQ 29,548, obtidos da Cayman Chemical; e Tween 20, Tris, SDS e Acrilamida, obtidos da Bio-Rad. O preparo das soluções-estoque foi feito em água destilada, exceto para: a ouabaína, que foi dissolvida em óleo de soja; o ácido acetilsalicílico e a nimesulida, que foram dissolvidos em carboximetilcelulose 5%; o U46619 e o SQ 29,548, que foram dissolvidos em etanol; o NS-398, que foi dissolvido em dimetil formamida (DMSO), o ridogrel, que foi dissolvido em salina contendo Na₂CO₃ (2%) e NaOH (40 mM); e a indometacina que foi dissolvida em Tris 0,1 M.

As soluções-estoque foram mantidas a -20°C e, as diluições a serem utilizadas, foram preparadas antes de cada lote de experimentos.

2.7 Expressão dos resultados e análise estatística

A resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina e pelo KCl foram expressas em tensão ativa. Esta tensão (mN/mm) representa a razão entre a variação de tensão (mN) produzida pelo anel em resposta a adição do fármaco vasoconstritor e o dobro do seu comprimento (mm). No entanto, como o software de aquisição dos dados (PowerLab Chart 5.5.6, ADInstruments) possibilitou o registro em mN/mm, a tensão ativa foi obtida, simplesmente, pela diferença entre a tensão basal e a tensão máxima desenvolvida para cada fármaco vasoconstritor.

As respostas de relaxamento dos anéis vasculares foram avaliadas a partir da diferença entre o valor basal e a tensão atingida durante o platô de pré-contracção com noradrenalina ou U46619. Assim, as respostas vasodilatadoras à acetilcolina e ao NPS foram expressas pela porcentagem entre a variação de tensão obtida durante o relaxamento produzido por cada concentração de acetilcolina ou NPS, e a variação de tensão obtida durante a pré-contracção.

Para a determinação do $\log EC_{50}$ (valor das concentrações de acetilcolina ou nitroprussiato de sódio que produziriam 50% da resposta máxima) foi realizado análise de regressão não-linear das curvas concentração-resposta. E esses cálculos foram realizados utilizando o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos).

Para comparar os efeitos de diferentes drogas sobre a curva de concentração-resposta à noradrenalina, os resultados foram expressos como diferenças da área sob a curva (dAUC) de concentração-resposta à noradrenalina nas condições controle e após o pré-tratamento com o fármaco. AUC foram calculadas a partir da curva de concentração-resposta (GraphPad Software) e as diferenças foram expressas como porcentagem da diferença da AUC na correspondente situação controle.

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada por teste *t*, pareado e/ou não pareado, e análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias de acordo com a necessidade, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram

considerados estatisticamente significativos. O cálculo das médias e os testes estatísticos também foram efetuados utilizando o programa Prism 5.0.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do tratamento crônico com ouabaína

3.1.2 Peso Corporal

Na Figura 1 observa-se a evolução temporal do peso corporal dos SHRs alocados aos grupos CT e OUA ao longo das cinco semanas de tratamento. O peso corporal dos animais tanto do grupo CT como OUA aumentou gradativamente a partir da primeira semana de tratamento. No entanto, esse parâmetro não foi significativamente diferente entre os dois grupos ao longo das cinco semanas de tratamento (5ª semana de tratamento: CT: $232 \pm 3,7$ (N=17) vs. OUA: $239 \pm 4,5$ (N=18) g; Teste *t*: $p > 0,05$).

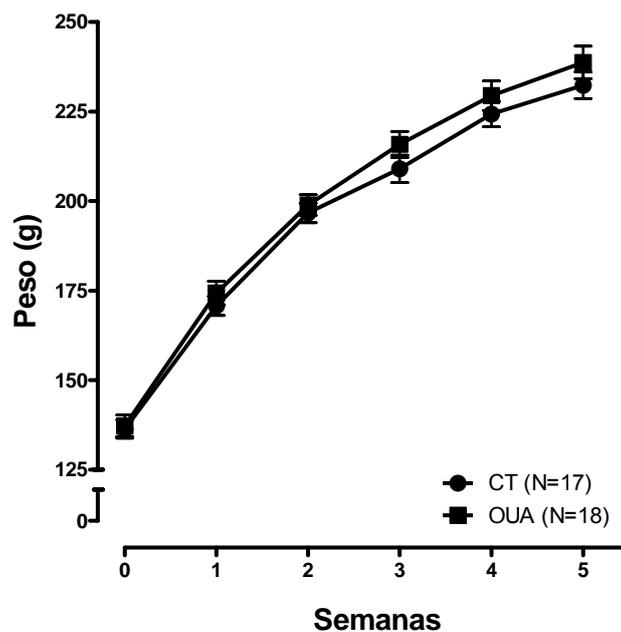


Figura 1. Peso corporal ratos espontaneamente hipertensos tratados diariamente com veículo (CT) e ouabaína (OUA, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados.

3.1.2 Pressão Arterial

A Figura 2 demonstra a evolução temporal da pressão arterial caudal (PAC) nos grupos CT e OUA ao longo das cinco semanas de tratamento. Observe-se que antes do início do tratamento com OUA, os SHR não eram hipertensos. Durante o período de tratamento, a PAC dos animais do grupo CT aumentou progressivamente a partir da primeira semana. Porém, o aumento observado entre a terceira e quinta semana, não foi significativo, permanecendo os valores pressóricos praticamente estabilizados. A PAC dos SHR do grupo OUA seguiu o mesmo padrão observado no grupo CT. Porém, nesses animais, o aumento da PAC foi mais pronunciado, entre a quarta e a quinta semana de tratamento. Além disso, diferente do observado na PAC do grupo CT, os valores de pressão arterial no grupo OUA ficaram estáveis somente entre a quarta e a quinta semana de tratamento (5ª semana de tratamento: CT: $171 \pm 1,7$ (N=16) vs. OUA: $184 \pm 3,3^*$ (N=17) mmHg; Teste *t*. * $p < 0,05$ vs. CT) (Figura 2).

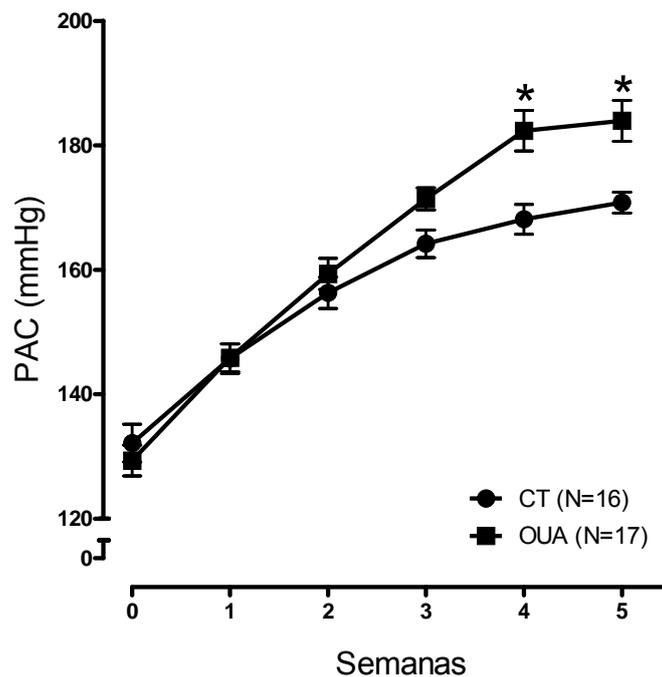


Figura 2. Pressão arterial caudal (PAC) de ratos espontaneamente hipertensos tratados diariamente com veículo (CT) ou ouabaina (OUA, 30 μ g/kg, s.c.) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): * $p < 0,05$ vs. CT.

3.1.3 Reatividade Vascular

3.1.3.1 Diâmetro interno e Tensão ativa

O diâmetro interno normalizado a 90% do diâmetro que o vaso apresentaria se submetido a pressão transmural de 100 mmHg (CT: $265 \pm 3,4$ (N=29) vs. OUA: $257 \pm 5,0$ (N=30) μm ; Teste *t*: $p > 0,05$), e a tensão ativa induzida por 120 mM de KCl (CT: $2,41 \pm 0,06$ (N=29) vs. OUA: $2,43 \pm 0,05$ (N=30) mN/mm; Teste *t*: $p > 0,05$) foram similares nos anéis de terceiro ramo das artérias mesentéricas dos grupos CT e OUA.

3.1.3.2 Avaliação dos relaxamentos dependente e independente do endotélio

A resposta de relaxamento dependente do endotélio induzida pela acetilcolina (ACh, 0,1 ηM a 30 μM), em anéis de artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA, produziu uma curva bifásica, ou seja, relaxamento nas concentrações de 0,1 ηM a 100 ηM , e contração nas concentrações de 0,3 μM a 30 μM (Figura 3A). No entanto, a resposta produzida pela acetilcolina, não foi significativamente diferente entre as artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA (Figura 3A).

Como observado na Figura 3B, o nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 ηM a 100 μM) promoveu relaxamento, independente do endotélio, de forma dependente da concentração utilizada, em anéis de artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos CT e OUA. No entanto, o relaxamento induzido pelo NPS, não foi significativamente diferente, quando comparadas as respostas das artérias provenientes dos grupos CT e OUA (E_{MAX} : CT: $92,2 \pm 0,9$ vs. OUA: $92,0 \pm 1,0$ %; Teste *t*, $p > 0,05$; e pD_2 : CT: $7,4 \pm 0,13$ vs. OUA: $7,2 \pm 0,19$; Teste *t*, $p > 0,05$).

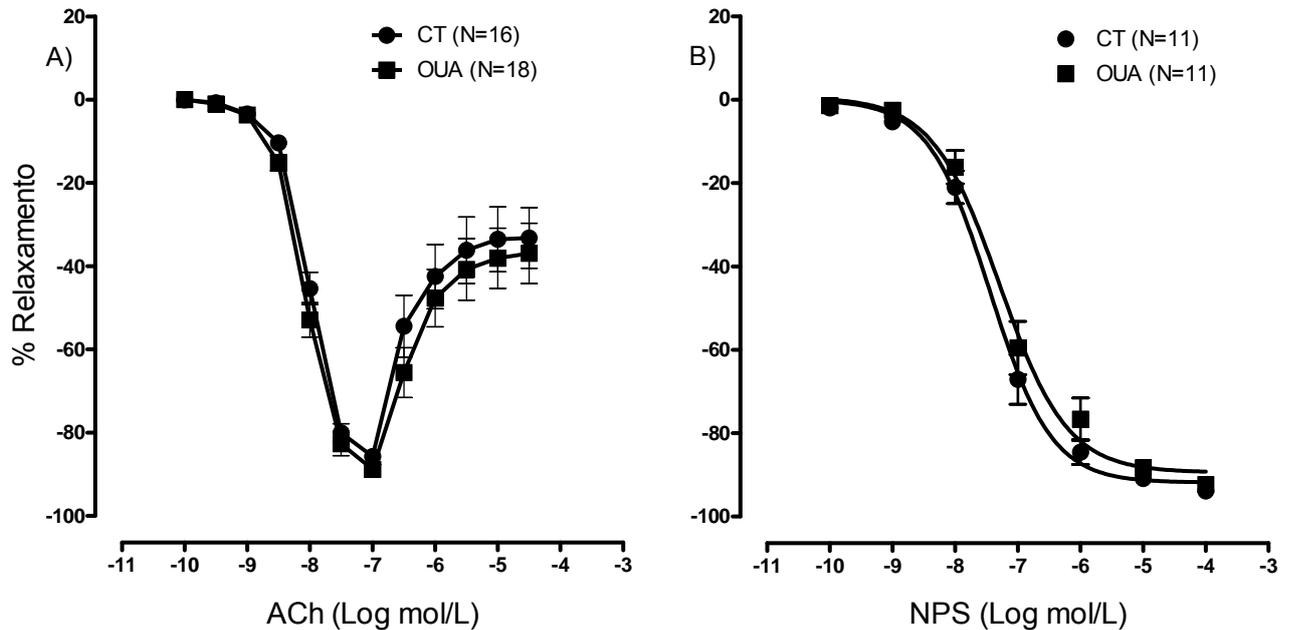


Figura 3. Relaxamentos dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (ACh, 0,1 η M a 30 μ M, **A**) e independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 η M a 100 μ M, **B**) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT) ou ouabaina (OUA, 30 μ g/kg, s.c.) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias).

3.1.3.3 Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina

A resposta contrátil à noradrenalina (NOR, 10 η M a 30 μ M) foi avaliada, primeiramente, em anéis com endotélio íntegro (E+). A noradrenalina induziu contração de forma dependente da concentração utilizada em anéis de artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos CT e OUA (Figura 4). No entanto, a resposta máxima à noradrenalina foi maior nas artérias provenientes dos animais tratados com OUA, quando comparada aos controles (E_{MAX} : CT: 3,70 \pm 0,10 vs. OUA: 4,12 \pm 0,07* mN/mm, Teste t * p <0,05) (Figura 4). Por outro lado, não houve diferença na pD_2 entre as artérias dos grupos estudados (pD_2 : CT: 5,53 \pm 0,05 vs. OUA: 5,54 \pm 0,042, Teste t p >0,05).

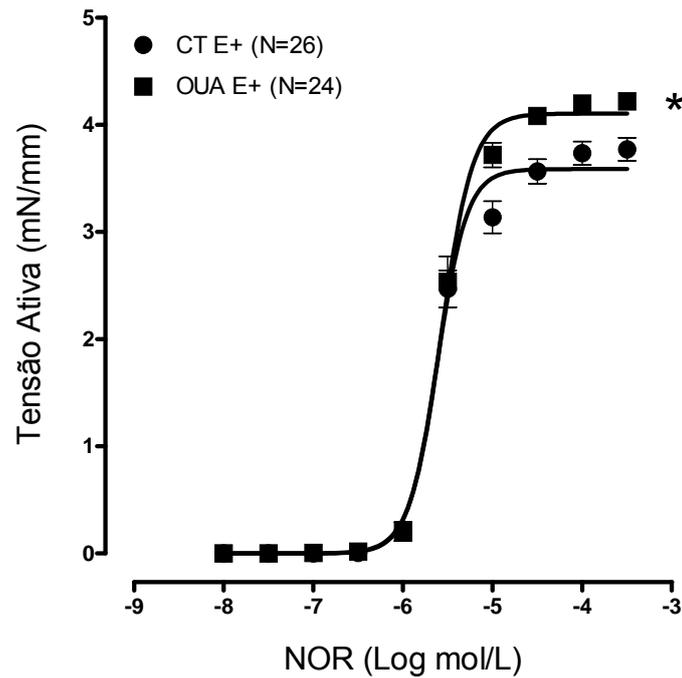


Figura 4. Curva de concentração-resposta à noradrenalina (NOR, $10\eta\text{M}$ a $30\mu\text{M}$) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos com endotélio íntegro (E+) que foram tratados diariamente com veículo (CT) ou ouabaína (OUA, $30\mu\text{g/kg}$, s.c) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias). * $p < 0,05$ vs. CT.

Para avaliar o papel do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à noradrenalina, os anéis de artérias mesentéricas de resistência foram incubados com L-NAME ($100\mu\text{M}$). O pré-tratamento das artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA, com L-NAME, aumentou a contração induzida pela noradrenalina (Figuras 5A, 5B). Porém, a magnitude desse aumento foi menor nas artérias do grupo OUA, como pode ser visualizado pela menor área sob a curva à noradrenalina (dAUC, gráfico entre Figuras 5A e 5B) nas artérias do grupo OUA quando comparado ao CT.

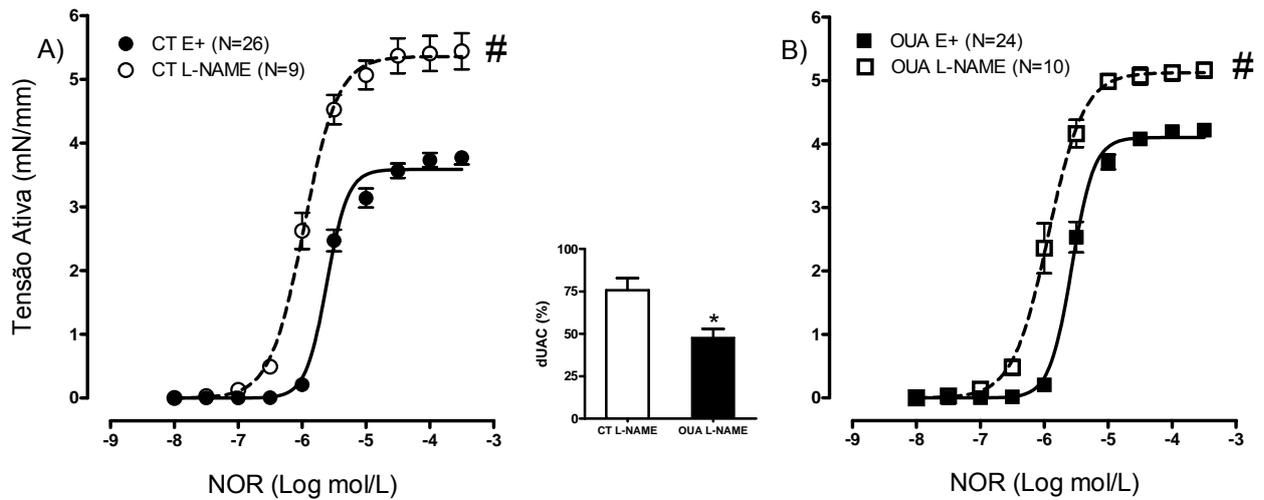


Figura 5. Efeito da inibição da sintase do óxido nítrico com N^G-Nitroarginina Metil Éster (L-NAME, 100 μ M) sobre a contração induzida pela noradrenalina (NOR, 10 η M a 30 μ M) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT, **A**) ou ouabaína (OUA, 30 μ g/kg, s.c, **B**) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): # p <0,05 vs. E+. Gráfico inserido apresenta as diferenças na área sob a curva (dAUC) à noradrenalina em artérias dos grupos CT e OUA na presença de L-NAME. Valores da dAUC (média \pm EPM) são expressos como porcentagem da diferença da correspondente AUC de segmentos na condição controle (Teste t , * p <0,05 vs. CT).

Para investigar o papel do fator hiperpolarizante derivado do endotélio sobre a resposta contrátil à noradrenalina, os anéis de artérias mesentéricas de resistência foram incubados com TEA (5 mM). O pré-tratamento das artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA, com TEA, aumentou significativamente a contração induzida pela noradrenalina apenas no grupo CT (Figuras 6A e 6B). Os valores da dAUC (gráfico inserido entre as Figura 6A e 6B) comprovam que o TEA exerceu um menor efeito sobre a curva à noradrenalina em artérias do grupo OUA quando comparado ao CT.

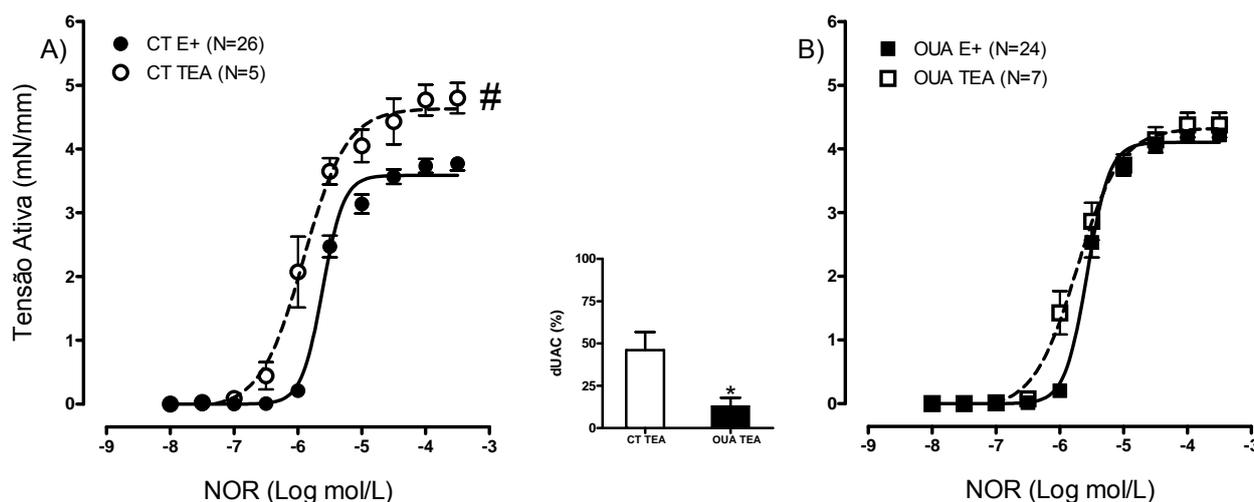


Figura 6. Efeito da inibição dos canais para potássio ativados por Ca^{+2} com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) sobre a contração induzida pela noradrenalina (NOR, 10 nM a $30\text{ }\mu\text{M}$) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT, **A**) ou ouabaína (OUA, $30\text{ }\mu\text{g/kg}$, *s.c.*, **B**) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): # $p < 0,05$ vs. E+. Gráfico inserido apresenta as diferenças na área sob a curva (dAUC) à noradrenalina em artérias dos grupos CT e OUA na presença de TEA. Valores da dAUC (média \pm EPM) são expressos como porcentagem da diferença da correspondente AUC de segmentos na condição controle (Teste *t*, * $p < 0,05$ vs. CT).

Para determinar a participação das espécies reativas derivadas do oxigênio na resposta contrátil à noradrenalina, os anéis de artérias mesentéricas de resistência foram incubados com superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL), catalase (CAT, 1000 U/mL) ou com a combinação SOD e CAT (SOD + CAT). A pré-incubação com SOD não modificou a contração induzida pela noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA (Figuras 7A e 7B). Além do mais, os valores da dAUC em artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA na presença da SOD não diferiram estatisticamente entre os grupos (gráfico inserido entre as figuras 7A e 7B). A pré-incubação dos anéis de artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA, com catalase reduziu de forma significativa, a contração induzida pela noradrenalina nas artérias dos dois grupos estudados (Figuras 7C e 7D). Porém, sem evidenciar diferença na dAUC entre as artérias dos animais CT e OUA (gráfico inserido entre as figuras 7C e 7D). Indo de encontro com os resultados descritos acima, o pré-tratamento de artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA com a combinação SOD e catalase reduziu, de modo significativo, a contração induzida pela noradrenalina nos dois grupos estudados (Figuras 7E e 7F); porém, de essa redução foi de mesma magnitude como demonstrado pelos valores da dAUC (gráfico inserido entre as figuras 7E e 7F).

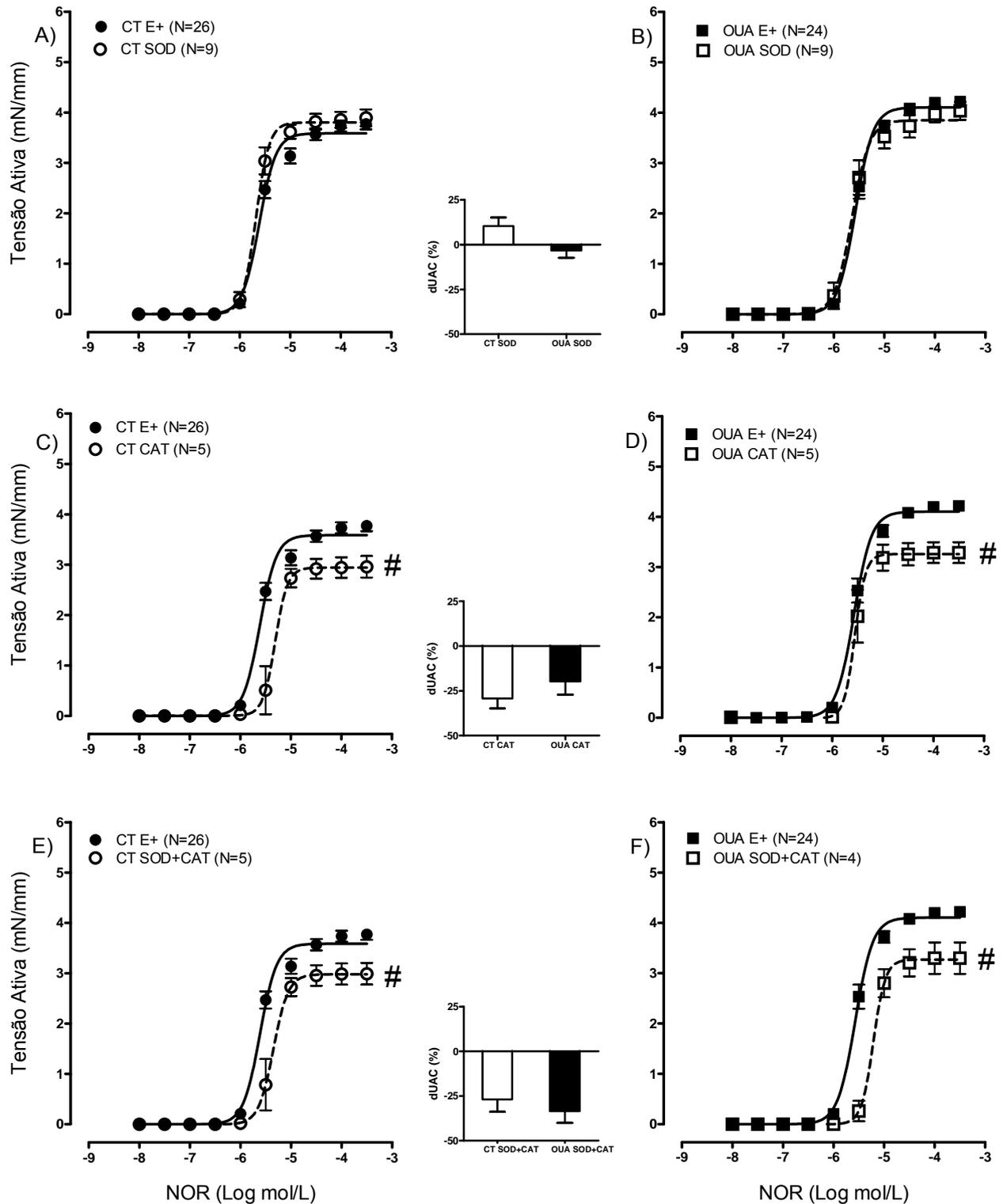


Figura 7. Efeito da incubação dos anéis vasculares com superóxido dismutase (SOD, 150U/mL; **A,B**), da catalase (CAT, 1000U/mL, **C,D**); e da SOD e catalase (SOD+CAT; **E,F**) sobre a contração induzida pela noradrenalina (NOR, $10\eta\text{M}$ a $30\mu\text{M}$) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT, **A,C,E**) ou ouabaina (OUA, $30\mu\text{g/kg}$, *s.c.*; **B,D,F**) por 5 semanas. Resultados expressos como média±EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): # $p<0,05$ vs. E+. Gráfico inserido apresenta as diferenças na área sob a curva (dAUC) à noradrenalina em artérias dos grupos CT e OUA na presença de SOD ou CAT ou SOD+CAT. Valores da dAUC (média±EPM) são expressos como porcentagem da diferença da correspondente AUC de segmentos na condição controle (Teste *t*).

Para investigar a influência dos prostanóides derivados do ácido araquidônico e o papel das isoformas da COX sobre as curvas de contração à noradrenalina, alguns anéis foram incubados primeiramente, com o inibidor não seletivo da COX1/2, a indometacina (INDO, 10 μ M), e outros anéis, com os inibidores seletivos para a COX-1 (SC-560, 9 η M) e para a COX-2 (NS-398, 10 μ M). A pré-incubação de artérias mesentéricas de resistência de SHR do grupo CT com INDO, não modificou a resposta contrátil à noradrenalina (Figuras 8A). No entanto, o pré-tratamento das artérias mesentéricas de resistência de SHR do grupo OUA, com INDO, reduziu significativamente a resposta contrátil à noradrenalina (Figuras 8B); como evidenciado pelo maior magnitude da dAUC nas artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA quando comparado ao CT (gráfico inserido entre as figuras 8A e 8B). A pré-incubação, de artérias provenientes do grupo CT e OUA, com o inibidor seletivo da COX-1 (SC-560), reduziu a contração à noradrenalina em ambos os grupos (Figura 8C e 8D). Porém, a magnitude dessa redução foi maior nas artérias provenientes do grupo OUA, uma vez que, o maior efeito do SC-560 sobre as artérias do grupo OUA é percebido pela maior redução nos valores da dAUC nesse grupo quando comparado ao CT (figura inserida entre os gráficos 8C e 8D). De forma diferente, a pré-incubação de artérias mesentéricas de resistência do grupo CT com o inibidor seletivo da COX-2 (NS-398) não modificou, significativamente, a resposta contrátil à noradrenalina (Figura 8E). Entretanto, nas artérias provenientes do grupo OUA, NS-398, reduziu significativamente a contração à noradrenalina (Figura 8F). Os valores da dAUC indicam uma maior participação de prostanóides derivados da COX-2 nas artérias mesentéricas do grupo OUA quando comparado ao CT (gráfico inserido entre as figuras 8E e 8F).

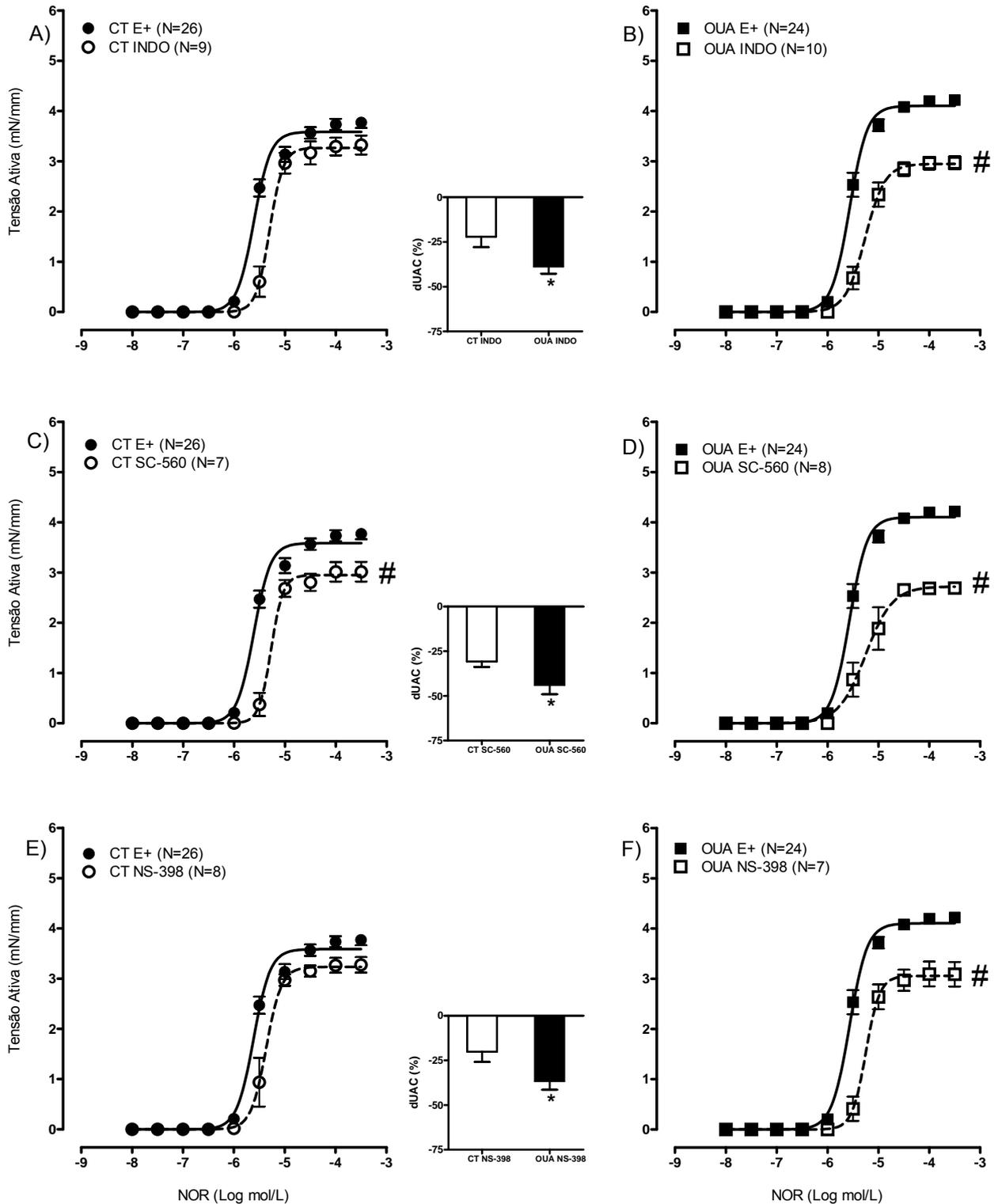


Figura 8. Efeito da indometacina (INDO, 10 μ M; **A,B**); do SC-560 (9 η M; **C,D**); e do NS-398 (10 μ M; **E,F**) sobre a contração induzida pela noradrenalina (NOR, 10 η M a 30 μ M) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT; **A,C,E**) ou ouabaína (OUA; 30 μ g/kg, *s.c.*; **B,D,F**) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): #*p*<0,05 vs. E+. Gráfico inserido apresenta as diferenças na área sob a curva (dAUC) à noradrenalina em artérias dos grupos CT e OUA na presença de INDO ou SC-560 ou NS-398. Valores da dAUC (média \pm EPM) são expressos como porcentagem da diferença da correspondente AUC de segmentos na condição controle (Teste *t*, **p*<0,05 vs. CT).

Para estudar a influência dos prostanóides vasoconstritores derivados da COX1/2 sobre a resposta contrátil à noradrenalina, os anéis de artérias mesentéricas de resistência foram pré-incubados com ridogrel (1 μ M), furagrelato (10 μ M) ou SQ 29,548 (1 μ M). O pré-tratamento de artérias mesentéricas de resistência de animais do grupo CT com ridogrel, um inibidor da sintase do TXA₂/PGH₂ e antagonista do receptor TP, com o furagrelato, um inibidor seletivo da sintase do TXA₂, ou com o SQ 29,548, um antagonista do receptor TP não modificou a resposta contrátil à noradrenalina (Figuras 9A, 9C e 9E). No entanto, quando artérias provenientes do grupo OUA foram pré-tratadas com esses fármacos, observou-se uma redução significativa da resposta contrátil à noradrenalina (Figuras 9B, 9D e 9F). Os valores da dAUC (gráfico inserido entre as figuras) demonstraram um maior envolvimento da enzima TXA₂ sintase e do receptor TP no aumento de contração à noradrenalina nas artérias mesentéricas de resistência dos animais OUA quando comparado aos CT. Conjuntamente, essas respostas comprovam o envolvimento do TXA₂ via receptor TP no aumento da resposta contrátil à noradrenalina no grupo OUA.

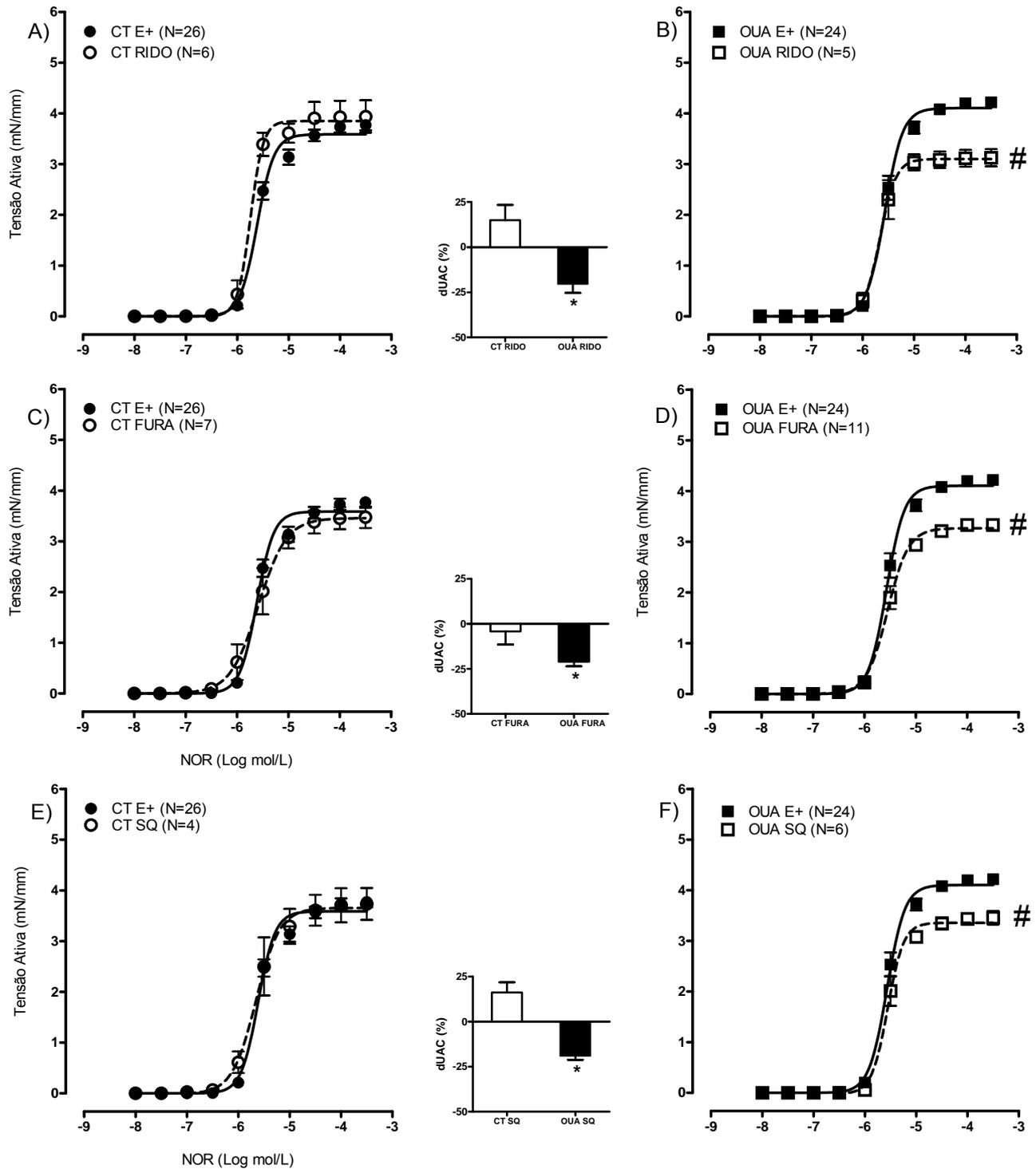


Figura 9. Efeito do ridogrel (RIDO, 1 μ M; **A,B**); do furagrelato (FURA, 10 μ M; **C,D**); e do SQ 29,548 (SQ, 1 μ M; **E,F**) sobre a contração induzida pela noradrenalina (NOR, 10 η M a 30 μ M) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT; **A,C,E**) ou ouabaína (OUA, 30 μ g/kg, s.c.; **B,D,F**) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): # p <0,05 vs. E+. Gráfico inserido apresenta as diferenças na área sob a curva (dAUC) à noradrenalina em artérias dos grupos CT e OUA na presença de RIDO ou FURA ou SQ. Valores da dAUC (média \pm EPM) são expressos como porcentagem da diferença da correspondente AUC de segmentos na condição controle (Teste t , * p <0,05 vs. CT).

3.1.4 Expressão proteica da eNOS e nNOS

As Figuras 10A e 10B mostram, respectivamente, a expressão proteica da eNOS e nNOS detectada por *Western blot* em artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA. O tratamento crônico com ouabaína reduziu, em artérias mesentéricas de resistência, as expressões proteicas tanto da eNOS (18*%), quanto da nNOS (36*%), quando comparado ao grupo tratado com veículo (Teste *t*: * $p < 0,05$).

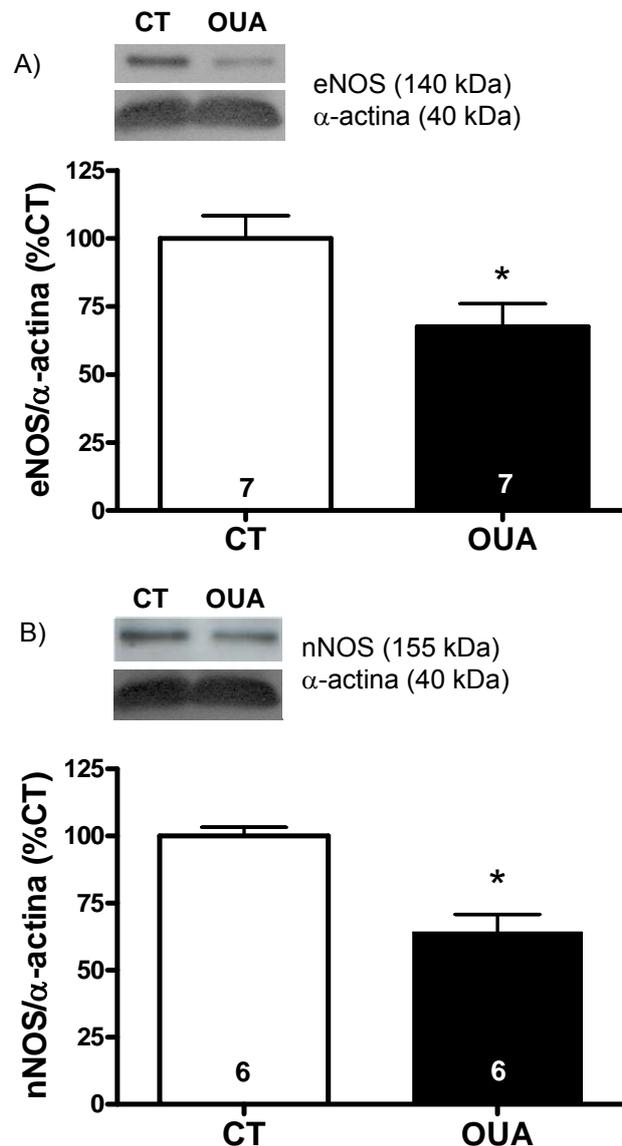


Figura 10. *Western blot* representativo (*superior*) e análise densitométrica (*inferior*) para a expressão proteica da eNOS (A) e da nNOS (B) em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos tratados diariamente com veículo (CT) ou com ouabaína (OUA, 30 μ g/kg, s.c.) por 5 semanas. Resultados (média \pm EPM) representam a razão entre o sinal de cada proteína e o sinal para α -actina da respectiva amostra, expressos em porcentagem do CT. Teste *t*: * $p < 0,05$, vs.CT.

3.2 Efeito do tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS) e nimesulida (NID) associado ao tratamento crônico com ouabaína

3.2.1 Peso Corporal

A Figura 11 apresenta a evolução temporal do peso corporal dos animais dos grupos estudados: CT, OUA, CT-AAS, OUA-AAS, CT-NID e OUA-NID; ao longo da cinco semanas de tratamento. Observa-se nos grupos CT, OUA, CT-AAS e OUA-AAS um progressivo aumento dos valores do peso corporal entre a primeira a quinta semana do período experimental. Adicionalmente, não houve diferença estatisticamente significativa quando esses grupos foram comparados entre si. No grupo CT-NID também ocorreu um progressivo aumento do peso corporal, entretanto, diferentemente do observado nos grupos anteriores, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores mensurados entre a segunda e a quinta semana de tratamento, permanecendo esses praticamente estabilizados. O peso corporal do grupo CT-NID foi estatisticamente semelhante aos valores mensurados nos demais grupos quando comparado o período compreendido entre as cinco semanas de tratamento. O peso corporal do grupo OUA-NID desenvolveu um progressivo aumento a partir da primeira semana de tratamento, mas se estabilizou entre a terceira e a quinta semana de tratamento e foi estatisticamente diferente dos grupos CT e OUA na primeira e na quinta semana de tratamento com ouabaína e nimesulida (5ª semana de tratamento: CT: $225 \pm 2,8$ (N=22) vs. CT-AAS: $230 \pm 3,7$ (N=18) vs. CT-NID: $211 \pm 5,7$ (N=11) vs. OUA: $226 \pm 3,4$ (N=24) vs. OUA-AAS: $229 \pm 3,4$ (N=16) vs. OUA-NID: $207 \pm 5,2^* \S$ (N=10) g; ANOVA (2-vias): * $p < 0,05$ vs. CT; $\S p < 0,05$ vs. OUA).

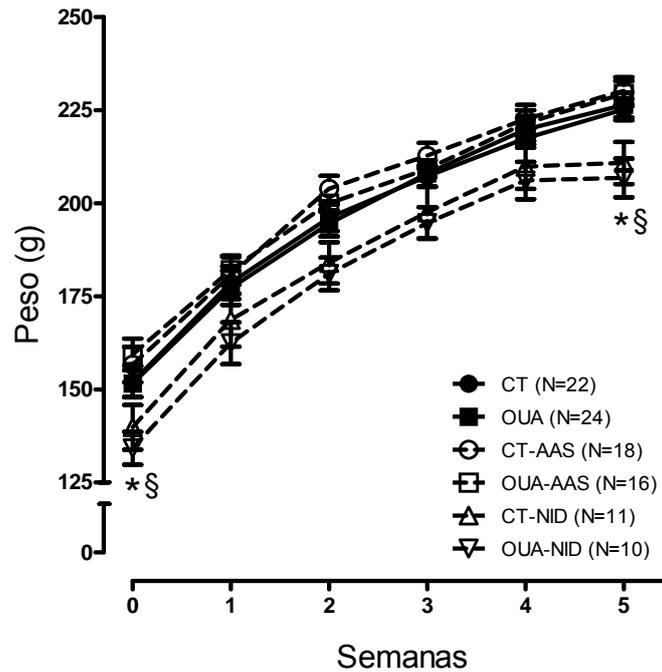


Figura 11. Peso corporal ratos espontaneamente hipertensos tratados diariamente com veículo (CT) e veículo + ácido acetilsalicílico (CT-AAS, 100 mg/kg, gavagem); ouabaína (OUA, 30 μ g/kg, s.c.), ouabaína + ácido acetilsalicílico (OUA-AAS), veículo + nimesulida (CT-NID, 20 mg/kg, gavagem) e ouabaína + nimesulida (OUA-NID) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): * $p < 0,05$ vs. CT; § $p < 0,05$ vs. OUA.

3.2.2 Pressão Arterial

A evolução temporal da PAC ao longo das cinco semanas de tratamento para os grupos CT, CT-AAS, CT-NID, OUA, OUA-AAS e OUA-NID está representada na Figura 12. Como demonstrado, a PAC dos animais do grupo CT apresentou um progressivo aumento a partir da primeira semana de tratamento. Adicionalmente, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores mensurados entre a terceira e quinta semana, permanecendo esses praticamente estabilizados. A PAC dos SHR do grupo CT-AAS seguiu as mesmas características observadas no grupo CT. No entanto, o padrão apresentado no grupo CT-NID foi diferente. Nesses SHR os valores da PAC aumentaram entre a primeira e segunda semana de tratamento e estabilizaram entre a segunda e quinta semana de tratamento (Figura 12). Apesar das diferenças na evolução da pressão arterial entre as semanas de tratamento, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa quando comparada a PAC entre os grupos CT vs. CT-AAS vs. CT-NID, ao longo das cinco semanas de tratamento (5ª semana de tratamento: CT: 171 \pm 1,7

(N=22) vs. CT-AAS: $170 \pm 1,6$ (N=6) vs. CT-NID: $166 \pm 3,6$ (N=11) mmHg; ANOVA (1-via), $p > 0,05$).

Analisando a Figura 12, observa-se que, semelhante ao exposto na Figura 2, a PAC dos animais do grupo OUA aumentou progressivamente a partir da primeira semana, e diferentemente do observado no grupo CT, se estabilizou entre a quarta e quinta semana de tratamento. Além disso, a PAC mensurada nos SHR do grupo OUA foi significativamente maior que a do grupo CT, quando considerado o período entre a segunda e quinta semana de tratamento. A PAC dos animais do grupo OUA-AAS também aumentou a partir da primeira semana, mas os valores pressóricos estabilizaram-se a partir da segunda semana de tratamento e foram menores que os valores encontrados no grupo OUA (Figura 12). Nos SHR do grupo OUA-NID a PAC novamente aumentou a partir da primeira semana de tratamento, no entanto, os valores mensurados, nesse grupo, só se estabilizaram entre a segunda e a terceira e entre a quarta e a quinta semanas de tratamento (Figura 12). Além do mais, os valores mensurados no grupo OUA-NID foram semelhantes aos valores extraídos do grupo OUA-AAS ao longo das cinco semanas de tratamento; e foram menores que os níveis pressóricos do grupo OUA quando considerado o período compreendido entre a quarta e a quinta semana de tratamento (5ª semana de tratamento: OUA: $185 \pm 2,1^*$ (N=24) vs. OUA-AAS: $172 \pm 1,6\%$ (N=5) vs. OUA-NID: $171 \pm 2,4\%$ mmHg; ANOVA (2-vias), $*p < 0,05$ vs. CT; $\%p < 0,05$ vs OUA).

Dessa forma, os tratamentos com AAS e NID previniram o desenvolvimento do aumento nos níveis pressóricos nos animais do grupo OUA e não modificaram os níveis pressóricos dos animais do grupo CT (Figura 12).

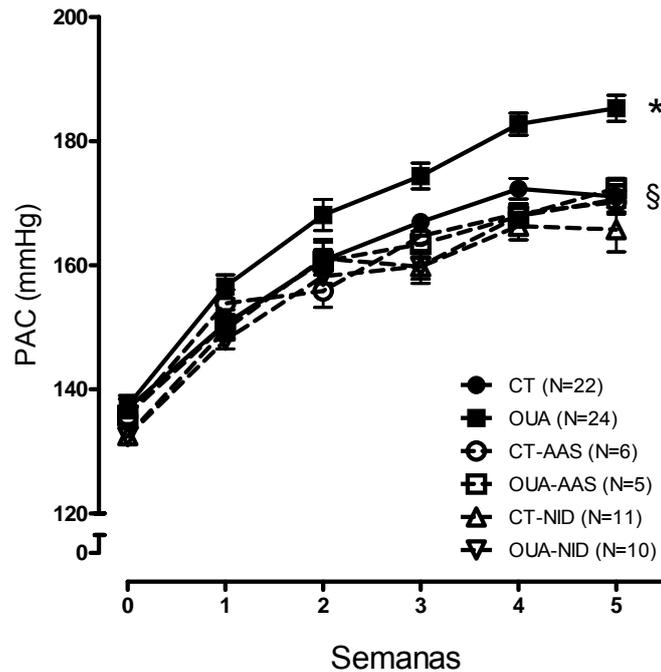


Figura 12. Pressão arterial caudal (PAC) de ratos espontaneamente hipertensos tratados diariamente com veículo (CT), veículo + ácido acetilsalicílico (CT-AAS, 100 mg/kg, gavagem), ouabaína (OUA, 30 μ g/kg, s.c.), ouabaína + ácido acetilsalicílico (OUA-AAS), veículo + nimesulida (CT-NID, 20mg/kg, gavagem), ouabaína + nimesulida (OUA-NID) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): *p<0,05 vs. CT; §p<0,05 vs. OUA.

3.2.3 Reatividade Vascular

3.2.3.1 Diâmetro interno e Tensão ativa

O diâmetro interno quando normalizado a 90% do diâmetro correspondente a pressão transmural de 100 mmHg foi similar nos seis grupos estudados (CT: 255 \pm 3,8 (N=21) vs. OUA: 254 \pm 4,7 (N=24) vs. CT-AAS: 254 \pm 4,7 (N=9) vs. OUA-AAS: 273 \pm 8,5 (N=10) vs. CT-NID: 251 \pm 9,9 (N=11) vs. OUA-NID: 241 \pm 3,9 (N=10) μ m; ANOVA (1-via): p>0,05). O mesmo padrão de resposta foi observado quando avaliada a tensão ativa, induzida por 120 mM de KCl (CT: 2,39 \pm 0,06 (N=21) vs. OUA: 2,46 \pm 0,08 (N=24) vs. CT-AAS: 2,29 \pm 0,09 (N=9) vs. OUA-AAS: 2,35 \pm 0,13 (N=10) vs. CT-NID: 2,23 \pm 0,08 (N=11) vs. OUA-NID: 2,29 \pm 0,07 (N=10) mN/mm; ANOVA (1-via): p>0,05).

3.2.3.2 Avaliação dos relaxamentos dependente e independente do endotélio

Como relatado anteriormente (Figura 3A), o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (ACh, 0,1 η M a 30 μ M), em artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA, apresentou uma resposta bifásica, caracterizada por relaxamento nas concentrações de 0,1 η M a 100 η M, e contração nas concentrações de 0,3 μ M a 30 μ M de acetilcolina. (Figura 13A). De forma semelhante, as artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT-NID e OUA-NID também produziram uma resposta bifásica a acetilcolina (Figura 13A). Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas à acetilcolina provenientes das artérias mesentéricas dos grupos CT vs. OUA vs. CT-NID vs. OUA-NID. Diferentemente, em anéis de artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT-AAS e OUA-AAS, à acetilcolina (ACh, 0,1 η M a 30 μ M) produziu relaxamento de forma dependente da concentração (Figura 13A). Além disso, o tratamento com AAS aboliu, a contração induzida por altas concentrações de acetilcolina, normalizando assim, o relaxamento dependente do endotélio, tanto em artérias do grupo CT-AAS, quanto do grupo OUA-AAS (Figura 13A). Entretanto, não foram observadas diferenças, nem na E_{MAX} (CT-AAS: $90\pm 4,3$ (N=7) vs. OUA-AAS: $92\pm 2,6$ (N=9) %; Teste t , $p>0,05$), nem na pD_2 (CT-AAS: $8,1\pm 0,06$ (N=7) vs. OUA-AAS: $8,2\pm 0,08$ (N=9); Teste t , $p>0,05$) à acetilcolina, quando comparado os anéis de artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT-AAS e OUA-AAS.

Como observado na Figura 13B, o nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 η M a 100 μ M) promoveu relaxamento, independente do endotélio, de forma dependente da concentração nos anéis das artérias mesentéricas de resistência dos animais dos grupos CT, OUA, CT-AAS, OUA-AAS CT-NID e OUA-NID. Semelhante ao observado nas artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA (Figura 3B), o relaxamento ao NPS, não diferiu significativamente, quando comparadas as respostas das artérias provenientes dos grupos CT-AAS vs. OUA-AAS e CT-NID vs. OUA-NID (E_{MAX} : CT-AAS: $93\pm 1,7$ (N=7) vs. OUA-AAS: $93\pm 1,3$ (N=6) e CT-NID: $92\pm 1,3$ (N=10) vs. OUA-NID: $92\pm 1,3$ (N=9) %; e pD_2 : CT-AAS: $7,2\pm 0,26$ (N=7) vs. OUA-AAS: $7,3\pm 0,16$ (N=6) e CT-NID: $7,7\pm 0,18$ (N=10) vs. OUA-NID: $7,6\pm 0,14$ (N=9); ANOVA (1-via), $p>0,05$). Adicionalmente, o relaxamento ao NPS em artérias dos grupos CT-AAS, OUA-AAS, CT-NID e OUA-NID não produziu diferenças

significativas, na E_{MAX} , ou na pD_2 , quando comparado ao relaxamento observado em artérias dos grupos CT e OUA (Figura 13B).

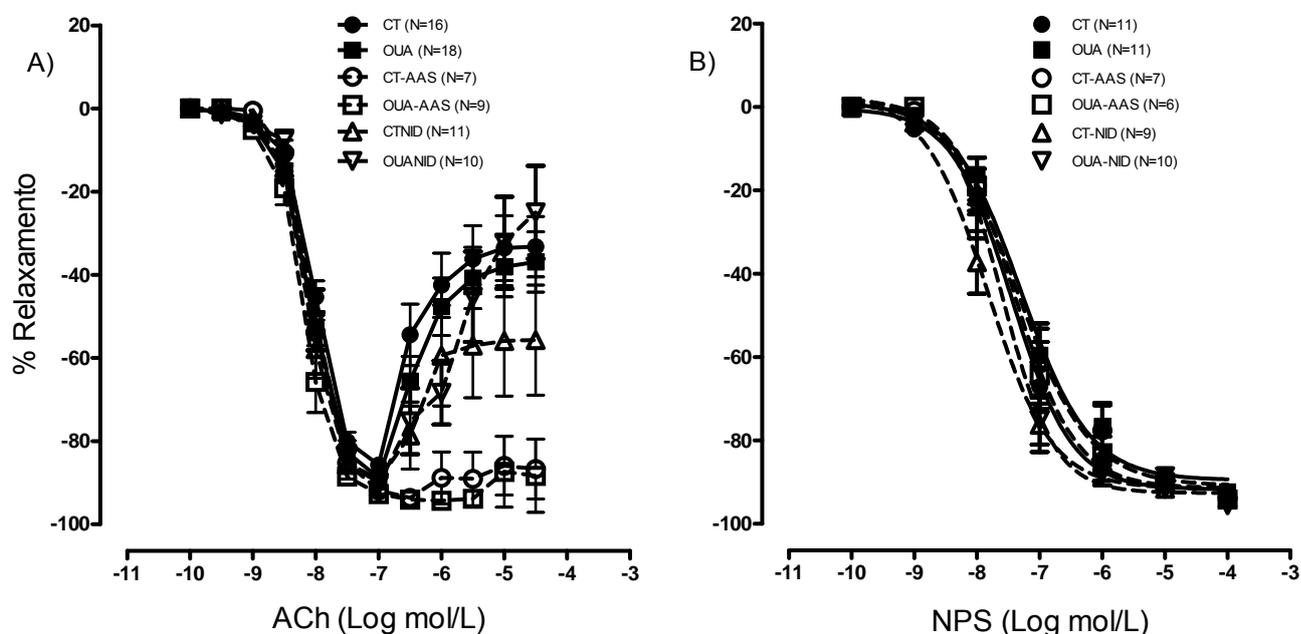


Figura 13. Relaxamento dependente do endotélio à acetilcolina (ACh; 0,1 η M a 30 μ M; **A**) e relaxamento independente do endotélio ao nitroprussiato de sódio (NPS; 0,1 η M a 100 μ M; **B**); em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos que foram tratados diariamente com veículo (CT), ouabaína (OUA, 30 μ g/kg, s.c.), veículo + ácido acetilsalicílico (CT-AAS, 100 mg/kg, gavagem), ouabaína + ácido acetilsalicílico (OUA-AAS), veículo + nimesulida (CT-NID, 20 mg/kg, gavagem) e ouabaína + nimesulida (OUA-NID) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias).

3.2.3.3 Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina

A Figura 14 apresenta a resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas dos grupos CT, OUA, CT-AAS, OUA-AAS, CT-NID e OUA-NID. Observa-se que, a noradrenalina induziu uma resposta contrátil dependente da concentração em artérias dos seis grupos estudados (Figura 14). Semelhante ao encontrado anteriormente (Figura 4), em artérias do grupo OUA, foi observado um aumento da contratilidade à noradrenalina, quando comparada as respostas obtidas nas artérias do grupo CT. E, além disso, ao comparar as respostas das artérias dos grupos CT vs. CT-AAS vs. CT-NID, não foram observadas diferenças significativas na resposta contrátil à noradrenalina. De forma interessante, os tratamentos com

AAS e NID preveniram o aumento da resposta contrátil à noradrenalina, observado em artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA, quando comparado às artérias do grupo OUA-AAS e OUA-NID (Figura 14).

Assim, como pode ser observado nos gráficos da dAUC na Figura 14, tanto a inibição não seletiva da COX-1/2 quando a inibição seletiva da COX-2 previne o aumento da resposta contrátil à noradrenalina nas artérias mesentéricas de resistência, induzido pelo tratamento durante cinco semanas com OUA.

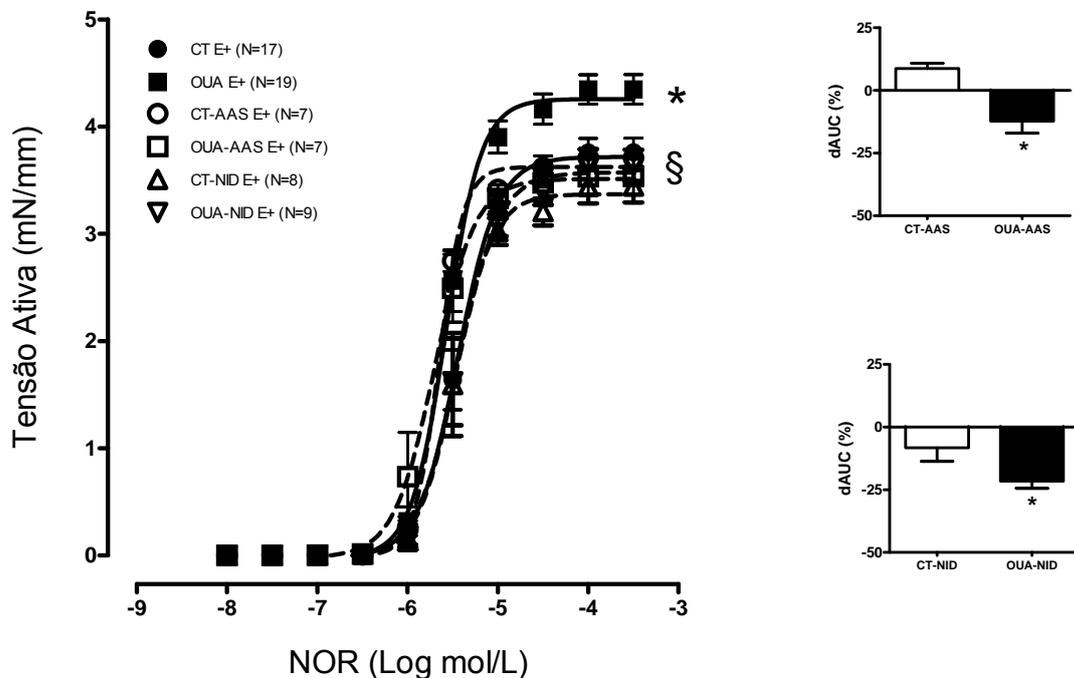


Figura 14. Curva de concentração-resposta à noradrenalina (NOR, $10\eta\text{M}$ a $30\mu\text{M}$) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos com endotélio íntegro (E+) que foram tratados diariamente com veículo (CT), ouabaína (OUA; $30\mu\text{g/kg}$, s.c.), veículo + ácido acetilsalicílico (CT-AAS, 100 mg/kg , gavagem) e ouabaína + ácido acetilsalicílico (OUA-AAS), veículo + nimesulida (CT-NID, 20 mg/kg , gavagem) e ouabaína + nimesulida (OUA-NID) por 5 semanas. Resultados expressos como média \pm EPM para o número (N) de animais utilizados. ANOVA (2-vias): * $p < 0,05$ vs. CT e § $p < 0,05$ vs. OUA. Gráficos inseridos apresentam as diferenças na área sob a curva (dAUC) à noradrenalina em artérias dos grupos CT-AAS e OUA-AAS (superior) e CT-NID e OUA-NID (inferior). Valores da dAUC (média \pm EPM) são expressos como porcentagem da diferença da correspondente AUC de segmentos na condição controle (Teste *t*, * $p < 0,05$ vs. CT-AAS ou CT-NID).

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito do tratamento crônico com ouabaína

O presente estudo reforçou os resultados previamente publicados por Xavier et al. (2009) demonstrando que o tratamento de SHR com ouabaína, por cinco semanas, promove um incremento na pressão arterial desses animais. Adicionalmente, demonstrou-se pela primeira vez, um aumento da resposta contrátil das artérias mesentéricas de resistência à noradrenalina, possivelmente, via redução da modulação vasodilatadora do óxido nítrico e de canais para potássio, em parte pela diminuição da síntese de óxido nítrico; e por um aumento da vasoconstrição mediada pelo TXA₂, derivado da COX-1, mas principalmente da COX-2, via receptor TP.

Estudos anteriores evidenciaram que a ouabaína administrada cronicamente induz hipertensão arterial em ratos normotensos (Briones et al., 2006; Cargnelli et al., 2000; Kimura et al., 2000; Manunta et al., 1994, 2000; Pulgar et al., 2013; Pulina et al., 2010; Rossoni et al., 2002a,b, 2006; Wenceslau et al., 2011; Xavier et al., 2004a,b,c; Yuan et al., 1993; Zhang et al., 2009). No presente estudo, o aumento dos níveis pressóricos nos animais do grupo OUA, quando comparados ao CT, corrobora os estudos anteriores, os quais, inicialmente, confirmaram que na presença de concentrações micro ou nanomolares de ouabaína, SHR entre outros modelos de hipertensão arterial, são mais sensíveis aos efeitos pressóricos da administração aguda da ouabaína, quando comparados a animais normotensos (Padilha et al., 2004; Rossoni et al., 2001, 2003; Vassallo et al., 1997). Nesse sentido, Xavier et al. (2009) foram os primeiros a demonstrar um aumento nas pressões arteriais sistólica e diastólica de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, quando comparadas as pressões arteriais de SHR tratados com veículo. Assim, no presente estudo, o adicional aumento na pressão arterial caudal dos animais do grupo OUA, reproduziu os resultados obtidos previamente por Xavier et al. (2009) e, reafirmou que o tratamento crônico com ouabaína exarceba os níveis pressóricos de SHR.

Ao contrário do trabalho de Xavier et al. (2009), que utilizaram *pellets* de liberação controlada de aproximadamente 8,0 µg/dia de ouabaína, a dose diária desse digitálico utilizada no presente estudo foi escolhida de acordo com o estudo de Manunta et al. (1994). Esses autores observaram que o tratamento de ratos

Sprague-Dawley, por cinco semanas, com 30 µg/kg/dia elevava a concentração plasmática de ouabaína para aproximadamente 5 ηM. E, essa concentração é similar aos valores encontrados em alguns pacientes com insuficiência cardíaca, hipertensão arterial e em pacientes com tumores adrenocorticais (Gonick et al., 1998; Gottlieb et al., 1992; Hamlyn, Manunta, 1992; Manunta et al., 1992, 2008, 2010; Rossi et al., 1995; Tripodi et al., 2009).

A hipertensão arterial induzida pela ouabaína envolve mecanismos centrais e periféricos. Dentre os mecanismos centrais, sabe-se que a ouabaína administrada periférica ou centralmente, pode agir no sistema nervoso central e promover o aumento do tônus simpático. Essa ação central da ouabaína parece ser importante para o aumento da pressão arterial, uma vez que, o bloqueio ganglionar e a administração de fragmentos de anticorpos anti-ouabaína impedem o desenvolvimento da hipertensão arterial nesse modelo (Huang et al., 1994). Posteriormente, foi demonstrado que os efeitos centrais da ouabaína dependiam da ativação do sistema renina-angiotensina (Huang, Leenen, 1999). E, em seguida, foi comprovada também, uma participação do sistema da endotelina central. Agindo centralmente, esse digitálico aumentava síntese/liberação desse peptídeo, o qual contribuí para os efeitos periféricos da ouabaína (Di Filippo et al., 2003). Quanto aos mecanismos periféricos, é sabido que no coração, o tratamento crônico com ouabaína promove efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos, e aumento da expressão protéica das subunidades α_1 e α_2 da Na^+K^+ -ATPase (Rossoni et al., 2006).

Ainda periféricamente, sabe-se que a hipertensão arterial induzida pela ouabaína também pode modificar a função e/ou a estrutura de vasos de condutância e de resistência. Nesse sentido, estudos evidenciaram alterações na reatividade vascular a agonistas adrenérgicos, na dependência do leito estudado (Cargnelli et al., 2000; Kimura et al., 2000; Rossoni et al., 2002a,b; Dostanic et al., 2005; Padilha et al., 2008; Pulgar et al., 2013; Wenceslau et al., 2011; Xavier et al., 2004a,b,c, 2009; Zhang et al., 2009;). Quanto à estrutura vascular, Briones et al. (2006) demonstraram que a hipertensão arterial induzida pela ouabaína não modifica a espessura da parede de artérias mesentéricas de resistência de terceira ordem, ocorre um remodelamento hipotrófico para dentro com redução do número de células musculares lisas e aumento na deposição de colágeno, que reduz a distensibilidade do vaso. Ao contrário, Zhang et al. (2009) observaram no mesmo

modelo, que em artérias mesentéricas de resistência de quarta ordem, com aproximadamente 160 μm de diâmetro interno, não há diferenças no diâmetro e na espessura, quando comparada às artérias provenientes dos animais controles. Sugeriram que a maior vasoconstrição, observada nesses ramos em resposta aos níveis circulantes de ouabaína, estariam contribuindo para o aumento do tônus vascular e da pressão arterial nos animais tratados com esse digitalico.

Assim, sabendo que os animais hipertensos são mais sensíveis aos efeitos da ouabaína administrada agudamente em concentrações nanomolares (Moreland et al., 1986; Ponte et al., 1996; Rossoni et al., 2001; 2003; Songu-Mize et al., 1995; Vassallo et al., 1997) e que o tratamento crônico com ouabaína induz importantes alterações vasculares; no presente estudo, buscou-se investigar por qual(is) mecanismo(s) esse tratamento modificaria a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de SHR, e se as alterações nesses vasos estariam contribuindo para a manutenção dos níveis elevados da pressão arterial.

Em concordância com estudos anteriores, o presente estudo demonstrou em artérias mesentéricas de resistência de SHR dos grupos CT e OUA, que o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina; o relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio; e a resposta contrátil induzida pelo KCl; não foram modificados pelo tratamento com ouabaína (Padilha et al., 2008; Rossoni et al., 2002a; Xavier et al., 2004b,c, 2009; Wenceslau et al., 2011). No entanto, as curvas de relaxamento à acetilcolina, nas artérias mesentéricas de resistência provenientes dos SHR tratados com veículo ou ouabaína, apresentaram uma resposta bifásica, ou seja, um relaxamento, seguido por uma contração, como bem caracterizado em aorta (Lüscher, Vanhoutte, 1986) e em artérias mesentéricas de resistência (Lüscher et al., 1990) de SHR. Em aorta, sabe-se que essas contrações dependentes do endotélio induzidas pela acetilcolina envolvem, principalmente, a ação da prostaciclina (PGI_2) e da PGH_2 , liberadas pelo endotélio, agindo no receptor TP do músculo liso vascular (Gluais et al., 2005).

O presente estudo também demonstrou que as artérias mesentéricas de resistência dos animais do grupo OUA apresentaram maior resposta contrátil à noradrenalina, quando comparadas as artérias provenientes do grupo CT. Estudos anteriores comprovaram que os efeitos do tratamento crônico com ouabaína, em ratos *Wistar*, sobre a reatividade vascular é dependente do leito e do diâmetro do segmento estudado. Na aorta e na artéria mesentérica superior foi observado uma

redução da resposta máxima induzida pela fenilefrina (Cargnelli et al., 2000; Rossoni et al., 2002a), enquanto que, nenhuma modificação foi relatada na artéria caudal (Rossoni et al., 2002a) e na mesentérica de resistência (Briones et al., 2006; Padilha et al., 2008; Xavier et al., 2004b,c). Em oposição, Zhang et al. (2009) observou, no mesmo modelo, que artérias mesentéricas de resistência de quarta ordem apresentavam aumento da resposta máxima à fenilefrina. Por sua vez, Kimura et al., (2000) também observaram, em artérias renais de ratos tratados com ouabaína, um aumento da resposta máxima induzida pelo KCl e pela fenilefrina. Recentemente, Xavier et al., (2009) observaram em anéis de artéria caudal de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, um aumento da sensibilidade à fenilefrina. E, Wenceslau et al., (2011) observaram que artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* tratados por vinte semanas com ouabaína, também apresentaram um aumento da sensibilidade à noradrenalina.

Dessa forma, os efeitos do tratamento crônico com ouabaína, além de dependerem do leito e do diâmetro do segmento em estudo, parecem depender também do tempo de tratamento com ouabaína, e da linhagem utilizada. Além disso, como foi sugerido em estudos anteriores (Wenceslau et al., 2011; Zhang et al., 2009), o aumento da resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de animais do grupo OUA, indica que esses vasos estão contribuindo para o aumento e/ou manutenção dos níveis pressóricos nesses animais.

O endotélio íntegro reduz as respostas vasoconstritoras à agonistas adrenérgicos, principalmente via liberação de óxido nítrico (Boric et al., 1999; El-Mas et al., 1997; Martin et al., 1986). Assim, sabendo da importância do endotélio na modulação dos efeitos crônicos da ouabaína sobre a reatividade vascular (Aras-Lopes et al., 2008; Padilha et al., 2008; Rossoni et al., 2002b; Xavier et al., 2004b,c, 2009; Wenceslau et al., 2011) e que esse mesmo endotélio na presença da administração aguda de concentrações nano, micro ou milimolares de ouabaína, pode liberar fatores com o objetivo de se contrapor às contrações induzidas por esse digitalico ou por agonistas vasoconstritores (Eva et al., 2006; Pacheco et al., 2000; Padilha et al., 2004; Ponte et al., 1996; Rossoni et al., 1999; 2003; Rodríguez-Mañas et al., 1992; Sánchez-Ferrer et al., 1992); procurou-se investigar se o aumento da resposta contrátil à noradrenalina, encontrado no presente estudo, poderia ser resultante das modificações na modulação dos fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio e liberados em resposta à estimulação adrenérgica.

A hipertensão arterial pode estar associada a uma disfunção endotelial com prejuízo na produção e/ou biodisponibilidade do óxido nítrico (Koller, Huang, 1994; Li et al., 2007; Mokuno et al., 2001; Sunano et al., 1999; Viridis et al., 2009). E sabe-se que a ouabaína pode modular a resposta contrátil a agonistas adrenérgicos via liberação de óxido nítrico (Rossoni et al., 2002b; 2003; Xavier et al., 2004b,c). Nesse sentido, os presentes resultados sugerem que a maior resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de SHR tratados com ouabaína, seja causada, em parte, por uma redução da modulação do óxido nítrico, pois quando os anéis foram pré-incubados com L-NAME, essa modulação foi menor no grupo OUA. A menor modulação do óxido nítrico está associada com uma redução na sua produção e/ou biodisponibilidade (Cai, Harrison, 2000). Parece que, no presente estudo, a menor modulação do óxido nítrico está associada a uma redução na sua produção, uma vez que a expressão proteica das isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) da sintase de óxido nítrico estavam reduzidas. Em oposição, Rossoni et al. (2002b) demonstraram em aorta de ratos *Wistar* tratados cronicamente com ouabaína, que a redução da resposta contrátil à fenilefrina estava associada a uma maior modulação do óxido nítrico, já que após o pré-tratamento com L-NAME a magnitude de aumento da resposta contrátil à fenilefrina foi maior nas aortas dos animais ouabaína. Esse aumento na modulação do óxido nítrico foi proveniente de uma maior produção, relacionada à maior expressão proteica da nNOS e da eNOS. O mesmo padrão de resposta, após o pré-tratamento com L-NAME, foi observado por Xavier et al. (2004b), em artérias mesentéricas superiores e em artérias mesentéricas de resistência, do mesmo modelo experimental e por Padilha et al. (2008) em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* submetidos a 15 dias de tratamento com ouabaína. No entanto, nesses dois últimos estudos, a maior modulação do óxido nítrico não foi decorrente de uma modificação da sua produção, uma vez que nessas artérias, não ocorreu alteração na expressão proteica da eNOS.

Por outro lado, concordante com os presentes resultados, em artérias caudais de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, também foi evidenciada uma redução da modulação do óxido nítrico; porém, esse efeito estaria associado a um prejuízo na sua biodisponibilidade, já que, a não modificação na expressão proteica da eNOS foi um indicativo de que sua produção não estaria alterada (Xavier et al., 2009). Além disso, Wenceslau et al. (2011) estudando artérias mesentéricas

de resistência de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por vinte semanas, também observaram menor participação da modulação do óxido nítrico, quando comparado as artérias dos controles. E, como a expressão protéica da eNOS não foi modificada, os autores sugeriram que esse efeito era decorrente de uma maior degradação do óxido nítrico por espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS).

Estudos sugerem que a redução da modulação do óxido nítrico também pode ocorrer por aumento da sua degradação via ROS (Harrison, 1997; Touyz, 2004). Além disso, existem evidências de que a ouabaína promove a formação de ROS. Por exemplo, Xie et al. (1999) observaram que a ouabaína promove a liberação de ROS em miócitos cardíacos; e Kajikawa et al. (2002) demonstraram que esse digitálico induz a formação de ROS mitocondrial em ilhotas pancreáticas de ratos. No entanto, no presente trabalho parece que as ROS não participaram da modulação da resposta contrátil induzida pela noradrenalina, uma vez que, o pré-tratamento com SOD não modificou essa resposta nas artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT e OUA. Nesse sentido, Hernanz et al. (2008) observaram, estudando artérias cerebrais de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por cinco semanas, uma redução na produção de superóxido, associada a uma não modificação da expressão protéica das SODs. Em oposição, Wenceslau et al. (2011) comprovaram em artérias mesentéricas de resistência, de ratos *Wistar*, que o pré-tratamento com SOD reduzia a resposta contrátil à noradrenalina, apenas em artérias provenientes do grupo tratado com ouabaína por vinte semanas. Além disso, o tratamento com SOD e catalase reduz a resposta contrátil à noradrenalina em artérias provenientes do grupo OUA, de forma semelhante ao pré-tratamento somente com a SOD. Esse último efeito do estudo de Wenceslau et al. (2011), também, é oposto ao obtido no presente estudo, pois a pré-incubação com catalase ou SOD e catalase reduziram, com a mesma magnitude, a resposta contrátil à noradrenalina em artérias dos grupos CT e OUA. Assim, pode-se descartar, no presente estudo, a participação da modulação das ROS sobre a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de SHR tratados durante cinco semanas com ouabaína.

A hipertensão arterial cursa não apenas com um prejuízo na modulação do óxido nítrico, mas também, com modificações na participação do EDHF (Fujii et al., 1992; Goto et al., 2004; Li et al., 2007; Michel et al., 2008; Mori et al., 2006; Sunano et al., 1999). Além disso, Rossoni et al. (1999) demonstraram que em leito

caudal isolado que, na presença de ouabaína em concentração nanomolar, o endotélio vascular promove a liberação de um fator endotelial ativador de canal para potássio. No presente estudo, a menor modulação do TEA sobre a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência dos animais do grupo OUA, sugere que nesses animais existe uma menor participação do EDHF. Em oposição, Rossoni et al. (2002b) sugeriram que a redução da resposta contrátil a fenilefrina em aortas de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por cinco semanas, estava associada a um aumento da liberação de um EDHF que ativaria canais para K^+ ativados por Ca^{2+} . Por outro lado, Xavier et al. (2004b) demonstraram que a ausência de modificação na resposta contrátil induzida pela noradrenalina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por cinco semanas, estava associada a um prejuízo na liberação de um EDHF associado ao aumento da modulação pelo óxido nítrico. Xavier et al. (2009) também observaram em artérias caudais de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, uma menor influência do EDHF modulando a resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Por sua vez, Briones et al. (2009) verificaram, em artérias coronárias de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por cinco semanas, um aumento da modulação do EDHF, que contribuía para preservar a função endotelial dessas artérias. Assim, parece que os efeitos do tratamento crônico com ouabaína sobre o EDHF são dependentes do leito estudado. Quanto menor o diâmetro do vaso e maior a participação do EDHF, conseqüentemente, maiores serão os efeitos do tratamento crônico com ouabaína sobre esse fator vasodilatador.

A participação de prostanoídes derivados da COX sobre a modulação endotelial da resposta contrátil a agonistas adrenérgicos tem sido amplamente demonstrada em modelos experimentais de hipertensão arterial (Adeagbo et al., 2005; Alvarez et al., 2005; Carvalho et al., 1997; Cordellini et al., 1990; dos Santos et al., 2003; Fortes et al., 1990, 1992; Tabenero et al., 1999). Por outro lado, foi demonstrado por Nakagawa et al. (1987) que células endoteliais aumentavam a produção de um subproduto da COX (prostaciclina) em resposta a incubação das mesmas, com concentrações micromolares de ouabaína. Assim, no presente estudo, como a indometacina e os inibidores da COX-1 e da COX-2, reduziram a resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA, acredita-se que nessas artérias exista uma maior atividade e/ou expressão proteica das isoformas 1 e 2 da COX. Nesse sentido, Padilha et al. (2008) demonstraram, em

artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* nas fases iniciais da hipertensão arterial induzida pelo tratamento com ouabaína por cinco semanas, um aumento da participação de prostanóides derivados da COX-2, na modulação da resposta contrátil à noradrenalina. Por sua vez, Xavier et al. (2009) observaram em artérias caudais de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, que o aumento da sensibilidade à fenilefrina estava relacionado a uma maior expressão proteica da COX-2. E, mais recentemente, corroborando esses dados, Wenceslau et al. (2011) demonstraram, em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por vinte semanas, que o aumento da sensibilidade à noradrenalina também era modulado por um subproduto da COX-2, uma vez que a expressão proteica dessa isoforma da COX estava aumentada e o NS-398 reduzia a exarcebada contração induzida pela noradrenalina.

Sabe-se que a hipertensão arterial modifica a participação de prostanóides derivados da COX nas respostas vasodilatadoras e vasoconstritoras (dos Santos et al., 2003; Gluais et al., 2005; Lüscher et al., 1990; Lüscher, Vanhoutte, 1986; Tang, Vanhoutte, 2008; Xavier et al., 2008). Dessa forma, como no presente estudo, o ridogrel e o furagrelato reduziram de forma semelhante, à resposta contrátil induzida pela noradrenalina, sugere-se que o TXA₂ seja o subproduto da COX-1 e da COX-2, que modula em artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA, o aumento da resposta contrátil induzida pela noradrenalina. Nesse sentido, Xavier et al. (2009) observaram uma maior produção de TXA₂, via ativação da COX-2, em artérias caudais de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas. E, Wenceslau et al. (2011) demonstraram que o aumento da sensibilidade à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por vinte semanas, estava relacionado a uma maior produção de TXA₂/PGH₂, também, derivado da COX-2.

É bem demonstrado que parte da disfunção endotelial observada na hipertensão arterial é decorrente do aumento dos produtos derivados da COX1/2, que comumente agem via receptor TP no músculo liso vascular (Félétou et al., 2010; Gelosa et al., 2010; Gluais et al., 2005; Tang et al., 2008). No entanto, até o presente estudo, não era conhecido o papel desempenhado pelo receptor TP nas alterações da reatividade vascular após o tratamento crônico com ouabaína. Assim, no presente estudo, a redução da resposta contrátil a noradrenalina somente nas artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA, após o pré-tratamento com o SQ

29,548 confirma que o TXA_2 , produzido a partir da COX1/2 está agindo via receptor TP.

Os resultados obtidos no presente estudo, ou seja, o aumento da resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas contrasta com a não modificação da resposta contrátil à noradrenalina observada em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar*, também tratados por cinco semanas com esse digitálico (Xavier et al., 2004b). E por outro lado, foram semelhantes aos resultados obtidos por Xavier et al. (2009) em artérias caudais de SHR tratados com ouabaína por cinco semanas; e por Wenceslau et al. (2011), em artérias mesentéricas de resistência de ratos *Wistar* tratados com ouabaína por vinte semanas, os quais demonstraram, nas artérias estudadas, um aumento da sensibilidade a agonistas adrenérgicos. Em conjunto, esses resultados podem sugerir que a existência prévia de alterações vasculares ou o tempo mais longo de tratamento facilita o estabelecimento dos prejuízos decorrentes do aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína.

Resumindo os presentes resultados sugerem que o tratamento de SHR por cinco semanas com ouabaína, resulta em alterações funcionais nas artérias mesentéricas de resistência. E dessa forma, o aumento da resposta contrátil à noradrenalina, é decorrente da redução da modulação nitrérgica, em parte pela redução da síntese de óxido nítrico e da participação de canais para potássio na hiperpolarização das células musculares; e por um aumento da vasoconstrição mediada pelo TXA_2 , derivado da COX-1 e da COX-2, via receptor TP. Essas alterações sustentam a hipótese de que esses vasos estão contribuindo para o aumento e/ou manutenção dos níveis pressóricos nesses animais.

4.2 Efeito do tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS) e nimesulida associado ao tratamento crônico com ouabaína

Confirmando a hipótese de que o aumento dos níveis pressóricos estavam associados aos produtos da COX1/2 em SHR tratados com ouabaína, o presente estudo demonstrou, também, que o co-tratamento com AAS, um inibidor não seletivo da COX1/2 e o co-tratamento com nimesulida, um inibidor seletivo da COX-2, impediram o incremento nos níveis pressóricos dos SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, prevenindo assim, o efeito anteriormente demonstrado

por Xavier et al. (2009) e reproduzido no presente estudo. Além disso, demonstrou-se de forma inédita que o tratamento com ouabaína associado ao tratamento com AAS, ou associado ao tratamento com nimesulida, impediram o aumento da resposta contrátil à noradrenalina nas artérias mesentéricas de resistência dos animais do grupo OUA, comprovando que, os efeitos do tratamento crônico com ouabaína são decorrentes uma maior participação de produtos derivados da COX-2.

Os estudos anteriores não são elucidativos quanto aos efeitos do AAS e da nimesulida sobre a pressão arterial de animais com hipertensão arterial. No presente trabalho, o tratamento com AAS ou nimesulida não modificaram a pressão arterial caudal dos animais do grupo CT. Tuttle et al. (1985) demonstraram que o tratamento de SHR jovens (28 a 84 dias de idade) com AAS na dose de 100 mg/kg/dia, durante 56 dias, promoveu redução da pressão arterial sistólica. Quinley et al. (1987) observaram que o tratamento com AAS (200 mg/kg/dia) não produziu qualquer mudança na pressão arterial de SHR, quando comparado a normotensos também tratados. Schirner e Taube (1993) comprovaram que o efeito do tratamento com AAS, na dose de 100 mg/kg/dia, dependia da pressão do SHR no início do tratamento. Assim, nos animais que apresentavam pressão arterial abaixo de 160 mmHg, o tratamento com AAS produzia aumento, enquanto que, nos animais com pressão acima de 160 mmHg, o mesmo tratamento promovia redução dos níveis pressóricos.

Na literatura existem resultados conflitantes sobre os efeitos dos inibidores da COX-2 sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos. Höcherl et al. (2002) demonstraram que rofecoxib, um antiinflamatório não esteroide, aumenta a pressão arterial de ratos normotensos. E Jain et al. (2005), com esse mesmo antiinflamatório, e Muscará et al. (2000) com o celecoxib, observaram um aumento na pressão arterial de ratos hipertensos tratados com L-NAME. Em oposição, Wu et al. (2005) verificaram que o rofecoxib e a nimesulida diminuem a pressão arterial no modelo de hipertensão induzida pela angiotensina II. O inibidor específico da COX-2, NS-398, diminui a pressão arterial de ratos hipertensos 1-Rim 1-Clip e 2-Rins 1-Clip e não modifica a pressão arterial do modelo DOCA-sal (Okumura et al., 2002). Diferentemente, o inibidor celecoxib, não modifica a pressão arterial de ratos com hipertensão renovascular (Richter et al., 2004). A nimesulida, inibidor seletivo da COX-2 não esteroide, escolhido para o presente

estudo, não modifica a pressão arterial de ratos normotensos e SHR, como demonstrado no trabalho de Al Suleimani et al. (2010).

Os efeitos do tratamento com AAS e nimesulida, sobre a hipertensão arterial induzida pela ouabaína em SHR nunca haviam sido estudados. No presente trabalho, o co-tratamento com AAS, inibidor não seletivo da COX1/2, e o co-tratamento com nimesulida, inibidor seletivo da COX-2, preveniram o incremento nos níveis pressóricos dos SHR tratados com ouabaína por cinco semanas, sugerindo assim a importância dessa via para a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial induzida pela ouabaína. Assim, sabendo da importância das artérias de resistência para o controle da pressão arterial, os resultados do presente estudo, somados aos resultados dos estudos de Padilha et al. (2008), Xavier et al. (2009) e Wenceslau et al. (2011) sugerem que os inibidores da COX, especificamente da COX-2, possam melhorar também, os danos vasculares decorrentes do aumento das concentrações plasmáticas de ouabaína.

Como relatado anteriormente, o tratamento com ouabaína não modifica tensão ativa desenvolvida pelo KCl (Padilha et al., 2008; Rossoni et al., 2002a,b; Xavier et al., 2004b,c, 2009; Wenceslau et al., 2011), nem o relaxamento ao nitroprussiato de sódio (Xavier et al., 2004a). Em concordância com essa literatura, o tratamento com ouabaína concomitante ao tratamento com AAS, ou com nimesulida, não modificou em artérias mesentéricas de resistência de SHR dos grupos CT, OUA, CT-AAS, OUA-AAS, CT-NID, OUA-NID nem a resposta contrátil induzida pelo KCl, nem o relaxamento independente do endotélio ao nitroprussiato de sódio.

Apesar do tratamento crônico com ouabaína não evidenciar diferenças no relaxamento à acetilcolina (Padilha et al., 2008; Rossoni et al., 2002a; Xavier et al., 2004b,c, 2009; Wenceslau et al., 2011), o papel dos subprodutos da via da COX modulando essa resposta vasodilatadora, em artérias mesentéricas de resistência de SHR, já haviam sido anteriormente descritos (Lüscher et al., 1990). Nesse sentido, Wu et al. (2002) também demonstraram uma melhora do relaxamento à acetilcolina em aorta de SHR após o tratamento com AAS por 12 dias. Dessa forma, no presente estudo, a inibição das contrações dependentes do endotélio à acetilcolina, nos grupos CT-AAS e OUA-AAS, corroboram a teoria de que as alterações funcionais em artérias mesentéricas de resistência, tanto do grupo CT-AAS, quanto do grupo OUA-AAS, são condizentes com uma maior participação de

produtos derivados da COX (Fortes et al., 1990; Gluais et al., 2005; Lüscher et al., 1990; Lüscher, Vanhoutte, 1986; Tang, Vanhoutte, 2008).

Por outro lado, os efeitos dos subprodutos da COX-2 sobre a modulação da resposta vasodilatadora à acetilcolina em artérias de ratos hipertensos foram previamente estudados. Widlansky et al. (2003) observaram que o tratamento com celecoxib, melhora a função endotelial de pacientes hipertensos. Diferentemente, Bulut et al. (2003) verificaram que o tratamento com parecoxib, um inibidor da COX-2, diminuiu o relaxamento à acetilcolina, enquanto que o tratamento com acetilsalicilato de lisina, um inibidor não seletivo da COX, aumenta o relaxamento à acetilcolina em pacientes hipertensos. A respeito do efeito da COX-2 sobre as contrações dependentes do endotélio à acetilcolina, Tang et al. (2005) demonstraram que estas contrações estão presentes no camundongo com deleção para o gene da COX-2 evidenciando que elas são dependentes exclusivamente da COX-1. Assim, o resultado do presente estudo, no qual o tratamento com nimesulida não aboliu a contrações dependentes do endotélio à acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência dos grupos CT-NID e OUA-NID, diferentemente do efeito observado com o co-tratamento com AAS, reforça a teoria de que estas contrações são provenientes da ativação da COX-1.

Como relatado anteriormente, é bem demonstrado que o tratamento crônico com ouabaina promove modificações na reatividade vascular de acordo com o leito vascular e a espécie estudada (Cargnelli et al., 2000; Kimura et al., 2000; Padilha et al., 2008; Rossoni et al., 2002a,b; Xavier et al., 2004a,b,c, 2009; Wenceslau et al., 2011; Zhang et al., 2009). Assim, no presente estudo, a prevenção do aumento da resposta contrátil à noradrenalina, em artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA-AAS e OUA-NID, sugere que parte dos efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular é decorrente da modulação por prostanoídes vasoconstritores derivados da COX-1 e da COX-2. Este resultado é reforçado pelos dados previamente descritos na presente tese, em artérias mesentéricas de resistência do grupo OUA, onde a incubação com o SC-560 e o com NS-398 reduziram a resposta contrátil à noradrenalina. No entanto, como o co-tratamento com nimesulida reverteu o aumento da resposta contrátil a noradrenalina de forma semelhante ao tratamento com AAS, pode-se concluir que a COX-2 é a isoforma que efetivamente participa desses efeitos.

Sumarizando, a redução da pressão arterial e a redução da resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de animais dos grupos OUA-AAS e OUA-NID quando comparado ao OUA, comprova a participação de produtos derivados da COX-2, nos efeitos vasculares decorrentes do tratamento com ouabaína por cinco semanas. Esse estudo abre a possibilidade do tratamento com inibidores da COX-2 para corrigir o prejuízo na função vascular decorrente do aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína em modelos de hipertensão arterial.

5 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dostanic I, Paul RJ, Lorenz JN, Theriault S, Van Huysse JW, Lingrel JB. The alpha2-isoform of Na⁺K⁺-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(2):H477-85.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mulvany MJ, Hansen OK, Aalkjaer C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen a thickened media and an increased number of smooth muscle cell layers. *Circ Res.* 1978;43:854-64.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Overbeck HW. Effect of ouabain on arteriolar responses to norepinephrine in chronic benign volume-expanded hypertension. *Hypertension.* 1984;6(Suppl 1):182-7.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Schirner M, Taube C. Different effects of aspirin on blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) with high and spontaneously low levels of blood pressure. *Br J Pharmacol.* 1993;109(4):900-1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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