

Efeitos do tratamento crônico com ouabaína por 15 dias sobre a contratilidade cardíaca de ratos

Eduardo Frizzera Meira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2009

Meira, Eduardo Frizzera, 1981

Efeitos do Tratamento Crônico com Ouabaína por 15 dias sobre a contratilidade cardíaca de ratos. [Vitória] 2009

91 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2009)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Ouabaína 2. Hipertensão 3. Músculo papilar 4. Ratos

Efeitos do tratamento crônico com ouabaina por 15 dias sobre a contratilidade cardíaca de ratos

Eduardo Frizzera Meira

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

Aprovada em _____, por:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES.

Prof^a. Dr^a. Flávia Imbroisi Valle Errera – EMESCAM.

Prof^a. Dr^a Alessandra Simão Padilha – Co-orientadora, UFES.

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – PPGCF, UFES.

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg- PPGCF, UFES

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2009

“Tudo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13

Dedico esse trabalho a Fabiana, minha
grande companheira

Agradecimentos

A Deus, nosso pai, e a seu filho Jesus, por sempre guiar nos caminhos corretos e estar presente nos momentos em que mais precisamos.

Aos meus avós, Vanda e Riva (*in memoriam*), por toda a educação e ensinamentos com os quais me criaram.

Aos meus pais pelo incentivo ao estudo e por nunca permitir que eu desistisse dos meus sonhos e ao meu irmão Guilherme por todo o apoio.

Ao meu orientador Dalton Valentim Vassallo, pelos conselhos, orientações e ensinamentos que foram muito importantes nessa caminhada de estudos, muito obrigado por pelas oportunidades, valeu chefe.

À minha amiga e co-orientadora Alessandra, pela orientação, incentivo para realização desse trabalho. Obrigado por sempre ter paciência para ouvir os meus desesperos quando nada dava certo.

À Fabiana, por todo amor, compreensão e incentivo. Você sempre foi e será muito importante na minha vida. Muito obrigado por nunca deixar que eu desistisse. A você te dou o meu amor para toda vida.

À Ivanita, nossa “chefe”, muito obrigado pelo acolhimento no LEMC e por todos os ensinamentos

A todos os amigos do LEMC, Rogério, obrigado pelas expressões protéicas, Edna, obrigado por sempre me incentivar, Priscila pelos lanches, cronogramas e companheirismo, Juliana, Karina, Guilherme, Aurélia, Mirian, Lorena, Núbia, Fernanda, Frank, Giulia, Thaís, Kely, muito obrigado

Aos colegas da Pós-Graduação, em especial meu amigo Marcelo, pelo incentivo.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os conhecimentos transmitidos, que foram de particular importância para realização deste trabalho. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	15
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL	15
1.2 BOMBA DE SÓDIO	18
1.3 ESTERÓIDES CARDIOTÔNICOS	24
1.3.1 Fator endógeno inibidor da Na ⁺ K ⁺ ATPase	24
1.3.2 Papel da ouabaína na fisiopatogenia da hipertensão	26
1.4 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO E CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA	29
1.4.1 Fatores que modificam o acoplamento excitação-contração	30
1.4.1.1 Estimulação β-adrenérgica	30
1.4.1.2 Quinases e Fosfatases	31
1.4.1.3 Influência da Na ⁺ K ⁺ ATPase e da troca sódio-cálcio	32
II OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVOS GERAIS	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
III MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	35
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	36
3.3 AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR <i>in vivo</i>	37
3.4 MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS	38
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	39

3.5.1	Força de contração isométrica e parâmetros temporais	39
3.5.2	Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundo	39
3.5.3	Variação da frequência de estimulação elétrica	39
3.5.4	Força desenvolvida após repouso de 10 minutos	40
3.5.5	Avaliação da resposta β -adrenérgica	40
3.5.6	Força desenvolvida durante as contrações tetânicas	41
3.6	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	42
3.6.1	Extração da Na^+ - K^+ ATPase	42
3.6.2	Determinação da atividade da Na^+ - K^+ ATPase	42
3.6.3	Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot	43
3.6.3.1	Extração e quantificação protéica do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), fosfolambam (PBL), receptor de angiotensina II AT_1 e Na^+ - K^+ ATPase.	43
3.6.3.2	Eletroforese e transferência das amostras	43
	IV ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
	V FÁRMACOS E REAGENTES	46
	VI RESULTADOS	48
6.1	MEDIDAS HEMODINÂMICAS	48
6.2	ESTUDO DA CONTRAÇÃO MIOCÁRDICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO	49
6.2.1	Análise da Força Isométrica	49
6.2.2	Análise dos parâmetros temporais	50

6.2.3	Análise da Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos	51
6.2.4	Avaliação da frequência de estimulação	52
6.2.5	Avaliação da força desenvolvida após repouso de 10 minutos	53
6.2.6	Avaliação da reposta inotrópica à estimulação β adrenérgica	54
6.2.7	Avaliação das Contrações Tetânicas	55
6.3	MEDIDAS BIOQUÍMICAS	56
6.3.1	Avaliação da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase	56
6.3.2	Expressão protéica do Trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX) , da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), do fosfolambam (PBL), do receptor de angiotensina II AT_1 e das isoformas α_1 e α_2 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase	57
VII	DISCUSSÃO	61
VIII	CONCLUSÃO	75
IX	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE TABELA E FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema do ciclo funcional da bomba de sódio mostrando o estado conformacional E1 e E2	20
Figura 2: Transporte de cálcio nos miócitos ventriculares. Destaque para o curso temporal do potencial de ação, o transiente de cálcio e a contração, mensurados em miócitos ventriculares de coelhos a 37°C . NCX: trocador de Na ⁺ /Ca ²⁺ do sarcolema; PLB: fosfolambam; SR: retículo sarcoplasmático	30
Tabela 1: Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média, frequência cardíaca, primeira derivada temporal de pressão positiva e negativa, pressão sistólica intraventricular esquerda e pressão diastólica final esquerda de ratos tratados com ouabaína e de ratos tratados com veículo	48
Figura 3: Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de ratos tratados com veículo vs ouabaína por 15 dias	49
Figura 4: Parâmetros Temporais em músculos papilares de ventrículos esquerdos de ratos veículo e ouabaína .	50
Figura 5: Efeito do tratamento com ouabaína na potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos	

	51
Figura 6: Força desenvolvida em diferentes freqüências de estimulação elétrica, por músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos veículo e ouabaína.	
	52
Figura 7: A avaliação indireta dos efeitos do tratamento com ouabaína no influxo de cálcio transsarcolemal mensurada pelas contrações obtidas após repouso de 10 minutos	
	53
Figura 8: Efeito do tratamento com ouabaína na intervenção inotrópica promovida pelo isoproterenol 10^{-4} M.	
	54
Figura 9 : Efeitos do tratamento crônico com ouabaína por 15 dias sobre as contrações tetânicas em músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos	
	55
Figura 10: Efeito do tratamento com ouabaína sobre atividade da bomba de sódio de ventrículo esquerdo de ratos tratados com ouabaína vs veículo	
	56
Figura 11: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) em ventrículos esquerdos de ratos dos grupos tratados com ouabaína e veículo	
	57
Figura 12: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica das isoformas α_1 e α_2 Na^+-K^+ ATPase em ventrículos esquerdos de ratos dos grupos tratados com ouabaína e veículo	
	58

Figura 13: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e fosfolambam (PBL) em ventrículos esquerdos de ratos dos grupos tratados com ouabaína e veículo

59

Figura 14: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica de receptor AT_1 em ventrículos esquerdos de ratos tratados por 15 dias com ouabaína vs veículo.

60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP : 5'-trifosfato de adenosina

Ca^{2+} = íon cálcio

dP/dt: derivada de pressão/derivada de tempo

EPM= erro padrão da média

FC= frequência cardíaca

g: grama

i.p = intra peritoneal

L_{max} : comprimento no qual a tensão é máxima

M= molar

Máx: máxima

min: mínima

min: minuto

mg: miligrama

MS: milisegundos

nmol: nano mol

NKA: bomba de sódio e potássio

NCX: trocador sódio/cálcio

OUA: ouabaína

Pi: fosfato livre

PBL: fosfolambam

PPP: potenciação pós-pausa

PAS: pressão arterial sistólica

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PSVE: pressão sistólica do ventrículo esquerdo

PdfVE: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

RS: retículo sarcoplasmático

SERCA: Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático

VE: ventrículo esquerdo

RESUMO

A ouabaína é um glicosídeo endógeno presente em concentrações nanomolares no plasma de pacientes hipertensos, participando da gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial. O tratamento crônico com ouabaína por 5 semanas produz hipertensão arterial, além de efeito inotrópico positivo e aumento da expressão da isoforma α_1 e α_2 da bomba de sódio em ventrículos esquerdos de ratos. No entanto, estudos sobre a contratilidade cardíaca no estágio inicial da hipertensão induzida por ouabaína ainda não foram desenvolvidos.

Para isso, foram utilizados ratos Wistar com três meses de idade. Os animais foram tratados com veículo (óleo de soja, 0,1mL) ou OUA (25 μ g/kg/dia) durante 15 dias. Após o tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (1.2 g/Kg, i.p), submetidos à canulação da artéria carótida direita para registros de pressão arterial média, pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica, frequência cardíaca, pressão sistólica intraventricular esquerda, pressão diastólica final esquerda e primeira derivada temporal de pressão positiva e negativa. Após os registros hemodinâmicos, os animais foram submetidos à toracotomia e os corações removidos e perfundidos através do coto aórtico para a retirada dos músculos papilares do ventrículo esquerdo. A preparação foi montada em câmaras (20ml) contendo solução Krebs-Henseleit (26°C), gaseificada com mistura carbogênica. Foram analisados, nesta preparação, a contração após a pausa (PRC), contrações tetânicas do músculo cardíaco (CT), pico de força isométrica (F), a potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60s (PR), curva de frequência (CF) e a resposta β -adrenérgica ao isoproterenol (ISO). Também foram analisados, *in vitro*, a atividade da bomba de sódio (NKA), através da técnica de hidrólise de ATP, além das expressões protéicas do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), fosfolambam (PBL), receptor de angiotensina II AT_1 e das isoformas α_1 e α_2 Na^+/K^+ ATPase, através da técnica de Western blot.

Os animais tratados com OUA apresentaram uma elevação significativa em todos os parâmetros hemodinâmicos avaliados exceto na PdfVE quando comparados com o veículo. O tratamento com OUA por 15 dias diminuiu o pico de força isométrica (veículo: $0,56 \pm 0,055$ vs ouabaína: $0,35 \pm 0,043$ $p < 0,05$). Os parâmetros de PR e a CF não se alteraram após o tratamento. Também não se observou alterações na resposta β -adrenérgica ao ISO, nas contrações tetânicas e na PRC. O tratamento com OUA aumentou a atividade da NKA (veículo: $151,85 \pm 7,60$ vs ouabaína: $191,03 \pm 11,41$, $p < 0,05$) e diminuiu as expressões protéicas da isoforma α_1 da NKA (veículo: $0,98 \pm 0,06$ vs ouabaína: $0,76 \pm 0,06$, $p < 0,05$), do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (veículo: $1,96 \pm 0,13$ vs ouabaína $0,78 \pm 0,06$, $p < 0,05$) e do receptor AT_1 (veículo: $1,19 \pm 0,18$ vs ouabaína: $0,72 \pm 0,08$, $p < 0,05$) quando comparado com o grupo veículo.

Em conclusão, os resultados demonstram que o tratamento crônico com ouabaína por 15 dias, em ratos normotensos produz um efeito inotrópico negativo. Esse efeito pode estar associado ao aumento da atividade da bomba de sódio, redução da expressão protéica da isoforma α_1 da Na^+/K^+ ATPase e redução do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Além disso, o tratamento com ouabaína reduziu

a expressão protéica do receptor AT₁, sugerindo um envolvimento do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pela ouabaína.

ABSTRACT

Ouabain (OUA) is an endogenous compound present in nanomolar concentration in the plasma hypertensive patients, participating of genesis and/or maintenance of the hypertension. The chronic OUA treatment for five week induces hypertension, beyond positive inotropic effect and increased $\alpha 1$ e $\alpha 2$ isoform sodium pump expression in left ventricle of rats. However, studies on ventricular contractility and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity in the initial period of hypertension produced by ouabain are not investigated yet.

For this, normotensive rats (Wistar); with 3 months age, were used. The animals were treated daily with vehicle (soybean 0,1ml) or ouabain during 15 days. After the treatment, the animals were anesthetized with urethane (1.2 g/Kg, i.p) and the left carotid artery was cannulated for determination of the mean, systolic and diastolic blood pressure, heart rate, left ventricle systolic, left ventricle end diastolic pressure (LVEDP) and their first time derivatives positive and negative. After the hemodynamic registers, the animals were submitted to thoracotomy and the hearts removed and perfused through the aortic stump to permit a dissection of the left ventricle papillary muscles. The preparation were mounted in a chambers (20ml) contend gassed Krebs-Henseleit solution (26°C). The following protocols were used: participation of the calcium transsarcolemal flow, the tetanics contractions (TC), the isometric peak force (F), post-rest potentiation in the 15, 30 and 60s (PRP), change in the rate stimulation (CS) and the positive inotropic effect of isoprenaline (ISO). Also were analyzed the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase (NKA) activity and protein expressions of $\text{Na}^+\text{/Ca}^{2+}$ change (NCX), Ca^{2+} ATPase sarcoplasmic reticulum (SERCA), phospholamban (PBL), AT_1 receptor and expression $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Na^+K^+ ATPase isoform.

The ouabain treated group demonstrated increases the all hemodynamics parameters except in LVEDP. The treatment with OUA reduced isometric peak force (vehicle: $0,56 \pm 0,055$ vs ouabain: $0,35 \pm 0,043$ $p < 0,05$) and doesn't modify PRP and TC. Also did not observe alterations in the ISO, calcium transsarcolemal flow and CS. The treatment with OUA increased Na^+K^+ ATPase activity (vehicle: $151,85 \pm 7.60$ vs ouabain: $191,03 \pm 11,41$, $p < 0,05$) and reduced expression of the $\alpha 1$ Na^+K^+ ATPase isoform (vehicle: $0,98 \pm 0,06$ vs ouabain: $0,76 \pm 0,06$, $p < 0,05$), NCX (vehicle: $1,96 \pm 0,13$ vs ouabain $0,78 \pm 0,06$, $p < 0,05$) and AT_1 receptor (vehicle: $1,19 \pm 0,18$ vs ouabain: $0,72 \pm 0,08$, $p < 0,05$) expression when compared with the vehicle group.

In conclusion, results demonstrated that chronic ouabain treatment for 15 days, in normotensive rats, produces negative inotropic effect. This effect can be associated with increased Na^+K^+ ATPase activity, reduction of the protein expression of the $\alpha 1$ Na^+K^+ ATPase isoform and reduction protein expression of the NCX. Moreover, the treatment with ouabain reduced protein expression AT_1 receptor suggesting involvement of central mechanisms like increased sympathoexcitatory activity via activation renin-angiotensin system.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial

A elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doença cardiovascular, representando um dos principais agravos à saúde do Brasil, pois eleva o custo médico social, principalmente pelas suas complicações como doenças cérebro-vascular, arterial coronariana e vascular, além da insuficiência cardíaca e da insuficiência renal crônica. Em 2003, no Brasil, 27,4% dos óbitos foram ocasionados por doenças cardiovasculares, sendo o acidente vascular cerebral a principal causa desses óbitos (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

A pressão arterial (PA) é uma entidade física influenciada por fatores como volume sanguíneo e capacitância da circulação, que são resultantes da interação entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP). Segundo a equação de Poiseuille-Hagen, a PA pode ser calculada pelo produto da resistência vascular periférica (RVP) pelo débito cardíaco (DC). Sendo assim, fatores capazes de modificar o débito cardíaco e/ou a resistência vascular periférica alteram a pressão arterial (Lolio, 1990; Kaplan, 1990).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006), para indivíduos adultos, os valores considerados ótimos são: pressão sistólica abaixo de 120 mmHg e de diastólica abaixo de 80 mmHg. No momento em que a pressão arterial atinge a faixa de 130/85 a 139/89 mmHg, classifica-se como um estágio limítrofe e se esses valores excederem 140/90 mmHg classifica-se como hipertensão arterial.

A hipertensão arterial, na maioria dos indivíduos, é proveniente de vários fatores de causas indefinidas, sendo assim classificada como hipertensão primária ou essencial. Já os casos de pacientes que desenvolvem hipertensão arterial devido a fatores como doença vascular renal ou excesso de produção

de aldosterona ou de catecolaminas passam a ser classificados como hipertensão arterial secundária (Lolio, 1990; Kaplan, 1998).

Na hipertensão primária, a elevação da resistência periférica é a principal responsável pela elevação da pressão arterial (Krieger, 1996). Entretanto diversos fatores contribuem para a gênese e/ou manutenção da hipertensão como fatores neurogênicos, genéticos, hormonais e ambientais (Wyss, 1993). Com relação à participação do sistema nervoso, um distúrbio do componente simpático do sistema nervoso autonômico, ou seja, um aumento da atividade simpática seria uma possível alteração inicial no desenvolvimento da hipertensão. Assim as catecolaminas aumentam o tônus vascular, elevando a resistência vascular periférica através da sua ação vasoconstritora, promovendo assim um aumento no grau de contração da musculatura das arteríolas. Além desse efeito constritor, as catecolaminas também podem promover o espessamento da camada muscular dos vasos, produzindo uma hipertrofia. Esses efeitos seriam os responsáveis pela gênese e/ou manutenção da hipertensão (Lopes *et. al*, 2008; Krieger *et.al*, 1996; Yu, 1996).

O fator racial também influencia os níveis pressóricos, pois adultos e crianças da raça negra possuem níveis mais elevados de pressão arterial. De acordo com o estudo feito por Lessa (1998) existe uma razão de prevalência de hipertensão negros/brancos entre 1,5 e 1,7. A diferença tem sido atribuída a fatores como menor excreção renal de sódio e potássio, menor supressão da atividade de renina plasmática após exposição à sobrecarga de sódio e níveis elevados de insulina com valores de glicemia de jejum mais baixos (Berenson, 1995; Ferreira *et.al*, 1999; de Resende *et.al*, 2007).

A ativação do sistema renina angiotensina e a disfunção endotelial são possíveis mecanismos humorais causadores da hipertensão. O endotélio tem a capacidade de produzir substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e é o equilíbrio entre essas substâncias que contribui para manutenção do tônus vascular. Quando ocorre um desequilíbrio desses fatores, definido como uma das causas da disfunção endotelial há um aumento da produção de substâncias vasoconstritoras, como por exemplo, endotelina, angiotensina II e

uma diminuição de substâncias vasodilatadoras como óxido nítrico e prostaciclina. Esse desequilíbrio provoca um aumento da resistência vascular e conseqüentemente um aumento da pressão arterial. (Krieger *et.al*, 1996)

A angiotensina II é formada pela clivagem do angiotensinogênio pela enzima conversora de angiotensina e suas ações compreendem o controle do tônus vascular, a liberação de aldosterona, a reabsorção de sódio no túbulo renal proximal, o mecanismo de sede e a liberação de vasopressina (Krieger, 1996). Além disso, a angiotensina II produz um aumento de liberação de catecolaminas nas terminações nervosas, aumentando a atividade do sistema nervoso simpático, o que contribui para manutenção e/ou gênese da hipertensão (De Gasparo *et al*, 1995). No coração a angiotensina II produz um efeito inotrópico positivo por aumento de influxo de cálcio durante a excitação cardíaca, atuando diretamente em receptores AT_1 nos cardiomiócitos (Mill *at.al.*,1997; Freer *et.al*, 1976).

Sendo assim, todos esses fatores citados acima, contribuem para a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial. Entretanto, na década de sessenta, pesquisadores propuseram a existência de um hormônio, inibidor da Na^+K^+ ATPase, que se encontrava elevado em algumas patologias como a hipertensão arterial (Manunta *et al*, 2009).

Para entender a ação desse agente no processo de hipertensão é necessário um detalhamento da Na^+K^+ ATPase, que é um receptor desse hormônio denominado ouabaína.

1.2 Bomba de sódio

A bomba de sódio, também chamada de Na^+K^+ ATPase, é uma proteína integral de membrana pertencente à família das ATPases do tipo P que são caracterizadas pela formação de um intermediário fosforilado durante o seu ciclo catalítico. As ATPases do tipo P são responsáveis pelo transporte ativo de vários cátions através da membrana, como sódio, hidrogênio, magnésio, potássio, cálcio, cobre e cádmio (Horisberge, 2004; Geering, 2005). Sendo assim, a Na^+K^+ ATPase utiliza a energia armazenada em ATP para promover o transporte de íons sódio e potássio, originando um gradiente químico transmembrana, que é refletido no potencial de repouso celular e usado para conduzir uma variedade de processos de transporte secundários (Xu, 2005; Hilgenber *et.al.*, 2009).

A Na^+K^+ ATPase é constituída pelas subunidades α , β e γ (Horisberge, 2004). Com peso molecular aproximadamente de 110 kDa, a subunidade α é composta de 10 domínios transmembranais, responsáveis pelo transporte de cátions, hidrólise de ATP e, além disso, agindo como um receptor farmacológico para os glicosídeos cardíacos (Geering, 2005). Já a subunidade β é uma glicoproteína com aproximadamente 40 kDa e possui apenas um domínio transmembrana. Sua presença é essencial para a maturação e atividade normal da enzima e parece estar envolvida na modulação da afinidade da enzima ao K^+ e Na^+ , além de facilitar o ancoramento e estabilização do complexo protéico na membrana. A presença de oligossacarídeos serve para aumentar a eficiência da associação às subunidades, porém não interfere na função da enzima (Horisberge, 2004; Blanco e Mercer, 1998; Chow, 1995).

A subunidade γ é uma pequena proteína com peso molecular de aproximadamente de 14 kDa pertencente ao grupo de sete proteínas chamadas de “FXVD”, sendo a subunidade γ conhecida como FXVD2. As funções da subunidade γ ainda não estão bem claras, porém sabe-se que ela não é requerida para atividade da bomba, mas está envolvida com a

modulação do transporte iônico da Na^+K^+ ATPase. Pesquisas recentes mostram que a FXD2 aumenta aparentemente a afinidade da bomba de sódio ao potássio aumentando o potencial negativo de membrana tanto na presença quanto na ausência de sódio extracelular e promove o aumento da afinidade ao ATP (Blanco & Mercer, 1998; Geering, 2006; Faller, 2008).

A relevância fisiológica da modulação da Na^+K^+ ATPase pela FXD2 é pouco conhecida, mas recentes estudos mostram que esse aumento da afinidade da bomba de sódio pelo ATP associado ao FXD2, pode ser um importante mecanismo para preservação da atividade da Na^+K^+ ATPase, em seguimentos renais como a medula externa, que são altamente propensos a anóxia (Geering, 2006).

Até 1980 era habitual considerar que a bomba de sódio era uma única enzima constituída de duas subunidades α e de duas subunidades β , porém sabe-se hoje que a Na^+K^+ ATPase apresenta múltiplas isoformas das subunidades α e β , cuja a expressão varia de acordo com cada tecido (Blanco & Mercer, 1998; Glynn, 1993). Em relação à subunidade α , a mesma possui quatro isoformas: $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ e $\alpha 4$. A isoforma $\alpha 1$ é encontrada em quase todos os tecidos, já a isoforma $\alpha 2$, é encontrada predominantemente em adipócitos, cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco, enquanto a isoforma $\alpha 3$ encontra-se em abundância nos tecidos nervosos, mas também é encontrada no coração, células sanguíneas e ovários. A isoforma $\alpha 4$ foi descrita somente em testículos de ratos (Blanco & Mercer, 1998).

A subunidade β possui três isoformas chamadas de $\beta 1, \beta 2$ e $\beta 3$. As isoformas $\beta 1$ e $\beta 2$ tem sido localizadas em diferentes tecidos de mamíferos, já a isoforma $\beta 3$ tem sido detectada em ratos, anfíbios e humanos (Martin-Vasallo *et al.*, 1989). Ambas as isoformas, α e β da bomba de sódio, exibem uma expressão tecido específica sendo que a isoenzima $\alpha 1\beta 1$ é encontrada em quase todo os tecidos (Blanco & Mercer, 1998).

A bomba de sódio funciona como um sistema de transporte ativo, responsável pela manutenção dos gradientes de sódio e potássio através da membrana

plasmática. A energia liberada pela hidrólise do ATP está acoplada ao movimento de três íons sódios para dentro da célula e dois íons potássio para fora da célula. Esses três íons sódio são ligados intracelularmente na conformação chamada E1 da bomba de sódio que é fosforilada pelo ATP. Os íons sódios são liberados para o meio extracelular por outro estado conformacional da enzima, chamado de E2, que liga dois íons potássio do meio extracelular, reagindo com a H_2O e liberando o P_i no citosol. Assim, a bomba completa o ciclo voltando ao estado conformacional inicial (E1) liberando os íons potássio dentro da célula (Faller, 2008) (Figura 1).

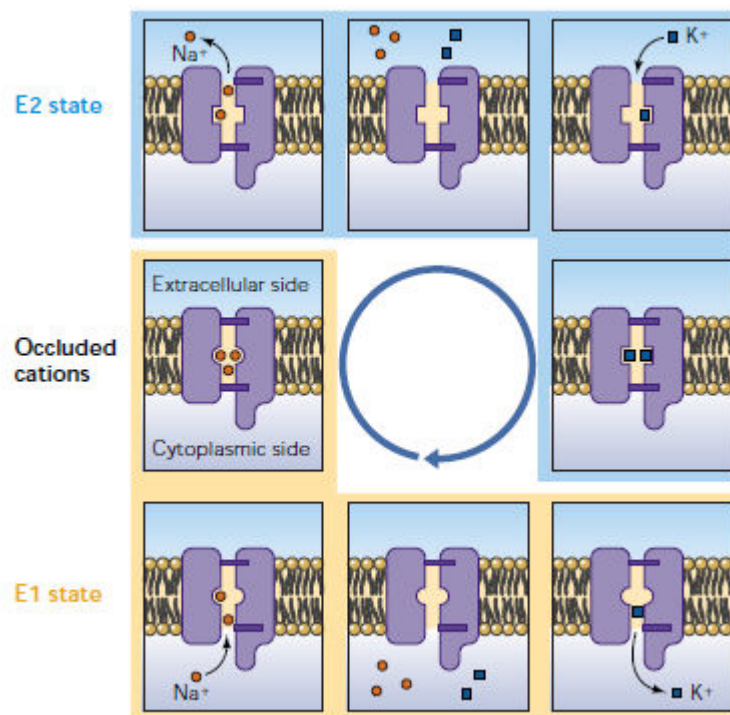


Figura 1: Esquema do ciclo funcional da bomba de sódio mostrando o estado conformacional E1 e E2 (adaptado de Horisberger, 2004)

O gradiente eletroquímico gerado por esse mecanismo de transporte da $Na^+K^+ATPase$ é responsável pela manutenção do potencial de repouso celular, pelo balanço osmótico da célula e pelas propriedades excitáveis das células musculares e nervosas (Blanco & Mercer, 1998).

A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ tem sua atividade regulada por vários fatores. Em longo prazo, a regulação da atividade da bomba de sódio geralmente envolve alteração na síntese de RNA mensageiro ou a degradação das isoformas das subunidades. Em curto prazo, rápidas alterações na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ podem ser mediadas por uma fosforilação reversível da subunidade α_1 ou por uma alteração da concentração intracelular de sódio (Lei *et.al.*, 2003).

Hormônios e agentes vasoativos também podem regular a atividade da bomba de sódio, seja pela alteração da concentração de sódio intracelular ou por outros mecanismos, como a fosforilação pelas proteínas quinases. A ativação das proteínas quinases pode induzir o aumento ou a diminuição da atividade da bomba dependendo do tecido. Por exemplo, a proteína quinase A (PKA) estimula a atividade da bomba de sódio no túbulo contorcido proximal e inibe a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ na alça de Henle (Blanco & Mercer, 1998). Outra proteína quinase que participa da regulação da bomba de sódio é a proteína quinase C (PKC). Assim como a PKA, a PKC pode inibir ou estimular a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ dependendo do tecido. A ação da PKC é dada através da ativação da via da fosfolipase A2 ou pela fosforilação direta na subunidade α da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Therien and Blostein, 2000). Outros autores demonstram que além das PKA e PKC, as tirosinas quinases também podem regular a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Por exemplo, a insulina estimula a bomba de sódio dos músculos esqueléticos, através da fosforilação da subunidade α através de um mecanismo dependente das tirosinas quinases e da PKC (Chibalin *et.al.*, 2001).

Vários hormônios têm a propriedade de alterar a atividade da bomba de sódio, dentre eles estão às catecolaminas e os hormônios esteroidais. Dentre os hormônios esteroidais, os corticosteróides possuem um efeito regulatório específico em longo prazo. A aldosterona, um corticosteróide, é capaz de aumentar a expressão da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, sendo que esse aumento é dependente de mudanças na concentração de sódio citoplasmática. Já as catecolaminas afetam a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ através da dopamina, epinefrina e norepinefrina. A dopamina promove inibição da bomba de sódio

enquanto que a epinefrina e norepinefrina são capazes de estimular sua atividade (Therien and Blostein, 2000).

Em adição a esses efeitos regulatórios mediados por hormônios e neurotransmissores, recentes experimentos têm revelado um novo mecanismo regulatório que envolve a interação da bomba de sódio com pequenas proteínas da família FXYD, como a subunidade γ . Além da subunidade γ , trabalhos recentes demonstram que o fosfolema, uma proteína pertencente também à família FXYD, tem sido evidenciada como uma proteína reguladora da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Bossuyt *et.al*, 2005; Despa *et.al*, 2005). Quando o fosfolema está desfosforilado, promove uma inibição da bomba de sódio, porém quando fosforilado pela PKA, por exemplo, aumenta a atividade da bomba (Shattock, 2009). Em contraste com a regulação hormonal, a interação das proteínas FXYD não produz alteração na expressão protéica da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, mas modifica as propriedades de transporte da bomba de sódio via tecido-específico e isoforma específica (Geering, 2006).

Por essas vias, hormônios, íons e peptídeos podem modular a atividade da bomba de sódio, regulando a concentração de sódio intracelular (Therien and Blostein, 2000). Sabendo que as concentrações de sódio citoplasmáticas influenciam também nas concentrações de cálcio, fatores que alteram a atividade da bomba podem alterar a concentração de cálcio citoplasmática via trocador sódio-cálcio, participando na modulação da contração do músculo liso vascular e cardíaco. Um exemplo dessa participação da modulação da atividade da bomba de sódio na contração do miocárdio via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, é a ligação de um glicosídeo cardíaco na subunidade α da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, promovendo aumento de cálcio nos miócitos e resultando em um aumento de força de contração (Tian and Xie, 2008; Geering, 2006).

De fato, vários trabalhos têm demonstrado que em plasma de animais hipertensos a atividade da bomba de sódio está diminuída devido à presença desse fator endógeno, correlacionando assim com a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial (Hamlyn *et al* 1982).

1.3 Esteróides cardiotônicos

Os esteróides cardiotônicos, como os digitálicos, são sintetizados por certas plantas e possuem a capacidade de inibir a bomba de sódio (Wray *et.al.* 1985).

A ouabaína, um glicosídeo cardiotônico, foi reconhecido como um composto ativo primário do veneno de flechas da tribo Maasai, na África, pelo um antropologista francês Arnaud. É originária da semente de plantas africanas como *Strophantus gratus* (ou Ouabaio) e *Acokenthera schimpert* (Wray *et.al.* 1985).

Entretanto os glicosídeos cardíacos foram introduzidos na terapêutica para tratamento de insuficiência cardíaca por William Withering, em 1785, quando investigava as ações das folhas de uma planta chamada foxglove, que posteriormente foi denominada *Digitalis purpurea*. Os digitálicos foram e são utilizados para o tratamento de choque, certas arritmias assim como para estudos experimentais (Wray *et.al.* 1985).

1.3.1 Fator endógeno inibidor da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$

A busca por um ligante endógeno da bomba de sódio iniciou com Wardener *et. al.*, em (1961), quando demonstraram um hormônio circulante natriurético que participava da regulação da excreção de sódio pelos rins, após administração venosa de salina. Em 1969, Kramer *et.al.* demonstraram também que cães com sobrecarga de salina, apresentavam uma substância plasmática que inibia o transporte de sódio através das membranas epiteliais, sugerindo igualmente que o ligante endógeno era um inibidor da bomba de sódio.

Em 1976, Haddy & Overbeck evidenciaram que esse inibidor endógeno da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ participava da gênese das hipertensões dependentes de volume, pois nessa situação a atividade da bomba estava diminuída visto que a ação desse hormônio era semelhante a ação da ouabaína nos vasos

sanguíneos. Sendo assim o termo *digitalis like* começou a ser utilizado na literatura (Haddy *et.al.* 1978).

A relação da inibição da Na⁺K⁺ATPase pelo fator endógeno com a pressão sanguínea somente foi demonstrada na década de 80, onde pesquisadores confirmaram que plasma de pacientes com hipertensão essencial continha um inibidor da bomba de sódio (Poston *et al.*1981; Hasegawa *et.al.*1987).

A partir de então surgiu a tentativa de identificar esse inibidor da Na⁺K⁺ATPase. Porém, somente em 1991, Hamlyn *et. al.* purificaram o ligante endógeno do plasma humano e constataram que este fator era biologicamente, estruturalmente e imunologicamente semelhante à ouabaína. Várias provas passaram a existir comprovando a semelhança do fator *digitalis like* com a ouabaína. Dentre elas, destacam-se a alta afinidade pelo sítio de ligação dos glicosídeos cardíacos na bomba de sódio e suas características físico-químicas, como a massa do íon protonado e sua composição elementar (C₂₉H₄₅O₁₂), além de ações cardiotônicas e vasopressoras. Todas essas características são semelhantes ao composto digitálico ouabaína derivado da *Strophantus gratus* e *Acocanthera ouabaio* (Hamlyn *et.al.*,1991).

Nos mamíferos, as maiores produções de ouabaína ocorrem na glândula adrenal e no hipotálamo. A síntese desse hormônio acontece na zona glomerulosa do córtex da adrenal sendo estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (Blaustein *et.al.*, 2009).

A lesão da região aterovenral do terceiro ventrículo (AV3V) abole a resposta do fator *ouabain-like* à expansão aguda de volume em ratos, sugerindo que a região anteroventral do terceiro ventrículo é também local de síntese de ouabaína (Pamnani *et.al.*,1981).

Vários estados patológicos como insuficiência cardíaca congestiva (Gottlieb, *et.al*, 1992), hipertensão essencial (Hamlyn *et.al.*,1991), síndrome de Cushing (Naruse,*et al.*1994), hiperaldosteronismo primário (Rossi *et.al*,1995) e insuficiência renal crônica (Hamlyn *et.al.*,1996) apresentam altos níveis

circulantes de ouabaína. Assim, esse glicosídeo endógeno, pode estar envolvido na fisiopatogenia dessas doenças.

A hipertensão arterial é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares e representa um grande problema de saúde pública, afetando quase 50 % da população, sendo, portanto, um relevante alvo de estudo. Sabendo que os níveis de ouabaína estão intimamente relacionados com a pressão arterial, pesquisadores empenham-se em demonstrar a relação entre esse digitalico e a fisiopatogenia da hipertensão arterial.

1.3.2 Papel da ouabaína na fisiopatogenia da hipertensão

A participação da ouabaína na fisiopatogenia da hipertensão arterial vem sendo proposta desde 1976, quando Haddy & Overbeck demonstraram que a participação de um fator inibidor da bomba de sódio teria um papel importante nos modelos de hipertensão volume dependente.

Aproximadamente 50 % dos pacientes com hipertensão arterial não tratada e a maioria dos pacientes com adenomas adrenocorticais e hipertensão apresentam um elevado aumento da concentração plasmática de ouabaína (Blaustein *et al*, 2009).

A hipertensão induzida pela ouabaína é dependente de mecanismos centrais associados com o aumento do tônus simpático, com subsequente ativação do sistema renina angiotensina e endotelina, alterando a resistência vascular periférica (Briones *et al*, 2006; Huang and Leenen, 1999).

Trabalhos mostram que injeções intracerebroventriculares de ouabaína, em ratos conscientes, promovem um aumento da atividade simpática, da frequência cardíaca e da pressão arterial. Esses efeitos foram abolidos quando administraram anticorpos antiouabaína, sugerindo assim a participação da ouabaína na gênese e/ou manutenção da hipertensão via sistema nervoso central (Schoner *et al*, 2007; Veerasingham & Leenen, 1999).

A hipertensão produzida pela ouabaína via sistema nervoso central é mediado pelo sistema renina-angiotensina cerebral, pois suas ações hipertensivas são bloqueadas pela administração intracerebroventricular de losartan, um antagonista de receptor AT_1 para angiotensina II (Veerasingham & Leenen, 1999). Recentes estudos demonstram uma atenuação marcante da hiperatividade simpática e disfunção ventricular esquerda em ratos transgênicos com deficiência de angiotensinogênio, confirmando o importante papel do sistema renina-angiotensina central nos efeitos simpatoexcitatórios desse digitalico (Cheung *et al*, 2006; Veerasingham & Leenen, 1999).

O componente central do efeito hipertensor da ouabaína foi descrito também por Soung-Mize *et al* 1982, que após lesão da região AV3V em ratos Doca-sal, observaram uma redução da pressão arterial e melhora na atividade da bomba de sódio. Além disso, a região AV3V é essencial para hipertensão induzida pela administração de ouabaína e salina, provavelmente por aumento do tônus simpático (Veerasingham & Leenen, 1999).

Apesar de todos estes estudos, as concentrações de ouabaína utilizadas nestes trabalhos são muito maiores do que as encontradas em situações fisiopatológicas (cerca de 10 nM, Hamlyn & Manunta, 1992). Porém, dados do nosso laboratório e de outros pesquisadores demonstram que administração crônica de ouabaína em baixas concentrações provoca hipertensão em ratos (Padilha *et al*, 2008 ; Rossoni *et al*, 2006, Vassallo *et al*, 1997 ; Manunta *et al*, 1994). Então como a concentração nanomolar de ouabaína poderia modular a atividade da bomba de sódio?

Esse mecanismo de modulação da atividade da bomba de sódio por concentração nanomolar de ouabaína foi elucidado por Blaustein *et al*, (1998), com a identificação da microrregião da célula denominada de *plasmersome*. Vários estudos mostram que a isoforma α_1 da $Na^+ K^+$ ATPase está distribuída uniformemente na membrana plasmática e as isoformas α_2 α_3 , que possuem alta afinidade a ouabaína, estão co-localizadas com o trocador Na^+/Ca^{2+} da membrana plasmática, justapostos ao retículo sarcoplasmático na microrregião da célula chamada de *plasmersome* (Blaustein *et al*, 2009 ; Despa & Bers,

2007 ; Juhaszova & Blaustein, 1997a;1997b). Assim, mesmo concentrações nanomolares de ouabaína poderiam inibir a bomba de sódio sensível a ouabaína, promovendo o aumento das concentrações de sódio na região do *plasmersome*, que por sua vez inibiria a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ com conseqüente aumento da concentração de cálcio somente nessa microrregião, o que levaria ao acúmulo de cálcio no retículo sarcoplasmático. Desse modo, após estímulos inotrópicos, a resposta contrátil resultante seria amplificada em decorrência de uma maior liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Blaustein *et al*, 2009).

A ouabaína no músculo cardíaco produz ações inotrópicas. Rossoni *et al*, 2006 demonstraram que a administração crônica, de baixas doses de ouabaína, além de produzir hipertensão arterial aumenta a força de contração de músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos. Sendo assim, a ouabaína, além de promover aumento do tônus simpático, aumenta a força de contração do coração, sendo mais um fator que contribui para a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial induzida pela ouabaína.

Para um melhor entendimento das alterações promovidas pela ouabaína na contratilidade do músculo cardíaco, a seguir temos uma breve revisão sobre o mecanismo envolvido no acoplamento excitação-contração cardíaco e na contratilidade miocárdica.

1.4 Acoplamento excitação-contração e contratilidade miocárdica

O acoplamento excitação-contração cardíaco engloba um conjunto de mecanismos, desencadeados pela estimulação elétrica, que culmina na contração do miócito cardíaco. O íon cálcio é primordial para a atividade elétrica cardíaca e é um ativador direto dos miofilamentos (Bers, 2002).

Durante o potencial de ação cardíaco, o cálcio entra na célula através da abertura de canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem gerando uma corrente lenta despolarizante (I_{CaL}). Essa corrente é ativada em potenciais menos negativos (-30 a -20 mV) e se inativa mais lentamente contribuindo para a geração de um platô no potencial de ação cardíaco (Bers, 2002; Bean, 1985; Verheijck *et.al*, 1999).

O influxo de cálcio promove a liberação de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático (Fabiato, 1983) que é o principal reservatório intracelular de cálcio. A combinação da entrada de cálcio e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático resultam em aumento da concentração de cálcio livre, $[Ca^{2+}]_i$, no interior da célula. Esse cálcio livre irá se ligar diretamente aos miofilamentos, mais especificamente na troponina C (TnC) desencadeando o processo contrátil (Solaro *et al*, 1998; Rayment *et.al*, 1993;).

O relaxamento da célula cardíaca inicia-se quando o cálcio desassocia da troponina C, seguido de uma redução da concentração de cálcio intracelular promovida por ação de 4 mecanismos, envolvendo: a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, que possui a função de recaptar ativamente o cálcio para o seu interior; o trocador Na^+/Ca^{2+} do sarcolema (NCX) que é responsável pela extrusão de cálcio da célula em troca da entrada de íons sódio; a Ca^{2+} ATPase do sarcolema e o uniporte de cálcio na mitocôndria (Bers *et.al*, 2006).

Os mecanismos que fazem parte do ciclo do cálcio na célula cardíaca estão ilustrados na figura 2

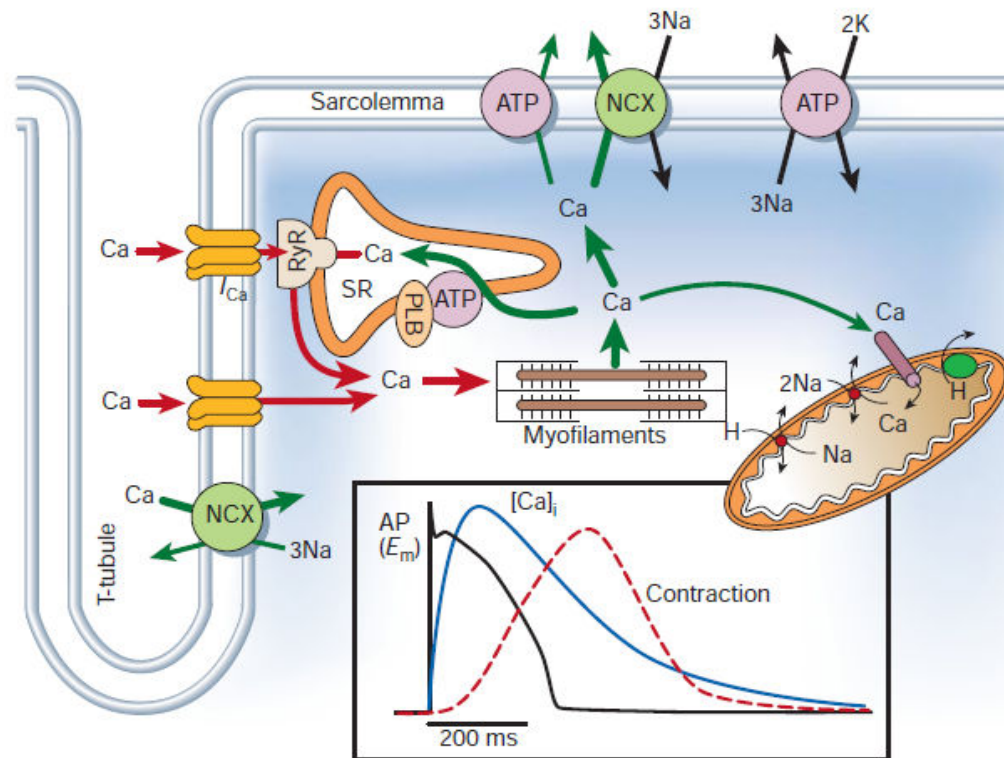


Figura 2: Transporte de cálcio nos miócitos ventriculares. Destaque para o curso temporal do potencial de ação, o transiente de cálcio e a contração, mensurados em miócitos ventriculares de coelhos a 37°C . NCX: trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ do sarcolema; PLB: fosfolamban; SR: retículo sarcoplasmático (Bers, 2002)

1.4.1 Fatores que modificam o acoplamento excitação-contração

1.4.1.1 Estimulação β -adrenérgica

Fisiologicamente a estimulação simpática no coração através de receptores β -adrenérgicos promove efeito inotrópico e lusitrópico positivo. A estimulação de receptores β -adrenérgicos ativam uma proteína Gs a qual irá estimular a adenilato ciclase (AC) produzindo AMPc (Gao *et.al*, 1998). Por sua vez, o AMPc irá ativar a proteína cinase A (PKA). Essa cinase é responsável por fosforilar diversas proteínas que participam do acoplamento excitação contração (Bers, 2002).

O efeito inotrópico positivo alcançado pela estimulação β -adrenérgica é explicado pela fosforilação dos canais de cálcio voltagem dependente presentes no sarcolema e pelos canais de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático, chamados de receptores de rianodina, os quais promovem o aumento de cálcio intracelular (Valdivia *et.al*,1995). Já o efeito lusitrópico positivo da PKA é mediado pela fosforilação da troponina I, diminuindo a afinidade da troponina C ao cálcio, e do fosfolambam, que deixa de inibir a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, promovendo uma maior recaptação de cálcio (Bers, 2002; Li *et.al*,2000).

1.4.1.2 Quinases e Fosfatases

A amplitude e velocidade do transiente de cálcio são reguladas por fosforilação de reguladores do ciclo de cálcio nos cardiomiócitos. Essa regulação é feita por duas quinases chamadas de proteína cinase A (PKA) e a Ca^{2+} /calmodulina dependente de cinase II (CaMKII). Essas duas proteínas desenvolvem um importante papel no balanço dinâmico com as fosfatases para o controle local da fosforilação de alvos específicos. A PKA fosforila pelo menos três locais chaves reguladores de cálcio, por exemplo, canal de cálcio voltagem dependente, receptores de rianodina e o fosfolambam. Já CaMKII fosforila também todos esses locais que a PKA fosforila e ainda fosforila canal de sódio dependente de CaMKII e canal de potássio modulando indiretamente o acoplamento excitação-contração cardíaco (Ikeda *et al*,2008).

A fosforilação protéica é um processo dinâmico e reversível de modificação protéica. Para manter a homeostase celular, as proteínas fosforiladas pela PKA e CaMKII são ativamente desfosforiladas pelas fosfatases promovendo o retorno do ciclo do cálcio para o basal. Os principais isotipos de fosfatases cardíacas são tipo 1 (PP1) e a tipo 2A (PP2A), ambos os isotipos afetam o acoplamento-excitação contração cardíaco. A PP1 parece ter alta afinidade para desfosforilar os sítios reguladores de cálcio como canais de cálcio voltagem dependentes, receptor de rianodina e o fosfolambam, enquanto a isoforma PP2A desfosforilar os miofilamentos como a troponina I e a miosina

ligada a troponina C. Assim, as quinases e fosfatases regulam o acoplamento excitação-contração cardíaco modulando a força de contração cardíaca (Ikeda *et al*, 2008).

1.4.1.3 Influência da Na⁺-K⁺-ATPase e da troca sódio-cálcio

No coração, a concentração de sódio intracelular [Na⁺]_i é muito importante na modulação da atividade elétrica e contrátil. Isto ocorre, porque o sódio intracelular controla a concentração de íons cálcio via trocador Na⁺/Ca²⁺ e, como já foi mencionado, o cálcio é um fator determinante na geração de força pelo músculo cardíaco sendo essencial para o processo de acoplamento excitação-contração. O aumento de sódio intracelular diminui a atividade do trocador Na⁺/Ca²⁺ desfavorecendo o efluxo de cálcio, aumentando assim o cálcio intracelular e melhorando a contração (Despa & Bers, 2003).

O nível de sódio intracelular é definido por um balanço fino entre o influxo e efluxo de sódio. Enquanto existem muitos caminhos para entrada de sódio, a bomba de sódio é a principal rota de extrusão de sódio e, conseqüentemente, é essencial na regulação do sódio intracelular. A bomba de sódio usa a energia derivada da hidrólise do ATP para trocar três íons sódio intracelular por dois íons potássio extracelular (Despa & Bers, 2003). Sendo assim, fatores que alteram a atividade da bomba de sódio modulam indiretamente a concentração de cálcio intracelular, alterando a força de contração do músculo cardíaco.

O tratamento crônico com ouabaína produz hipertensão, sendo essa hipertensão, pelo menos em parte, dependente da ativação de mecanismos centrais associados com o aumento do tônus simpático e subsequente ativação do sistema renina-angiotensina e o sistema endotelina. Entretanto sabe-se que a hipertensão está associada com alterações funcionais, estruturais e bioquímicas do tecido cardíaco (Swynghedauw, 1999). Trabalho na literatura demonstra que o tratamento crônico com ouabaína, durante 5 semanas, promove hipertensão arterial e alterações na maquinaria contrátil cardíaca (Rossoni *et.al*, 2006). No entanto, esses estudos foram desenvolvidos quando

a hipertensão induzida pela ouabaína já estava estabelecida e, portanto, não se sabe ainda se essas alterações observadas são dependentes da hipertensão per se ou induzidas pela própria ouabaína. Este estudo propõe investigar se, em estágios iniciais da hipertensão induzida pela ouabaína (15 dias de tratamento), as possíveis alterações a serem observadas, se contrapõe ou favorecem ao estabelecimento da hipertensão. Portanto, o presente estudo visa elucidar esses possíveis efeitos da ouabaína sobre a função cardíaca utilizando o período inicial da hipertensão induzida pela ouabaína em concentrações nanomolares.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo é investigar as possíveis modificações na atividade mecânica do coração de ratos tratados durante 15 dias com ouabaína.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os parâmetros cardiovasculares *in vivo* dos efeitos do tratamento com ouabaína.
- 2) Estudar o efeito do tratamento com ouabaína sobre a amplitude e sobre os parâmetros temporais da contração isométrica em músculos papilares de ratos.
- 3) Verificar os efeitos do tratamento com ouabaína sobre a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio e sobre a atividade do retículo sarcoplasmático
- 4) Averiguar um possível efeito desse tratamento sobre as proteínas contráteis do músculo cardíaco, utilizando, para tal, o desenvolvimento de contração tetânica.
- 5) Investigar o efeito desse tratamento sobre a participação da ativação β -adrenérgica e sobre a força desenvolvida em várias frequências de estimulação.
- 6) Estudar o efeito do tratamento com ouabaína sobre a atividade da bomba de sódio cardíaca e sobre as expressões protéicas das isoformas α_1 e α_2 da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, do fosfolambam, do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, e do receptor AT_1 para angiotensina II.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos (n=25) com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 250-300g. Estes animais foram cedidos pelo Biotério do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração.

Os experimentos foram realizados conforme as normas de legislação e ética para prática Didático-Científico da vivisseccção de animais de acordo com a lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA/EMESCAM).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos: Veículo e Ouabaína.

O grupo Veículo recebia, diariamente, injeções intramusculares de óleo de soja no volume de 0,1 ml, durante um período de 15 dias.

Os animais pertencentes ao grupo Ouabaína recebiam 25µg/Kg (≈10nM) de ouabaína, diluído em óleo de soja e administrava-se 0,1ml diariamente durante um período de 15 dias.

Após 15 dias de tratamento, estes animais foram utilizados para realização dos seguintes protocolos experimentais:

- 1) Avaliação cardiovascular *in vivo*
- 2) Avaliação da contratilidade de músculos papilares isolados, do ventrículo esquerdo
- 3) Medida da atividade específica da Na⁺/K⁺ ATPase e expressão protéica do trocador sódio cálcio, fosfolambam, Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático, receptor AT1 e das isoformas alfa 1 e 2 da bomba de sódio.

3.3 Avaliação Cardiovascular *in vivo*

Para avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg, ip) e submetidos à cateterização da artéria carótida direita para medidas hemodinâmicas. O plano anestésico foi acompanhado com testes como pinçar o rabo do animal, e o anestésico foi suplementado quando necessário. As canulações foram realizadas com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (100UI/ml) Após a cateterização, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac) acoplado a um pré-amplificador (Funbec MP 100), que por sua vez, estava conectado a um sistema Biopac de aquisição de dados (MP 30 Biopac Systems, Inc; CA). Os dados de frequência cardíaca foram obtidos indiretamente e concomitantemente a partir dos registros de pressão. Para aquisição dos dados foi utilizada uma taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo. As derivadas temporais (dP/dt) máxima e mínima foram obtidas *offline* dos registros de ondas de pressão intraventricular.

Após o período de estabilização, foram avaliados por registro contínuo, os seguintes parâmetros nos grupos Veículo e Ouabaína:

- Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).
- No ventrículo esquerdo foi avaliado: pressão sistólica intraventricular, pressão diastólica final, primeira derivada temporal de pressão positiva (dP/dt máx) e negativa (dp/dt min).

3.4 Músculos Papilares Isolados

Após a mensuração dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram sacrificados, tendo o coração removido e rapidamente perfundido através do coto aórtico com solução nutritora, para permitir adequada dissecação dos músculos papilares da parede anterior e posterior do ventrículo esquerdo (VE). Os músculos papilares foram removidos e fixados por argolas. Estas argolas eram presas em uma haste fixa e outra ligada a um transdutor de força, dentro de câmaras de vidro com volume de 20ml contendo solução de *Krebs-Henseleit* gaseificada com uma mistura carbogênica (5% de O₂ e 95% CO₂), sob temperatura de 27 C° ±2 .

As preparações foram estimuladas por meio de eletrodos de platina, colocados paralelamente ao comprimento do músculo, nos quais foram utilizados pulsos retangulares com intensidade 1,5 vezes o limiar e de 12 ms de duração. A frequência de estimulação padrão foi de 0,5Hz (condição – estabilizada). A força desenvolvida foi medida através de transdutor de força isométrica (TSD125 – Biopac Systems, Inc; CA) acoplado a um amplificador (DA100C Biopac Systems, Inc; CA) com taxa de amostragem de 500 amostras / segundo. A força de contração isométrica desenvolvida foi corrigida pelo peso dos músculos. Uma vez realizado o estiramento muscular para obtenção de contrações isométricas máximas (L_{max}) e estabilização das preparações por aproximadamente 60 minutos, iniciou-se os protocolos experimentais

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Força de contração isométrica e parâmetros temporais

A força isométrica e os parâmetros temporais (TA – tempo de ativação; TR – tempo de relaxamento) desenvolvidos pelos músculos papilares e tiras de ventrículo direito dos animais dos grupos Veículo e Ouabaína foram mensurados após 60 minutos de estabilização.

Os resultados de força isométrica estão expressos em gramas por miligramas de peso de músculo. O tempo de ativação corresponde ao tempo gasto do início da contração até o pico máximo de força e, o tempo de relaxamento é o tempo gasto do pico máximo até o período de relaxamento isométrico.

3.5.2 Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos

Para a realização deste protocolo, foram feitas pausas de 15, 30 e 60 segundos, obtidas através da cessação do estímulo elétrico. A razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração antes da pausa foi considerada como potenciação relativa. Através deste protocolo, avaliamos a atividade do retículo sarcoplasmático (RS) (Leite *et al.*, 1991) nos músculos papilares dos animais do grupo Veículo e Ouabaína.

3.5.3 Variação da frequência de estimulação elétrica

Após um período de estabilização de 5 minutos, eram realizadas alterações na frequência de estimulação (0,1; 0,2; 0,5; 0,75 e 1Hz) e mensuradas as forças isométricas desenvolvidas pelos músculos papilares após estabilização em cada frequência.

3.5.4 Força desenvolvida após repouso de 10 minutos

Com a finalidade de avaliar uma possível interferência do tratamento crônico com ouabaína no influxo de cálcio transsarcolemal, foi utilizada uma solução nutritora de *Krebs-Henseleit* livre de cálcio (“Ca⁺⁺ free”), acrescida de 10mM de cafeína, objetivando depletar o conteúdo de cálcio intracelular e do retículo sarcoplasmático (RS). A concentração de cafeína utilizada mantém os canais de rianodina abertos, favorecendo a depleção de cálcio presente no retículo sarcoplasmático (Leite, ET. AL 1995) e a ausência de cálcio na solução nutritora propicia a extrusão deste íon para o meio extracelular.

Os músculos foram lavados, por três vezes, com a solução de Ca⁺⁺ free até as contrações serem suprimidas (Ringer, 1883). Após as lavadas, o estímulo elétrico foi desligado por 10 minutos. Segundos antes de a estimulação ser restaurada, as preparações foram reperfundidas com solução nutritora de *Krebs-Henseleit* na condição padrão previamente descrita.

A avaliação foi feita considerando-se a razão entre a amplitude da primeira contração após a pausa de 10 minutos e a amplitude da contração estabilizada anterior à pausa.

3.5.5 Avaliação da resposta β-adrenérgica

Para analisar a influência do tratamento crônico com ouabaína sobre a resposta β-adrenérgica no músculo cardíaco, foi utilizado isoproterenol (10⁻⁴M), um agonista de receptores β-adrenérgicos. O protocolo foi realizado utilizando uma solução nutritora de *Krebs-Henseleit*, com concentração de cálcio 0,62mM, pois preparações de músculos isolados de ratos demonstram melhores repostas inotrópicas positivas quando submetidas a baixas concentrações extracelulares de cálcio (Vassallo *et.al*,1994).

A avaliação da resposta β-adrenérgica foi calculada como a razão entre a amplitude máxima na força de contração, na presença do isoproterenol, e a amplitude da contração estabilizada anterior à adição do antagonista. Os dados

foram expressos como porcentagem de contração em relação à contração estabilizada.

3.5.6 Força desenvolvida durante as contrações tetânicas

O músculo cardíaco, ao contrário do esquelético, não desenvolve tétano em condições fisiológicas. Entretanto, sob condições especiais, as contrações tetânicas podem ser desenvolvidas no miocárdio de ratos e de outras espécies (Henderson *et al.*,1971). Para produzir tal fenômeno, devem ser aplicados estímulos elétricos de alta frequência, numa preparação de miocárdio, onde a atividade de captação da bomba de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático é inibida.

Os músculos papilares foram expostos a uma solução nutritora *Krebs Henseleit* contendo 5mM de cafeína, durante 30 minutos, e as contrações tetânicas foram obtidas pela estimulação elétrica, numa frequência de 10 Hz, com duração de 15 segundos, como descrita previamente (Leite *et al.*,1995). Para avaliação das contrações foram mensuradas as forças desenvolvidas no pico e no platô das contrações.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Extração da Na⁺-K⁺ ATPase

As amostras contendo a fração enzimática da Na⁺-K⁺ ATPase foram obtidas como previamente descrito por Velema e Zaagsma (1981), com algumas modificações. Cada ventrículo foi homogeneizado em 4 ml de solução Tris-HCl 20mM e EDTA 1mM (pH7,0), usando um homogeneizador de tecidos, por 4 períodos de 7 segundos com intervalos de 15 segundos de descanso. O homogeneizado foi centrifugado a 8.800 rpm por 20 minutos e o precipitado descartado. Ao sobrenadante resultante da centrifugação, foi acrescentado volume equivalente de solução Tris-HCl 20mM e EDTA 1mM (pH7,0) e em seguida foi centrifugado a 10.000 rpm, por 1 hora. Após a centrifugação, o precipitado era ressuspenso na mesma solução de Tris-HCl 20mM e EDTA 1mM (pH7,0), em um volume que proporcionasse uma quantidade de 0,5 mg/ml de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.6.2 Determinação da atividade da Na⁺-K⁺ ATPase

A atividade da Na⁺-K⁺ ATPase foi determinada pela diferença da hidrólise de 3mM ATP entre o meio contendo MgCl₂ 3mM, NaCl 125mM, KCl 20mM e Tris-HCl 50mM pH 7,5 e um meio idêntico acrescido de ouabaína, na concentração final de 5mM. Podendo assim definir como atividade da Na⁺-K⁺ ATPase, aquela porção da atividade ATPásica total inibida pela ouabaína. As frações contendo de 10 a 50 µg de proteína eram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C e a reação iniciada pela adição de ATP. O tempo de reação foi de 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição do ácido tricloroacético 10% e o fosfato liberado foi determinado pelo método descrito por Chan et. al., (1986). A atividade foi expressa como nmol de Pi liberado por minuto por mg de proteína (nmol/Pi/min/mg).

3.6.3 Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot

3.5.3.1 Extração e quantificação protéica do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), fosfolambam (PBL), receptor de angiotensina II AT_1 e Na^+/K^+ ATPase.

As amostras coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -20°C , até o momento da extração protéica. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos ventrículos esquerdos em tampão de homogeneização (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 5 mM; SDS 1% p/v; NaF 10 mM; PMSF 1 mM; NaVO_3 1mM; DTT 0.5 mM; Coquetel inibidor de protease contendo AEBSF, Aprotin, Bestatin, E-64, Leupeptin na proporção de 1:100) em temperatura fria (4°C). Após a homogeneização do tecido, esta mistura foi acondicionada em tubos eppendorfs e centrifugada a 11000 RPM por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então separado e o “pellet” desprezado. Foi feito uma diluição da amostra (1:200) para quantificação total da proteína pelo método de Bradford e em seguida, foram feitas alíquotas de 50 e 100 μg de proteína, e estas foram mantidas à -20°C até o momento da realização do ensaio.

3.5.3.2 Eletroforese e transferência das amostras

Para a realização do Western blot, as amostras foram adicionadas em um tampão de carregamento de amostras (Laemmli 2X buffer) contendo Ureia 0.5 mM; SDS 0.17 mM; DTT 39 μM ; Tris-HCl 0.01 M pH 8,0, em uma proporção de 1:1 (Laemmli 2X buffer) e aquecidas à 95°C por 4 minutos. Em seguida foram carregados os géis de SDS-poliacrilamida, 7.5% e 15 %, imersos em um tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %) e submetidos a uma amperagem de 80 V por 2 horas. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas do gel para uma

membrana de nitrocelulose (Amersham, UK) em um tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% e SDS 0.1 %) à temperatura ambiente, usando 25 V em um Semi-dry (Bio-Rad). Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por duas horas, em uma solução bloqueadora de leite desnatado diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5).

Os anticorpos primários utilizados foram: Serca2a (1:500) monoclonal (Affinity Bioreagents), Fosfolamban (2µg/ml) monoclonal (Affinity Bioreagents), trocador sódio cálcio (1:200) monoclonal (ABCAM), receptor AT₁ (1:500) monoclonal (Santa Cruz), isoforma α₁ Na⁺/K⁺ ATPase (1:1000) monoclonal (Upstated), isoforma α₂ Na⁺/K⁺ ATPase (1:1000) monoclonal (Upstated) e GAPDH (ABCAM) monoclonal (1:5000), diluídos em uma solução de BSA diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5) e incubados overnight a 4 °C.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as membranas eram lavadas por 30 minutos com uma solução TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5), para remoção dos anticorpos primários. Os anticorpos secundários foram anti-*mouse* monoclonal IgG, (1:5000, Stressgen, Victoria, Canada), incubados por uma hora em uma solução de leite desnatado diluído a 5% em um tampão TBS – T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5) .

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos, para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a mesma solução sem tween 20. As bandas foram detectadas utilizando um composto fluorescente (ECL plus, Amersham, UK) e expostas a um filme de raio-X (Hyper film, Amersham UK), o qual era revelado. As proteínas pesquisadas foram corrigidas pela quantidade de GAPDH detectado.

IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste *t-Student* não-pareado para as análises de todos os parâmetros hemodinâmicos e análises bioquímicas obtidas dos animais controle e tratados com ouabaína. Para os resultados da preparação de músculo isolado, foi utilizada a ANOVA 2 vias com *post-hoc* Bonferroni, para analisar a força desenvolvida sob a variação de freqüência, e o teste *t-Student* não pareado foi utilizado nos demais protocolos.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism System (versão 5.0, San Diego, CA, USA).

V. FÁRMACOS E REAGENTES

Ácido clorídrico – HCl (Merck)

Ácido Tricloroacético (Merck)

Albumina, Soro Bovina (Sigma)

Álcool Polivinílico (Merck)

Bicarbonato de sódio – NaHCO₃ (Vetec)

Cafeína (B.Herzog)

Cloreto de Cálcio dihidratado – CaCl₂.2H₂O (Merck)

Cloreto de Magnésio hexahidratado – MgCl₂.6H₂O (Merck)

Cloreto de Potássio – KCl (Merck)

Cloreto de Sódio – NaCl (Vetec)

EDTA (Sigma)

EGTA (Sigma)

Fosfato de Sódio monobásico – NaH₂PO₄ (Merck)

Glicerol (Reagen)

Glicose (Vetec)

Heparina sódica (Roche)

HEPES (Sigma)

Hidróxido de Sódio (Merck)

Fosfato de potássio di básico – KH₂PO₄ (Merck)

L-Isoproterenol (Sigma)

Molibdato de amônio (Nuclear)

Ouabaína, octahidratado (Sigma)

Óleo de soja (Lisa)

Sulfato de sódio – Na₂SO₄ (Merck)

Tris-HCl (Sigma)

Uretana sódica (Sigma)

O fármaco isoproterenol foi dissolvido em água destilada e armazenado à -20°C. O fármaco ouabaína foi dissolvido em óleo de soja e armazenado à -20°C.

VI. RESULTADOS

6.1 Medidas Hemodinâmicas:

O tratamento por 15 dias com ouabaína foi capaz de promover aumento da pressão arterial sistólica (PAS), da pressão arterial diastólica (PAD) e da pressão arterial média (PAM). Além disso, o tratamento promoveu aumento da pressão sistólica intraventricular esquerda (PSVE), aumento da primeira derivada temporal de pressão positiva (dP/dt Max) e negativa (dP/dt min), porem não alterou a pressão diastólica final esquerda (PdfVE) quando comparados com os animais tratados com o veículo (tabela 1). A frequência cardíaca (FC) também se apresentou elevada nos animais tratados cronicamente com ouabaína (tabela 1), no entanto, este aumento ocorreu dentro da faixa fisiológica.

Tabela 1: Valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), primeira derivada temporal de pressão positiva (dP/dt Max) e negativa (dP/dt min), pressão sistólica intraventricular esquerda (PSVE) e pressão diastólica final esquerda (PdfVE) de ratos tratados com ouabaína e de ratos tratados com veículo, obtidos através de experimentos "in vivo".

PARÂMETROS	ANIMAIS VEÍCULO	ANIMAIS OUABAÍNA
PAS (mmHg)	99,9 ± 3 (n=15)	116,4 ± 3* (n=16)
PAD (mmHg)	59,9 ± 4 (n=15)	71,2 ± 3* (n=16)
PAM (mmHg)	70,4 ± 5 (n=15)	89,3 ± 4* (n=16)
FC (bpm)	313 ± 15 (n=15)	352 ± 11* (n=16)
dP/dt Max	5639,2 ± 315,1 (n=14)	6657,3 ± 352,1* (n=15)
dP/dt min	-5184,3 ± 252,5 (n =14)	-6508,2 ± 307,8* (n=16)
PSVE (mmHg)	118,8 ± 3,9 (n=13)	130,9 ± 4,2* (n=15)
PdfVE (mmHg)	4,5 ± 0,2 (n=14)	5,2 ± 0,4 (n=16)

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

6.2 Estudo da contração Miocárdica do Ventrículo Esquerdo (VE)

As alterações da contratilidade miocárdica foram avaliadas através da análise da força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares do ventrículo esquerdo dos ratos submetidos ao tratamento com ouabaína.

6.2.1 Análise da Força Isométrica

A capacidade funcional do músculo cardíaco foi avaliada através da força isométrica. A amplitude máxima desenvolvida pelos músculos papilares do VE de animais veículos e tratados com ouabaína está mostrada na figura 3. Nos animais tratados com ouabaína, a força isométrica foi menor dos que nos ratos que receberam somente o veículo.

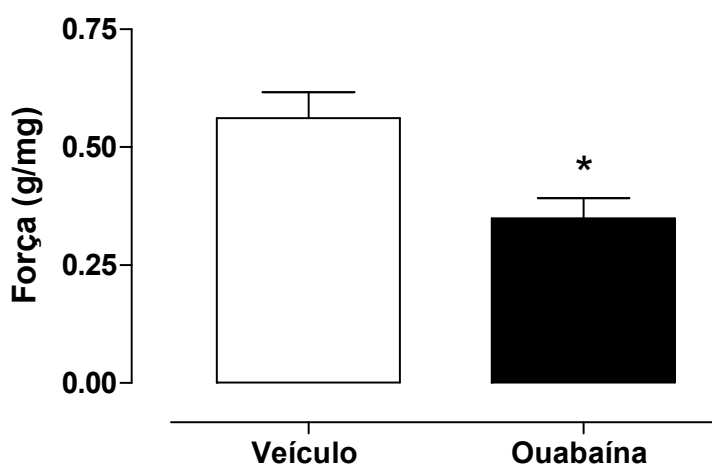


Figura 3 : Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de ratos. Os dados são apresentados como média \pm EPM n= número de papilares; (veículo: 0,56 \pm 0,055 n=17) e (ouabaína:0,35 \pm 0,043 n=12) (*) $p < 0,05$. Teste *t-Student*

Em relação aos parâmetros temporais, o tratamento com ouabaína não foi capaz de alterar o tempo de ativação e o tempo de relaxamento dos músculos papilares (Figura 4).

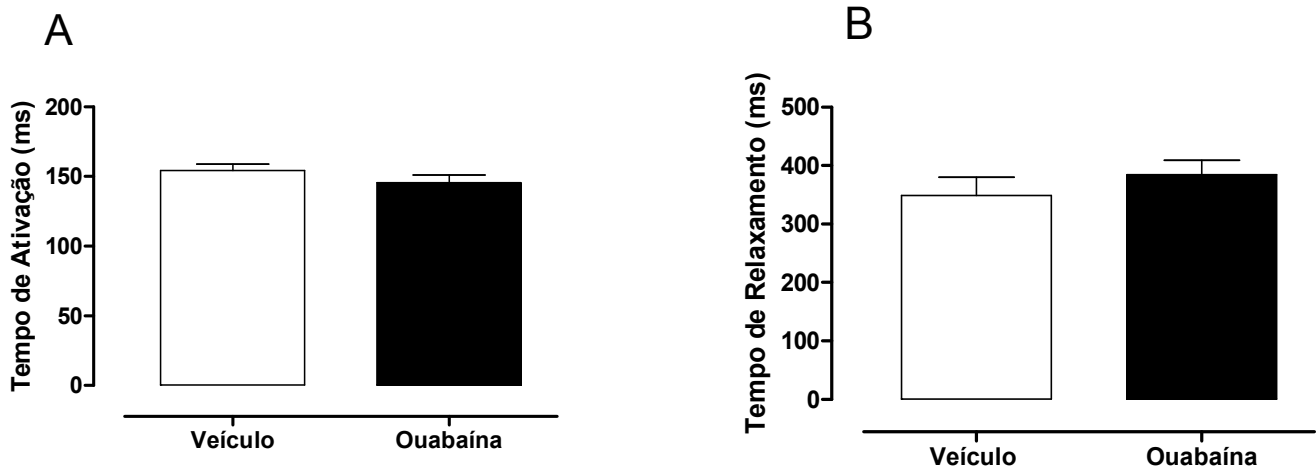


Figura 4: Parâmetros Temporais em músculos papilares de VE de ratos. A- Tempo de Ativação; B- Tempo de Relaxamento. n= número de papilares, veículo n= 12 e ouabaína n=9. Dados expressos em média \pm EPM. Teste *t-Sudent* $p > 0,05$

6.2.3 Análise da Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos

A figura 5 ilustra as potenciações pós pausas (PPP), utilizadas para avaliar um possível efeito do tratamento com ouabaína sobre a atividade do retículo sarcoplasmático (RS). O tratamento com ouabaína durante 15 dias não alterou o funcionamento do RS, uma vez que os valores de PPP de 15, 30 e 60 segundos dos músculos papilares dos ratos tratados com ouabaína foram semelhantes em relação aos músculos papilares dos ratos que receberam o veículo.

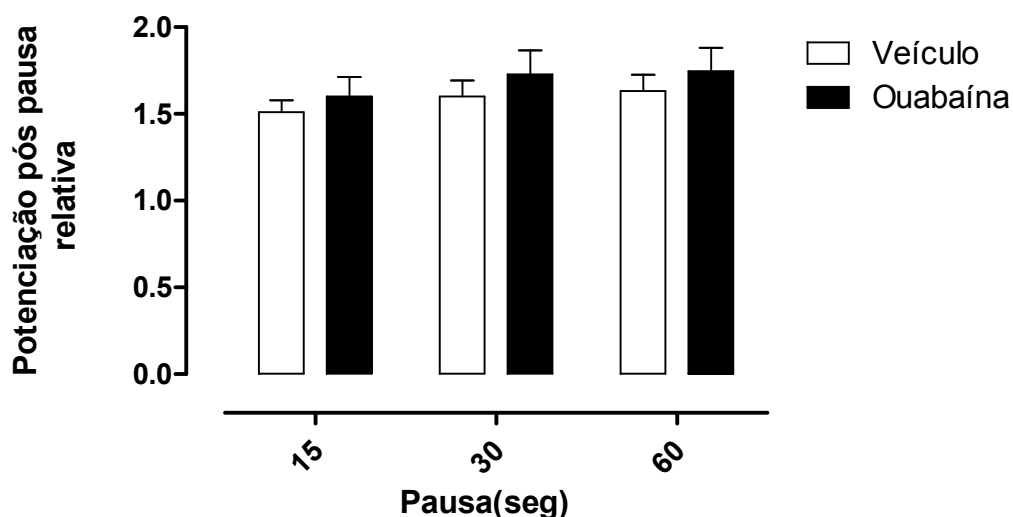


Figura 5: Efeito do tratamento com ouabaína na potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos. n= número de papilares, veículo (n= 11) e ouabaína (n=6). Dados expressos em Média ±EPM Teste *t-Sudent* . p>0,05.

6.2.4 Avaliação da frequência de estimulação

Como já era esperado para o miocárdio de rato, o aumento da frequência de estimulação elétrica reduziu a força de contração dos músculos papilares dos ratos que foram tratados com ouabaína e do grupo que foi utilizado o veículo. Entretanto, como mostrado na figura 6, o tratamento com ouabaína não alterou a magnitude da redução da força em relação aos músculos dos ratos tratados com o veículo.

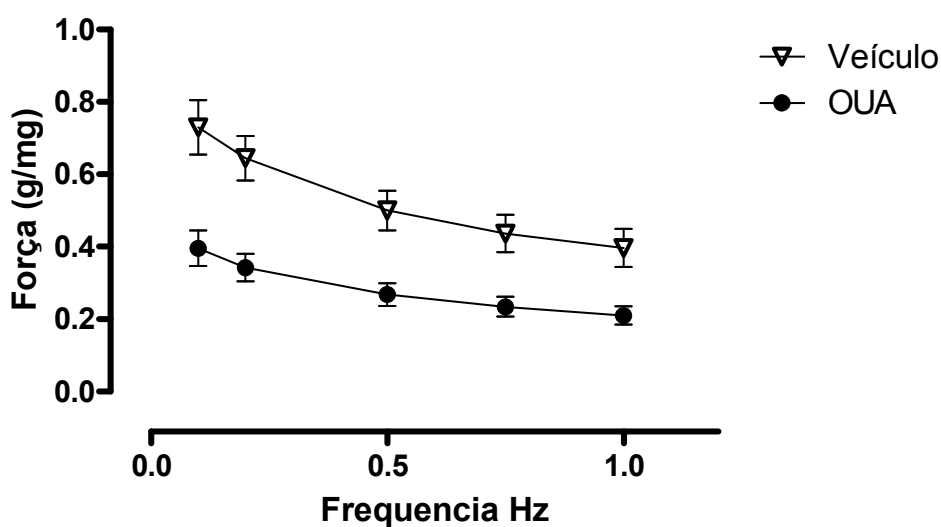


Figura 6: Força desenvolvida em diferentes frequências de estimulação elétrica, por músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos. n= número de papilares, veículo (n=9) e ouabaína (n=5). Os dados estão expressos em Média \pm EPM. $p > 0,05$. ANOVA duas vias

6.2.5 Avaliação da força desenvolvida após repouso de 10 minutos

Essa manobra experimental foi realizada a fim de avaliar o efeito do tratamento com ouabaína sobre a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio. A figura 7 retrata que a permeabilidade a esse íon não foi danificada pelo tratamento.

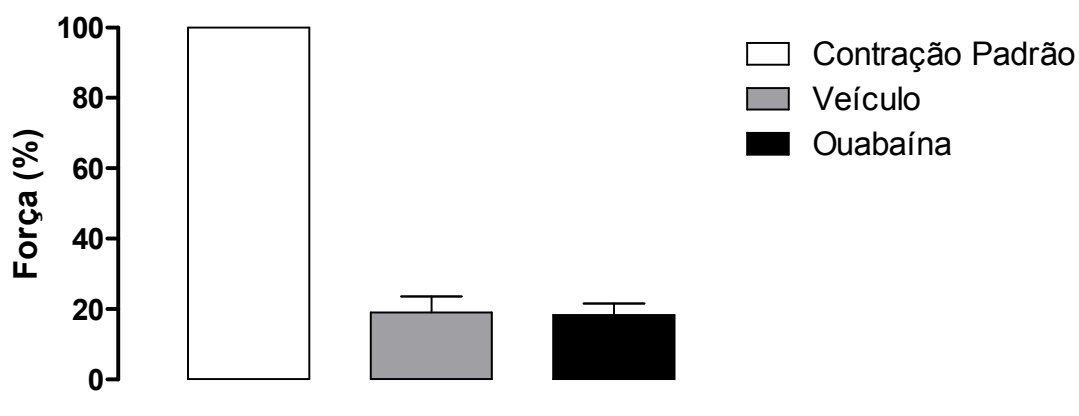


Figura 7: A avaliação indireta dos efeitos do tratamento com ouabaína no influxo de cálcio transsarcolemal mensurada pela contrações obtidas após repouso de 10 minutos. Os dados estão expressos em Média \pm EPM Teste *t-Student* entre o veículo (n=5) e ouabaína (n=8) $p > 0,05$. n= número de papilares

6.2.6 Avaliação da resposta inotrópica à estimulação β adrenérgica

A figura 8 mostra a intervenção inotrópica produzida por uma dose de isoproterenol. Como esperado, esta interferência promoveu um aumento da força de contração, tanto no grupo que recebeu o veículo como o grupo que recebeu o tratamento com ouabaína. Entretanto, o inotropismo promovido por esta manobra foi igual em ambos os grupos.

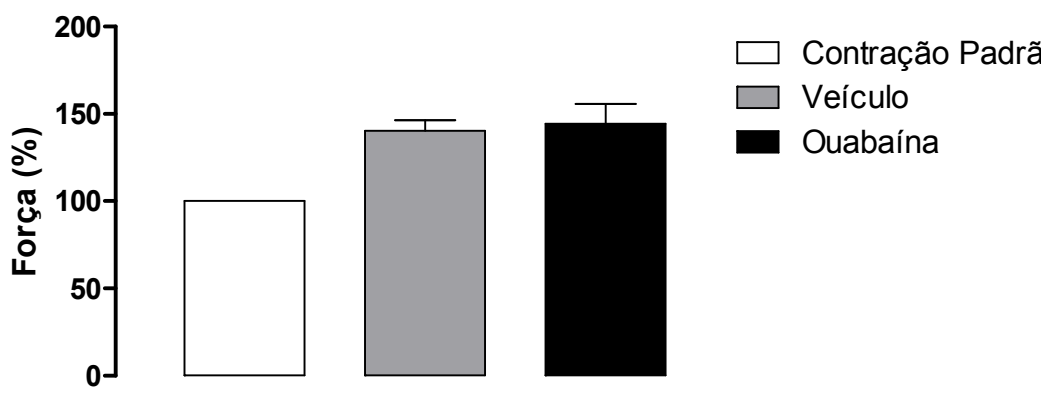


Figura 8: Efeito do tratamento com ouabaína na intervenção inotrópica promovida pelo isoproterenol 10^{-4} M. Os dados estão expressos em Média \pm EPM. Teste *t-Student* entre Veículo (n=8); ouabaína (n=7). $p > 0,05$. n= número de papilares

6.2.7 Avaliação das Contrações Tetânicas

Como visto anteriormente, o tratamento com ouabaína reduziu a atividade contrátil do ventrículo esquerdo de ratos. Este efeito pode resultar em alterações da maquinaria contrátil. Com o intuito de responder esta questão, as proteínas contráteis foram indiretamente avaliadas através das contrações tetânicas.

A figura 9 apresenta os valores de contração tetânica no pico da contração (9A) e no platô (9B) das contrações obtidas em músculos de papilares do VE de ratos tratados com ouabaína e seu veículo. Avaliando o pico e o platô da força tetânica não foram encontradas alterações significantes.

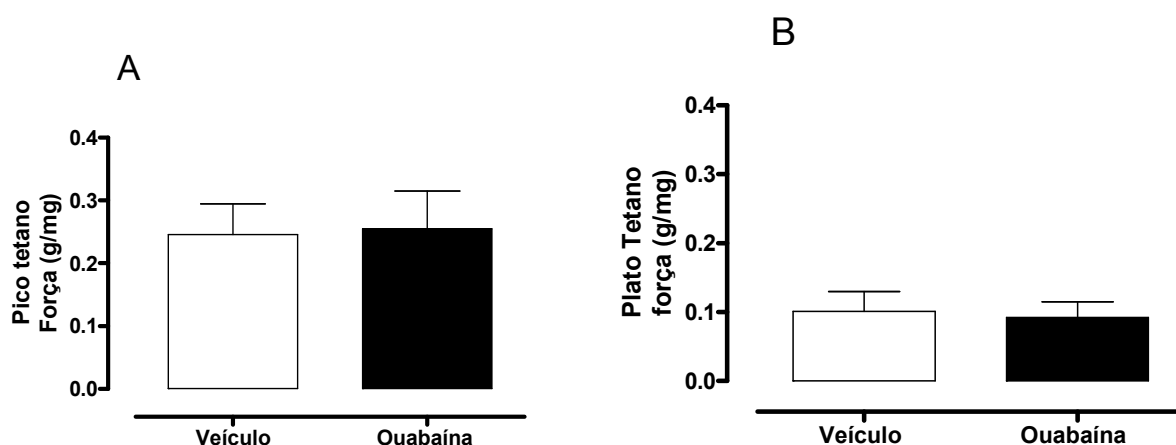


Figura 9: Efeitos do tratamento crônico com ouabaína por 15 dias sobre as contrações tetânicas. A- pico de força; B - platô de força. Os dados estão expressos em Média ± EPM. Teste *t-Student* entre o veículo (n=7) vs ouabaína (n=6). $p > 0,05$. n= número de papilares

6.3 Medidas Bioquímicas

6.3.1 Avaliação da atividade da Na⁺-K⁺ ATPase

Na figura 10 apresentamos o efeito do tratamento com ouabaína sobre a atividade da Na⁺-K⁺ ATPase. O tratamento aumentou a atividade da bomba de sódio quando comparado com os animais veículos.

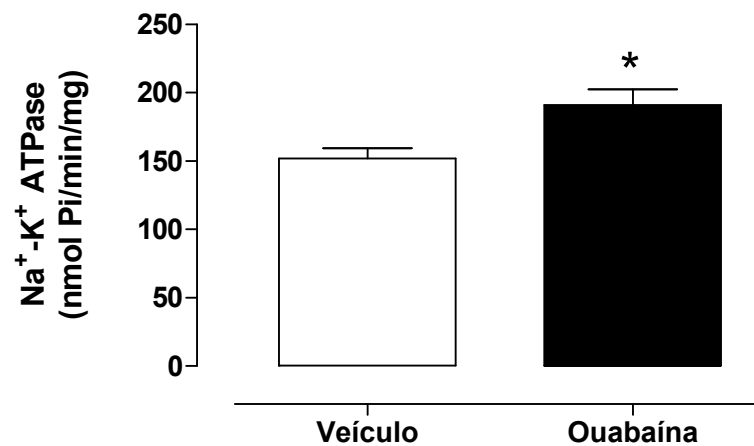


Figura 10: Efeito do tratamento com ouabaína sobre atividade da bomba de sódio de VE de ratos. Os dados foram apresentados como Média ± EPM (veículo: 151,85 ± 7,60 n= 7) vs (ouabaína: 191,03 ± 11,41 n=7). *p<0,05 Test *t-Sudent*. n= número de VE

6.3.2 Expressão protéica do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) , da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), do fosfolambam (PBL), do receptor de angiotensina II AT_1 e das isoformas α_1 e α_2 Na^+/K^+ ATPase

Como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ é uma proteína importante na contratilidade do músculo cardíaco, investigamos se o tratamento com ouabaína, durante 15 dias, foi capaz de produzir alteração na sua expressão. Como observado na Figura 11, ocorreu uma diminuição na expressão protéica do NCX nos ventrículos esquerdos dos ratos tratados com ouabaína quando comparada com os ratos tratados com o veículo.

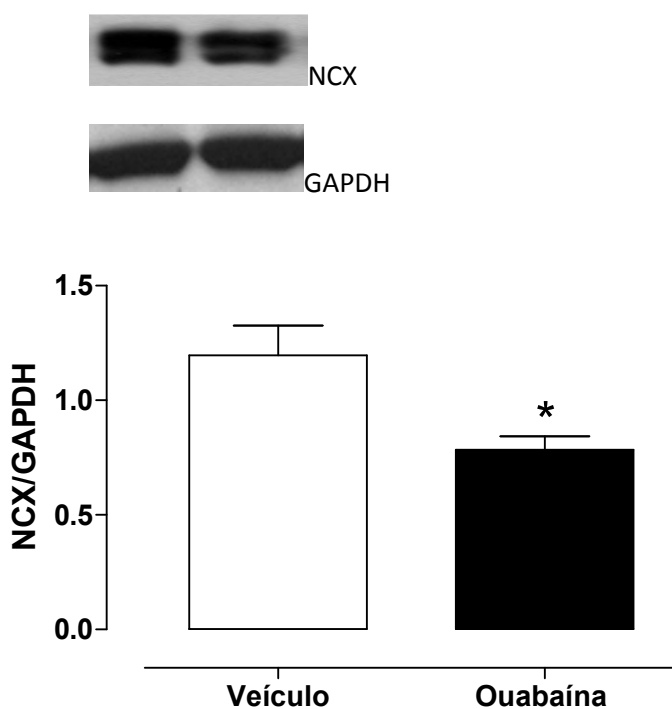


Figura 11: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) em ventrículos esquerdos de ratos de ambos os grupos. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como expressão do $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) em relação a GAPDH. n= número de amostras (veículo: 1,96 \pm 0,13 n=6) vs (ouabaína: 0,78 \pm 0,06 n=6) * p < 0,05 . Teste *t-Student*. n= número de VE

Visto que a expressão do NCX está reduzida e que o pico de contração isométrica está menor nos ratos tratados com ouabaína, tornou-se necessário uma análise da expressão das isoformas α_1 e α_2 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase. Como apresentado na figura 12, a expressão da isoforma α_1 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase está reduzida nos ventrículos esquerdo de ratos tratados com ouabaína quando comparado com o grupo veículo (Figura 12 A). Entretanto a expressão da isoforma α_2 está inalterada em ambos os grupos (Figura 12 B).

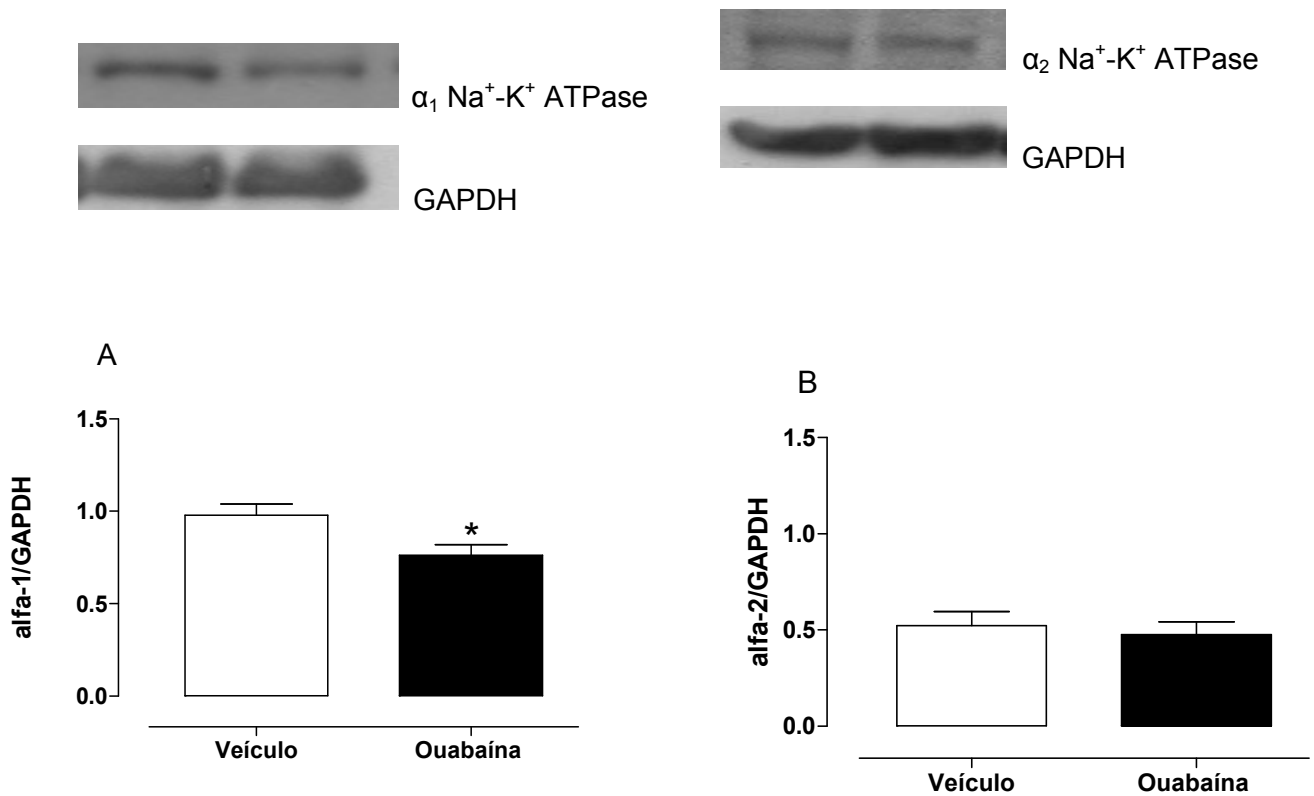


Figura 12: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica das isoformas α_1 (A) e α_2 (B) $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase. Os resultados (Média \pm EPM) estão mostrados como expressão α_1 e α_2 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase em relação a GAPDH. * $p < 0,05$ (veículo: $0,98 \pm 0,06$ $n=7$) vs (ouabaína: $0,76 \pm 0,06$ $n=10$). n = número VE

Quando investigamos a expressão da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e do fosfolambam (PBL), o tratamento com ouabaína por 15 dias não foi capaz de promover alterações nas expressões protéicas de ambas proteínas, como ilustrado na figura 13.

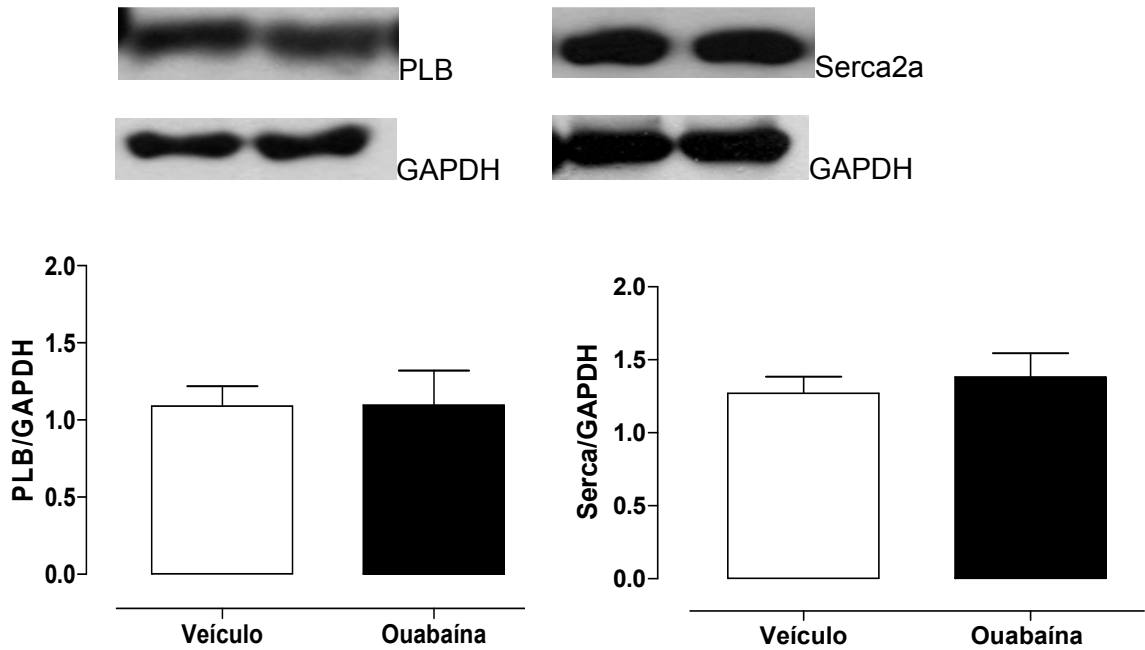


Figura 13: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e fosfolambam (PBL). Os resultados (Média \pm EPM) estão mostrados como expressão das PBL e SERCA em relação a GAPDH. $p > 0,05$, teste *t-Student*, $n =$ número de VE

Como a hipertensão induzida pela ouabaína é em parte dependente do sistema renina-angiotensina aldosterona (Zhang *et.al*, 2001), resolvemos investigar a expressão do receptor AT₁ para angiotensina II, nos ventrículos esquerdos dos ratos tratados com ouabaína por 15 dias. Foi observada uma redução da expressão protéica do receptor AT₁ no grupo ouabaína quando comparado com o grupo veículo.

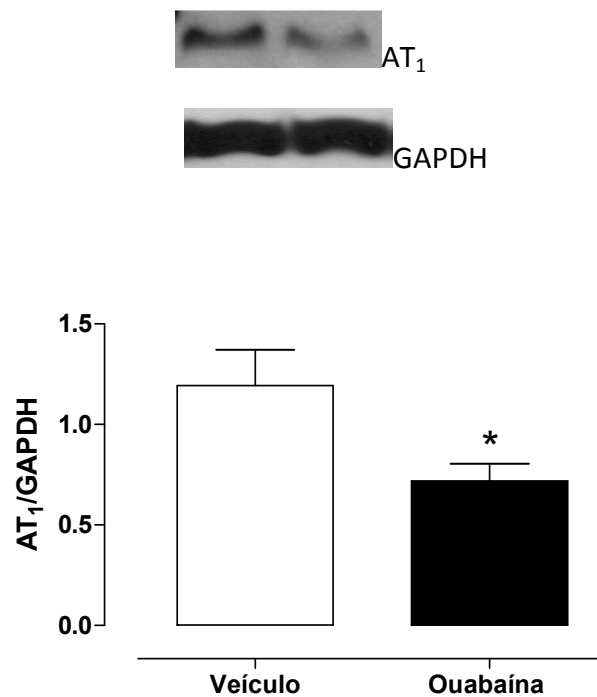


Figura 14: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica de receptor AT₁ em ventrículos esquerdos de ratos tratados por 15 dias com ouabaína vs veículo. Os resultados (Média ± EPM) estão apresentados como expressão do AT₁ em relação a GAPDH. (veículo: 1,19 ± 0,18 n=7) vs (ouabaína: 0,72 ± 0,08) *p<0,05. n= número de VE

VII Discussão

Os dados obtidos nesse estudo demonstram que o tratamento crônico com ouabaína por 15 dias, na dose de 25µg/kg/dia IM, é capaz de aumentar a pressão arterial de ratos Wistar. Estudos do nosso grupo e de outros pesquisadores demonstram que o tratamento crônico com ouabaína durante 5 semanas, na mesma dose, promove aumento da pressão arterial de ratos normotensos além de produzir efeito inotrópico positivo (Padilha *et.al*, 2008a; Rossoni *et. al.*, 2006). Entretanto, o estudo do tratamento crônico com ouabaína por 15 dias, na concentração de 25µg/kg/dia, que produz uma concentração plasmática próxima àquela encontrada em pacientes hipertensos, sobre a contratilidade cardíaca ainda não foi esclarecido. Sendo assim foram desenvolvidos alguns protocolos experimentais para investigar esses efeitos sobre o músculo cardíaco de ratos tratados durante 15 dias com ouabaína.

7.1 Efeitos do tratamento crônico com ouabaína durante 15 dias na dose de 25µg/kg/dia sobre os parâmetros hemodinâmicos

Trabalhos mostram que níveis de ouabaína endógena se encontram elevada em pacientes com hipertensão essencial, e se correlaciona com a pressão arterial (Manunta *et. al*, 1999 ;2001; Rossi *et al*, 1995). Em animais, a administração desse composto por períodos prolongados é capaz de produzir hipertensão (Blaustein *et al*,2009 ; Rossoni *et al*, 2006 ; Padilha *et.al*, 2008).

A propriedade da ouabaína em induzir a hipertensão está associada à inibição da bomba de sódio em diversos tecidos, incluindo o músculo liso vascular, proporcionando o acúmulo de sódio intracelular e conseqüente aumento da concentração de cálcio mioplasmático por redução da atividade do trocador sódio/cálcio (Marin *et al*,1988 ; Manunta *et al*,2009). Essa elevação do cálcio mioplasmático promove aumento da contratilidade do músculo liso vascular sendo responsável pelo aumento da resistência periférica. Além disso, a hipertensão induzida pela ouabaína está associada com ações no sistema nervoso central, aumentando atividade simpática por ativação do sistema renina-angiotensina central e prejuízo no reflexo barorreceptor (Huang and Leenen, 1999). Todos esses efeitos associados são favoráveis à manutenção e gênese da hipertensão induzida pela ouabaína (Rossoni *et.al*,2002; Manunta *et.al*,1994; Huang and Leenen, 1999).

Vários estudos demonstraram que o efeito pressor da ouabaína ocorre em altas concentrações (Ross Jr *et.al*, 1960; Marín *et.al*, 1988). Como a ouabaína plasmática encontra-se em baixa concentração, outro mecanismo foi proposto. Segundo Blaustein *et.al* (1998), existe uma microrregião na célula, denominada plasmerosoma, onde estão localizados o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e as isoformas α_2 e α_3 da bomba de sódio, as quais possuem uma maior afinidade pela ouabaína. Sendo assim, a ouabaína inibe a bomba de sódio nessa região promovendo um aumento local de cálcio, o qual é captado e armazenado pelo retículo sarcoplasmático. Quando ocorre o estímulo de um agonista alfa adrenérgico, por exemplo, a resposta resultante é amplificada em decorrência de uma maior liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.

Corroborando com estudo prévio do nosso laboratório, o tratamento com baixas doses de ouabaína por 15 dias, no presente trabalho, foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica e diastólica de ratos normotensos (Padilha *et.al*,2008). O tratamento também aumentou a frequência cardíaca, o que corrobora também com achados do nosso laboratório. Porém, esse aumento de frequência não foi observado em outros trabalhos com o tempo de tratamento superior a 15 dias (Rossoni *et.al*, 2006). Esta redução da frequência cardíaca pode estar relacionada a uma diminuição da atividade simpática, similar a que ocorre com a hipertensão resultante da desnervação sinoaórtica (Vassallo *et.al*, 1991). A atividade simpática pode ser dividida em duas fases: uma fase aguda, caracterizado por um aumento do tônus simpático e uma fase crônica caracterizado pela normalização do tônus simpático. Entretanto, a ouabaína aumenta o tônus simpático via ação central, porém produz respostas adaptativas, o que normalizaria a frequência em longo prazo, explicando assim um aumento da frequência cardíaca com 15 dias de tratamento com ouabaína e normalização com 30 dias (Padilha *et.al*, 2008a ; Huang and Leenen, 1999).

Quando analisada as derivadas temporais máximas, positiva e negativa, o tratamento com ouabaína foi capaz de produzir um aumento em ambas. Esse aumento reflete uma melhora do inotropismo cardíaco, que nesse caso, pode ter ocorrido por uma melhora da função da bomba cardíaca ou um aumento da atividade simpática. Esses achados corroboram com outros trabalhos, onde o tratamento crônico com ouabaína, além de promover um aumento das derivadas de temporais, produziu um aumento da atividade da ATPase miosínica, o que poderia contribuir para uma elevação da contratilidade cardíaca (Rossoni *et.al*, 2006; Padilha *et.al*, 2008a).

Outro achado do nosso estudo foi o aumento da pressão sistólica ventricular esquerda. A pressão sistólica ventricular esquerda pode ser modulada pelo aumento da atividade simpática. O presente estudo demonstrou um aumento da frequência cardíaca que indica indiretamente um aumento da atividade simpática nesses animais tratados com ouabaína. Corroborando esse raciocínio já existem trabalhos demonstrando que o tratamento com ouabaína

aumenta a simpatoexcitação e diminui a simpatoinibição em animais normotensos (Huang and Leenen, 1999).

7.2 Efeitos do tratamento crônico com ouabaína durante 15 dias na concentração de 25µg/kg/dia sobre músculo isolado

A elevação da pressão intraventricular e do inotropismo cardíaco, encontrados em nosso estudo *in vivo*, podem estar relacionados com o aumento da atividade simpática provocada pelo tratamento com ouabaína (Zhang and Leenen, 2001). Porém existe estudo sugestivo dos efeitos diretos do tratamento com ouabaína no inotropismo cardíaco (Rossoni *et.al*, 2006). Nosso estudo, com músculo papilar, procurou avaliar se o tratamento crônico com ouabaína por 15 dias, na dose de 25 µg/kg/dia, produz efeitos diretos na contratilidade miocárdica, ou se o efeito inotrópico positivo produzido pelo tratamento com ouabaína, visualizado pelo aumento da pressão sistólica intraventricular esquerda e da derivada temporal positiva, é resultado exclusivamente, de alterações na atividade simpática. Portanto, o uso de músculos papilares dissecados de ratos exclui a participação dos componentes neurais e hormonais na resposta do tratamento crônico com ouabaína por 15 dias.

O tratamento com ouabaína promoveu uma diminuição da força contrátil desenvolvida pelos músculos papilares de VE. Esse resultado foi observado pela análise do pico de força isométrica. Este efeito inotrópico negativo não corrobora com os achados hemodinâmicos, uma vez que, encontramos aumento da derivada temporal positiva indicando um inotropismo positivo, junto com aumento da pressão sistólica ventricular esquerda. Entretanto, trabalhos mostram que o tratamento crônico com ouabaína por 5 semanas aumenta a contratilidade do músculo cardíaco (Rossoni *et.al*, 2006), mostrando assim que o efeito do tratamento com ouabaína sobre a contratilidade é dependente do tempo. Inicialmente, a hipertensão induzida pelo tratamento crônico com ouabaína, está associada com ativação de mecanismos no sistema nervoso central, aumentando o tônus simpático. Em longo prazo, a hipertensão induzida pela ouabaína, promove adicionalmente um incremento da contratilidade cardíaca, o que contribui para instalação da hipertensão. Embora 5 semanas de tratamento promova aumento da contratilidade *in vivo* e *in vitro*, aos 15 dias não foi observado esse aumento *in vitro*. Isso demonstra que o início do

tratamento com ouabaína produz hipertensão arterial e que essa hipertensão não pode ser justificada por modificações da contratilidade cardíaca.

Procurando analisar os possíveis mecanismos envolvidos na redução de força contrátil dos músculos papilares, induzida pelo tratamento com ouabaína, avaliamos a cinética de contração e relaxamento do músculo cardíaco. Foram analisados os tempos de ativação e relaxamento da contração. O tempo de ativação refere-se à cinética de processos que aumentam a disponibilidade do cálcio ou interferem na sensibilidade dos miofilamentos a este íon. O tempo de relaxamento está atribuído a processos que retiram o cálcio da célula, sendo assim, esse tempo está relacionado à capacidade do retículo sarcoplasmático em captar cálcio, principalmente em ratos, sendo que essa organela é responsável por retirar a maior parte do cálcio mioplasmático durante o relaxamento (Bers, 2002). Portanto, qualquer intervenção que aumente a atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático reduz este tempo. Entretanto os nossos resultados não demonstraram alteração no tempo de ativação, inferindo assim que o tratamento com ouabaína não foi capaz de alterar a cinética ou a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio. Ao mesmo tempo, o tratamento com ouabaína também não foi capaz de alterar o tempo de relaxamento nos músculos papilares do ventrículo esquerdo.

Porém esses dados não corroboram com os dados obtidos *in vivo* (aumento das derivadas temporais positiva e negativa) reforçando que os efeitos do tratamento com ouabaína podem ser dependentes da ativação do sistema nervoso simpático.

Portanto, sugere-se que a redução da força contrátil dos músculos papilares provocado pelo tratamento com ouabaína não pode ser justificado por modificações na cinética do cálcio mioplasmático.

No miocárdio de rato, os efeitos inotrópicos positivo e negativo são geralmente, dependentes, da atividade do retículo sarcoplasmático. Sagawa *et.al* (2002), demonstraram que os glicosídeos cardíacos amplificam a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, por um mecanismo luminal de sensibilidade ao cálcio, promovendo o aumento de cálcio mioplasmático e melhorando a

contratilidade cardíaca. Trabalhos mais antigos também relatam que a ouabaína, sendo um digitálico, também possui essa capacidade de promover a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (McGarry and Williams, 1993). Entretanto, esses achados foram obtidos através de administração aguda de ouabaína com concentrações mais elevadas do que as utilizadas no nosso trabalho.

Sendo assim, uma manobra realizada para avaliar possíveis alterações na participação do retículo sarcoplasmático, na contração, depois do tratamento crônico com ouabaína, foi a potenciação após pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica. Sabe-se que os músculos cardíacos de mamíferos, após curto período de pausa, têm sua primeira contração potencializada (Vassallo & Mill, 1988; Leite *et.al*, 1991; Mill *et.al*, 1992). Nossos achados não revelaram alterações na potenciação da contração para todos os tempos de pausa. Este achado, associado à ausência de modificação do tempo de relaxamento da contração, propõe a inexistência de alterações no retículo sarcoplasmático. Esse dado corrobora com outros trabalhos, onde demonstraram que o tratamento com ouabaína não altera as vias envolvidas na corrente de cálcio através do retículo sarcoplasmático (Müller-Ehmsen *et.al*,2003 ; El-Armouche *et.al*,2004).

Como achamos que o tratamento com ouabaína produziu um estado inotrópico negativo, *in vitro*, investigamos se esse estado era mantido sob intervenções inotrópicas, como alteração na frequência de estimulação elétrica. O aumento da frequência de estimulação elétrica produziu em ambos os grupos uma queda da força de contração, como era esperado, já que no miocárdio de rato o aumento da frequência de estimulação reduz a força de contração. Sendo assim, nossos achados demonstram que o estado inotrópico negativo produzido pelo tratamento da ouabaína se manteve durante essa manobra.

Para avaliar se o estado inotrópico negativo *in vitro*, induzido pelo tratamento com ouabaína, estava relacionado com a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, decidimos então, pesquisar de forma indireta a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e a disponibilidade do cálcio para a contração

através da manobra de contrações tetânicas. Entretanto, o tratamento com ouabaína por 15 dias não foi capaz de alterar as contrações tetânicas, sugerindo assim que a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e a disponibilidade do cálcio para contração, através dos canais de cálcio voltagem dependentes, estão inalterados. Esses dados corroboram com o nosso achado sobre a avaliação indireta do influxo transsarcolemal de cálcio, mensurado através do protocolo da força desenvolvida após o repouso de 10 minutos, onde o tratamento com ouabaína não foi capaz de alterar o influxo de cálcio pelos canais de cálcio voltagem dependente.

Como a hipertensão induzida pela ouabaína produz um aumento do tônus simpático (Huang and Leenen, 1999) e autores também demonstram, que o tratamento crônico com ouabaína, aumenta a sensibilidade dos receptores beta adrenérgicos a agonistas, como o isoproterenol (El-Armouche *et.al*,2004), resolvemos então avaliar a resposta β adrenérgica do músculo cardíaco. Entretanto, a magnitude da resposta β adrenérgica foi similar em ambos os grupos. Esse dados corroboram com achados de El-Armouche *et.al* (2004), que demonstraram que o tratamento crônico com ouabaína não altera a densidade e nem o RNAm para os receptores beta adrenérgicos, sugerindo assim uma magnitude de resposta beta adrenérgica semelhante em ambos os grupos.

7.3 Medidas Bioquímicas

7.3.1 Efeito do tratamento com ouabaína na concentração de 25µg/kg/dia, por 15 dias sobre a atividade da Na⁺-K⁺ ATPase.

O tratamento crônico por 15 dias com ouabaína, na dose de 25µg/kg/dia, resultou no incremento da atividade da bomba de sódio. Este resultado explica, mesmo que parcialmente, o efeito inotrópico negativo observado em nossos experimentos. Uma vez que, o aumento da atividade da Na⁺-K⁺ ATPase produz uma diminuição da concentração de sódio intracelular, essa redução de sódio poderá promover um aumento da atividade do trocador sódio/ cálcio proporcionando uma maior extrusão de cálcio da célula e induzindo o efeito inotrópico negativo observado nos músculos papilares. Entretanto, a literatura relata que os digitálicos possuem a propriedade de aumentar a força de contração do músculo cardíaco por inibir a bomba de sódio, levando a um aumento do sódio intracelular e a um conseqüente aumento de cálcio intracelular, como resultado de alterações da atividade do trocador sódio/cálcio (Altamirano *et.al*, 2006). Porém, essa inibição é observada em concentrações micromolar ou milimolar de ouabaína. Contudo, Gao *et.al* (2002) demonstraram, através da técnica de patch-clamp, um aumento da atividade da bomba de sódio em miócitos isolados expostos a concentrações nanomolares de ouabaína, corroborando assim com nossos achados de aumento da atividade da Na⁺-K⁺ ATPase.

Corroborando com esses achados, Blood (1975) também relata o aumento da atividade da bomba de sódio promovida por baixas concentrações de ouabaína. Porém, no nosso estudo, utilizamos um tratamento com doses muito baixas de ouabaína, o que pode levar a concentrações nanomolares no plasma e, essa baixa concentração pode aumentar a atividade da bomba de sódio ao invés de inibir, como demonstrado por Gao *et.al* (2002).

Trabalho do nosso laboratório, utilizando a técnica de relaxamento induzido pelo potássio, em leito vascular caudal de ratos hipertensos, também mostra

que a ouabaína, em concentrações nanomolares, aumenta a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase (Padilha et al, 2004). Também demonstramos aumento na atividade funcional da bomba de sódio, em leito vascular caudal de ratos, onde a hipertensão foi induzida pelo tratamento crônico com ouabaína por 15 dias (Batista, 2009).

Além da ação direta da ouabaína, também podemos sugerir uma ação da angiotensina II aumentando a atividade da bomba de sódio, uma vez que, a ouabaína ativa o sistema renina-angiotensina, promovendo um aumento de angiotensina II, resultando assim em um aumento do tônus simpático (Huang and Leenen, 1999). Trabalhos demonstram que a angiotensina II aumenta a atividade da bomba de sódio localizada no túbulo proximal, onde esse aumento foi atribuído, pelo menos em parte, por fosforilação da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase pela ativação da PKC (Yingst *et.al*, 2008). Sendo assim, podemos propor que o aumento da atividade da bomba de sódio encontrado no nosso estudo, pode ser devido a uma estimulação direta da ouabaína sobre a bomba de sódio e/ou indireta, através do aumento da produção de angiotensina II, via ativação do sistema renina-angiotensina.

7.3.2 Efeito do tratamento com ouabaína na concentração de 25µg/kg/dia, por 15 dias sobre as expressões protéicas do trocador sódio/cálcio, fosfolambam, cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), receptor AT₁ e as isoformas α₁ e α₂ da Na⁺-K⁺ ATPase.

Devido ao aumento da atividade da bomba de sódio e o efeito inotrópico negativo encontrado em nosso estudo, propusemos pesquisar a expressão protéica do trocador sódio/ cálcio, uma vez que, sua expressão está diretamente ligada ao estado contrátil da célula muscular. Em nosso estudo, demonstramos uma diminuição da expressão do trocador sódio/cálcio em ventrículos esquerdos de ratos tratados com ouabaína. Sabendo que o trocador sódio/cálcio participa na modulação do estado contrátil do músculo cardíaco, esse dado esclarece, pelo menos em parte, o efeito inotrópico negativo observado nos músculos papilares de ventrículo esquerdo dos ratos tratados com ouabaína.

O trocador sódio/cálcio utiliza o gradiente eletroquímico do íon sódio para mediar o co-transporte de três íons sódio por um íon cálcio através da membrana sarcolemal, desenvolvendo um importante papel na homeostase do cálcio, regulando assim a contração e o relaxamento da célula muscular cardíaca (Reuter *et.al*, 2005). A literatura é muito contraditória a respeito da expressão protéica do trocador sódio/cálcio relacionado à força de contração. Trabalhos demonstram um efeito inotrópico positivo em camundongos transgênicos com diminuição da expressão do trocador (Baümer *et.al*, 1998) e, atribuído a essa redução da expressão, alguns pesquisadores demonstram um aumento da quantidade de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático, o que poderia explicar o efeito inotrópico positivo observado nesses estudos (Zhang *et.al*, 2001). Já outros trabalhos observaram uma depressão na função contrátil em miócitos com diminuição da expressão do trocador sódio/cálcio (Schillinger *et.al*,2000; Mùch *et.al*,2006). Sendo assim, podemos sugerir, diante do nosso resultado, que a redução da expressão do trocador sódio/cálcio auxilia na redução do estado inotrópico negativo observado no presente estudo.

Como alguns autores observaram que a ouabaína produz uma redução da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Lee and Choi, 1996; Carsten, 1967) resolvemos então, pesquisar a expressão protéica da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, também chamada de SERCA (*Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase*). Porém, o tratamento com ouabaína por 15 dias, não foi capaz de alterar a expressão dessa proteína o que reforça os nossos achados obtidos no protocolo da potenciação pós-pausa, onde avaliamos indiretamente a capacidade do retículo sarcoplasmático em captar o cálcio. Nossos dados corroboram com dados da literatura, onde o tratamento crônico com ouabaína por 5 semanas também não foi capaz de alterar a expressão da SERCA (Rossoni *et.al*, 2006). El-Armouche *et. al* (2004) também não observou alteração na expressão dessa proteína em miócito isolado tratado com ouabaína por 2 e 4 dias.

Sabe-se que a SERCA possui a função de captar cálcio, a qual é regulada por um polipeptídio denominado fosfolambam. Este polipeptídio, em seu estado desfosforilado, promove um acoplamento na SERCA inibindo sua atividade e, no estado fosforilado, o fosfolambam se desacopla da SERCA aumentando a captação de cálcio para o retículo sarcoplasmático, promovendo um aumento na velocidade de relaxamento. Sendo assim, o fosfolambam também contribui para a modulação da força de contração do músculo cardíaco. Entretanto, o tratamento com ouabaína por 15 dias não foi capaz de alterar a expressão do fosfolambam nos ventrículos esquerdos de ratos. Esse nosso achado reforça mais uma vez os resultados da potenciação pós-pausa sugerindo que não houve alteração na captação de cálcio para o retículo sarcoplasmático. Nosso achado corrobora com outro trabalho da literatura onde tratamento crônico com ouabaína também não foi capaz de alterar a expressão do fosfolambam (El-Armouche *et.al*, 2004).

Diversos autores demonstram que o tratamento crônico com ouabaína produz hipertensão em ratos (Padilha *et.al*, 2008; Rossoni *et.al*, 2006 ; Rossoni *et.al*, 2002) e que essa hipertensão é proveniente em parte, da ativação do sistema renina-angiotensina, promovendo um aumento de angiotensina II circulante, produzindo assim uma elevação do tônus simpático (Huang and Leenen,

1999). Sendo assim, decidimos investigar a expressão do receptor AT_1 . A ativação desse receptor pela angiotensina II promove a liberação da aldosterona, endotelina-1 e vasopressina e ainda é capaz de produzir aumento da produção de radicais livres, crescimento e migração celular, produção de proteínas da matriz extracelular e inflamação, além de promover o aumento do tônus simpático (Weir & Dzau, 1999; Allen *et al.*, 2000; Touzy & Berry, 2002). Nossos achados mostram que o tratamento com ouabaína por 15 dias foi capaz de reduzir a expressão desse receptor nos ventrículos esquerdo de ratos. Trabalhos relatam que tratamento com ouabaína subcutânea por 2 semanas reduzem a expressão do receptor AT_1 no cérebro e rins, além de promover uma discreta redução nos ventrículos esquerdos sendo esses achados provocados pela internalização dos receptores (Cheung, *et.al*, 2006). A redução da densidade de receptores AT_1 pode estar atribuída ao aumento de angiotensina II. Trabalho observara que um aumento de angiotensina II em cultura de células musculares lisas produziu uma redução dos receptores AT_1 (Ullian and Linas, 1989). Sendo assim, nossos achados reforçam a hipótese de que a hipertensão induzida pelo tratamento por 15 dias com ouabaína é devido ao aumento da atividade simpática e não por alterações cardíacas intrínsecas.

A bomba de sódio, como sabemos, controla os gradientes de concentrações dos íons sódio e potássio necessário para gerar e manter o potencial de membrana e regular a contratilidade cardíaca (Swift *et.al*, 2007). Sendo assim, avaliamos a expressão protéica da Na^+K^+ ATPase da isoforma α_1 e α_2 . A isoforma α_2 está funcionalmente acoplada ao trocador sódio/cálcio, regulando assim as correntes de cálcio e exercendo um papel fundamental na modulação da contratilidade cardíaca (Blaustein *et.al*, 1998). Rossoni *et.al* (2006) mostraram que o tratamento com ouabaína por 5 semanas, promove um aumento na expressão dessa isoforma da bomba de sódio e produz efeito inotrópico positivo. Entretanto, nós não observamos nenhuma alteração da expressão da isoforma α_2 no tratamento crônico com ouabaína por 15 dias, corroborando com outros autores que também não encontraram alterações na expressão protéica dessa enzima no hipotálamo de ratos tratados com 14 dias de ouabaína (Kent *et.al*, 2004). Sendo assim, podemos sugerir que a expressão da isoforma α_2 da Na^+K^+ ATPase é tempo dependente e que a

alteração na sua expressão é vinculada aos efeitos inotrópicos positivos dos glicosídeos cardíacos.

Vários trabalhos sugerem que as diferentes isoformas da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase possuem diferentes papéis fisiológicos. A literatura cita que a isoforma α_2 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase tem o papel de regular a concentração de sódio intracelular próxima ao trocador sódio/cálcio, regulando assim a contratilidade do miócito. Já a isoforma α_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase ajuda a manter baixas as concentrações de sódio intracelular (Despa and Bers, 2007; James *et.al*, 1999). Estudo prévio com camundongos modificados geneticamente para não expressarem a isoforma α_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, apresentaram uma diminuição da contratilidade cardíaca (Dostanic *et.al*, 2004). Outro estudo mais antigo também demonstra que o tratamento com concentrações nanomolares de ouabaína diminui a expressão da bomba de sódio, porém não faz distinção das isoformas (Aiton *et.al*, 1981). Sendo assim, os nossos achados corroboram com esses dados da literatura, uma vez que, observamos uma diminuição da expressão da isoforma α_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, acompanhado de uma redução da contratilidade do músculo cardíaco. Alguns autores sugerem ainda que a diminuição da expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase seja devido à interação entre a ouabaína e a bomba de sódio, como ocorre com o fenômeno de *down-regulation* de receptores (Aiton *et.al*, 1981).

VIII CONCLUSÃO

O tratamento crônico com ouabaína foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica, a pressão arterial diastólica, a frequência cardíaca, as derivadas temporais máxima e mínima e a pressão ventricular esquerda.

Na preparação de músculo isolado, o tratamento crônico com ouabaína por 15 dias foi capaz de diminuir o pico de força isométrica. Entretanto, esse tratamento não alterou a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, a função do retículo sarcoplasmático, o influxo de cálcio pela membrana através dos canais de cálcio e nem alterou a ativação beta adrenérgica.

Quando avaliamos o efeito do tratamento sobre a atividade da bomba de sódio, encontramos um aumento da sua atividade, o que explicaria a queda de força encontrada na análise do pico de força isométrica.

Nas expressões protéicas, o tratamento crônico com ouabaína diminui a expressão do receptor AT_1 para angiotensina II, do trocador Na^+/Ca^{2+} e da isoforma α_1 da Na^+-K^+ ATPase.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento crônico com ouabaína por 15 dias, em ratos normotensos, promove hipertensão, porém produz um efeito inotrópico negativo. Esse efeito pode estar associado ao aumento da atividade da bomba de sódio, redução da expressão da isoforma α_1 da Na^+-K^+ ATPase e redução do trocador Na^+/Ca^{2+} . Além disso, o tratamento com ouabaína reduziu a expressão protéica do receptor AT_1 , sugerindo um envolvimento do sistema renina-angiotensina na hipertensão induzida pela ouabaína.

IX Referências Bibliográficas

Aiton, J.F. . Lamb, J.F.; Ogden, P. Down-regulation of the sodium pump following chronic Exposure of hela cells and chick embryo heart cells to Ouabain. Br. J. Pharmac., 1981; 73: 333-340

Allen, AM; Zhuo, J; Mendelsohn, F. Localization and function of angiotensina AT₁ receptors. American Journal of Hypertension, 2000; 13:31S-38S

Altamirano, J.; Li, Y.; DeSantiago, J.; Piacentino V.; Houser, S.R.; Bers, D.M. The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires Na⁺-Ca²⁺ exchanger function. J Physiol, 2006; 575.3 845–854

Bagrov, AY and Shapiro, JI. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications *Nat Clin Pract Nephrol.* ; 4(7): 378–392. 2008

Barker, LA; Rossoni, LV ; Vassallo, DV. Acute pressor actions of ouabain does not enhance the actions of phenylephrine and norepinephrine in anesthetized rats. Journal Cardiovascular Pharmacology, 2001; 37 (3); 339-348

Batista, PR. Influência do tratamento por 15 dias com baixa concentração de ouabaína na reatividade vascular em artérias de condutância de ratos. 2009 Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas. Programa depós - Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo 2009

Bäumer, AT; Flesch, M; Kilter, H; Philipson, KD; Böhm, M. Overexpression of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger leads to enhanced inotropic responsiveness to Na(+)-channel agonist without sarcoplasmic reticulum protein changes in transgenic mice. Biochem Biophys Res Commun, 1998; 249(3):786-90.

Berenson, GS; Wattingney, WA, Bao, W; Srinivasan, SR; Radhakrishnamurthy, B. Rationale to study the early natural history of heart disease: the Bogalusa Heart Study. The American Journal of the Medical Sciences, 1995; suppl 1:S22-8

Bers, DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 2002; 415: 198-205

Bers, DM; Despa,S. Cardiac Myocytes Ca²⁺ and Na⁺ Regulation in Normal and Failing Hearts. J Pharmacol Sci, 2006, 100, 315 – 322

Bers, DM; Perez-Reyes, E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. Cardiovascular Research, 1999; 42: 339–360

Bean, B.P. Two Kinds of Calcium Channels in Canine Atrial Cells: Differences in Kinetics, Selectivity, and Pharmacology. J. Gen. Physiol., 1985; 86:1-30

Blanco, G.; Mercer, RW. Isoenzymes of the Na,K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. American Journal of the Medical Sciences, 1998: Suppl 1:S22-8

Blaustein, MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. American Journal of Physiology, 1993; 264: C1367-C1387

Blaustein, MP; Juhaszova, M; Golovina, VA. The cellular mechanisms of action of cardiotonic steroids: a new hypothesis. Clinical and Experimental Hypertension, 1998; (5 &6): 691-703

Blaustein, MP; Zhang, J; Chen, L; Song, H; Raina, H; Kinsey, SP; Izuka, M; Iwamoto, T; Kotlikoff, MI; Lingrel, JB; Philipson, KD; Wier, WG; Hamlyn, JM. The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. *Hypertension*, 2009, 53(II) 291-298

BLOOD, B.E. Glycoside induced stimulation of membrane Na-K ATPase - fact or artifact. In *Biophysical Aspects of Cardiac Muscle*. ed. Morad, M. pp. 379-383. New York & London: Academic Press, 1975

Bossuyt, J.; Ai, X.; Moorman J.R.; Pogwizd, S.M.; Bers, D.M. Expression and Phosphorylation of the Na-Pump Regulatory Subunit Phospholemman in Heart Failure. *Circulation Research*, 2005 97: 558-565

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem.*, 1976; 72: 248-254

Bremel RD, Weber A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1975; 376: 366-374

Briones, AM; Xavier, FE; Arribas, SM; Gonzáles, 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.* 291: H193–H201, 2006

Cappelli V, Bottinelli R, Poggesi C, Moggio Reggiani C. Shortening velocity and myosin and myofibrillar ATPase activity related to myosin isoenzyme composition during postnatal development in rat myocardium. *Cir.Res*, 1989; 65:446-457

Carsten, M.E. Cardiac sacotubular vesicles. Effects of ions, ouabain and acetylstrophanthidin. *Circulation Research*. 1967, 20; 599-605

Chain S.Y., Fernando R., Peck G., Ye S.Y., Mendelsohn F.A.O., Jenkins T.A., Albiston A.L. The angiotensin IVAT₄ receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2004) 2728–2737

Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.*, 1986; 157: 375-380

Chaves –Castro P., Soares S., Fontes-Carvalho R., Moureira-Leite A., Negative inotropic effect of selective AT₂ receptor stimulation and its modulation by the endocardial endothelium *European Journal of Pharmacology* 578 (2008) 261–269

Cheung, W J., Mary-Anne H. K, Esraa El-Shahat, H Wang, J Tan, R W, Frans H. H. Leenen. Central and peripheral renin-angiotensin systems in ouabain-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physio*, 2006 291: H624–H630

Chibalin A. V., Kovalenko M.V., Ryder J.W., Feraille E., Henriksson-Wallberg H., Zierath J.R. Insulin-and glucose-Induced Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-Adenosine Triphosphatase α -Subunits in Rat Skeletal Muscle. *Endocrinology*, 2001, 142(8):3474–3482

Chown D.C., Forte J.G. Functional Significance Of The β -Subunit For Heterodimeric P-Type Atpases P. *The Journal of Experimental Biology* 198, 1–17 (1995)

De Resende, M.M; Mill, J.G. Effect of high salt intake on local renin-angiotensin system and ventricular dysfunction following myocardial infarction in rats. *Clin. Exp.Pharmacol.Physiol*, 2007. 34 274-279

Despa, S & Bers, DM. Na/K Pump Current and $[Na]_i$ in Rabbit Ventricular Myocytes: Local $[Na]_i$ Depletion and Na Buffering. *Biophysical Journal*, 2003 84 4157–4166

Despa, S.; Bossuyt, J; Han, F; Ginsburg, K.S.; Jia, L.G.; Kutchai, H.; Tcuker, A.L.; Bers, D.M. Phospholemman-Phosphorylation Mediates the β -Adrenergic Effects on Na/K Pump Function in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 2005 97: 252-259

Despa, S; Bers, DM. Functional analysis of Na⁺/K⁺-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007 293:321-327

Dostanic, I.; Schultz, J.E.J.; Lorenz, J.N.; Lingrel, J. The α_1 Isoform of Na,K-ATPase Regulates Cardiac Contractility and Functionally Interacts and Co-localizes with the Na/Ca Exchanger in Heart. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2004; 279: 54053–54061

El-Armouche, A.; Jaeckel, E; Boheler, K R.; Boknik, P.; Hertle, B.; Neumann, J.; Eschenhagen, T. Ouabain treatment is associated with upregulation of phosphatase inhibitor-1 and Na⁺/Ca²⁺-exchanger and *b*-adrenergic sensitization in rat hearts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004; 318: 219–226

Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 1983; 245: C1-C14

Faller L. D. Mechanistic studies of pump. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008, 476 12-21

Ferreira, A.V; Viana, M.C; Mill, J.G; Asmar, R.G; Cunha, R.S. Racial differences in aortic stiffness in normotensive and hypertensive adults. *Journal of hypertension*, 1999. 17 631-637

Freer R, Pappano A, Peaxh M, Bing K, McLean M, Vogel S - Mechanisms for the positive inotropic effect of angiotensin II on isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1976; 39: 178-83.

Gao, MH; Ping, PP; Post, S; Insel, PA; Tang, RY; Hammond, HK. Increased expression of adenylycyclase type VI proportionately increases β -adrenergic receptor-stimulated production of cAMP in neonatal rat cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1998; 95: 1038-1043

Gao, J.; Wymore, R.S.; Wang, Y.; Gaudette, G.R.; Krukrnkamp, I.B.; Cohen, I.S.; Mathias, R.T. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *The journal General Physiology*, 2002; 119 (4): 297-312

Gasparo M., Bottari S., Levens N.R., *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosi and Management*, Second Edition edited by J.H.Laragh and B.M. Brenner, 1995, p. 1695

Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F241–F250, 2006;

Glynn I. M. All hands to the sodium pump. *Journal of Physiology*, 1993, 462: 1-30

Gottlieb, SS; Rogowski, AC; Weinberg, M; Krichten, CM; Hamilton, BP; Hamlyn, JM. Elevated concentrations of ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 1992; 86 (2) 20-425

Haddy, FJ, Pamnani, MB; Clough, D. The sodium-potassium pump in volume expanded hypertension. *Clinical Experimental Hypertension*, 1978-1979; 1 (3) 295-336

Hamlyn, JM; Blaustein, MP; Bova, S; DuCharme, DW; Mandel, F; Mathews, WR; Ludens, JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991; 88: 6259-6263.

Hamlyn, JM; Hamilton, BP; Manunta, P;. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and hypothesis. *Journal of Hypertension*, 1996; 14(2) 151-197

Harvey, SC. The effects of ouabain and phenytoin on myocardial norepinephrine. *Arch.Int. Pharmacodyn.* 1975; 213: 222-234

Hasegawa, T; Masugi, F; Ogihara, T; Kumuhara, Y. Increase in plasma ouabainlike inhibitor of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ with high sodium intake in patients with essential hypertension. *Journal Clinical Hypertension*, 1987; 3: 419-429

Havilk, RJ.; Garrison, R.J.; Feinleib, M.; Kannel, WB.; Castelli WP.; Mcnamara, PM. Blood pressure aggregation in families. *American Journal Epidemiology*, 1979; v,10, p.304-312

Henderson AH. Forman R, Brutsaert DL, Sonnenblick EH. Tetanic contraction in mammalian cardiac muscle. *Cardiovascular Res.*, 1971; 1:96-100

Hilgenber L.G.W, Pham B., Ortega M., Walid S., Kemmerly T., O'Dowd D. K., Smith M. A. Agrin Regulation Of $\alpha 3$ Sodium Potassium Atpase Activity Modulates Cardiac Myocyte Contraction. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2009 283:2110-2118

Horisberge J.D. Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump. *PHYSIOLOGY*, 2004 19: 377–387

Huang, B.S and Leenen F.H.H. Brain renin-angiotensin system and ouabain- induced sympathetic hyperactivity and hypertension in Wistar rats. *Hypertension* 34: 107–112, 1999.

Ikeda, Y; Hoshijima, M; Chien, KR. Toward Biologically Targeted Therapy of Calcium Cycling Defects in Heart Failure. *Physiology*, 2008 23: 6–16

James, P.F.; Grupp, I.L.; Grupp, G.; Woo, A.L.; Askew, G.R.; Croyle, M.L.; Walsh, R.A.; Lingrel, J.B. Identification of a specific role for the Na,KATPase $\alpha 2$ isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell*, , 1999; 3: 555–5563

Juhaszova, M; Blaustein, MP. Distinct distribution of different Na⁺pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. Physiological implication. *Ann N Y Acad Sci.*,1997b; 3; 834:524-36

Juhaszova, M; Blaustein, MP. Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997a; 94: 1800-1805

Junior C.R, Colombari E., Cravo S., Lopes O. U. Hipertensão Arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso *Rev Bras Hipertens* 8: 41-54, 2001

Kaplan N. M.: Clinical Hypertension 50 ed. Edited by Willians e Wilkins 1990, p.56

Kaplan, NM. Clinical hypertension. 7 ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1998. 444p.

Kent, M.A.H.; Huang, B.S.; Van Huysse, J.W.; Leenen, F.H.H. Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoenzyme activity and protein expression in ouabain-induced hypertension. Brain Research, 2004; 1018: 171-180

KRIEGER EM; FRANCHINI KG & KRIEGER JE. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. Medicina, Ribeirão

Krieger J.E, Drager L.F., Pereira A.C., Krieger E.M. Genética e Hipertensão Arterial (Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2004;3:499-507

Lee,KS; Choi, SJ. Effects of the cardiac glycosides on the Ca²⁺ uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996; 153: 114-120

Lei J., Nowbar S., Mariash C. N., Ingbar D. H. Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: L762–L772, 2003.

Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1995; 73: 638 -643

Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. Pos rest contraction of amphibian cardiac muscle .
Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1991; 24: 843-846

Lessa I. O adulto brasileiro e as doenças da modernidade. Epidemiologia das doenças crônicas não transmissíveis In: Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial. 1 ed. Rio de Janeiro: Hucitec, 1998 Cap. 5, p. 77-96

LOLIO, C A. de. Epidemiología da hipertensão arterial. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 24:425-32,1990.

Lopes H.F., Gil J. S., Consolim-Colombo M. Ativação dos Sistemas Adrenérgicos, Renina-Angiotensina-Aldosterona, Endotelina e Adrenomedulina na Hipertensão Arterial Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2008;2:102-7

Li, L., DeSantiago, J., Chu, G., Kranias, E. G. & Bers, D. M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in b-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol*, 2000, 278: H769–H779

Manunta P., Ferrandi M., Bianchi G., Hamlyn J.M. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease. *Journal of Hypertension* 2009, 27:9–18

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

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

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

Marín, J.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Salices, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *British Journal of Pharmacology*, 1988; 93: 43-52

Martin-Vasallo, P., Dackowski, W.; Emanuel, J.R; Levenson, R. Identification of a putative isoform of the Na,KATPase β subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 4613-4618

McGarry, S.J.; Williams, A.J. Digoxin activates sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels: a possible role in cardiac inotropic. *British Journal of Pharmacology*. 1993; 108: 1043-1050

Metzger JM, Wahr PA, Michelle DE, Albayya F, Westfall MV,. Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca^{2+} -activated tension development in single adult cardiac myocytes. *Cir. Res.*, 1999; 84: 1310-1317

Michellini LC. Regulação da pressão arterial: mecanismos neuro-humorais. In: Ayres MM. *Fisiologia* 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.473-88.

Mill J.G., Milanez M. C., Busatto V. C. W., Moraes A. C., Gomes M. G. Ativação da Enzima Conversora de Angiotensina no Coração após Infarto do Miocárdio e suas Repercussões no Remodelamento Ventricular. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* volume 69 (nº 2), 101-110, 1997

Mill, J.G.; Vassallo, D.V.; Leite, C.M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1992; 25: 399-408

Müller-Ehmsen, J; Nickel, J; Zobel, C; Hirsch, I; Böck, B; Brixius, K; Schwinger, RHG. Longer term effects of ouabain on the contractility of rat isolated cardiomyocytes and on the expression of Ca and Na regulating proteins *Basic Res Cardiol*, 2003; 98: 90 – 96

Münc, G; Rosport,R; Baumgartner,C; Li, Z; S W; Bu"ltmann, A; Martin U. Functional alterations after cardiac sodium-calcium exchanger overexpression in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H488–H495, 2006

Naruse, K; Naruse, M; Tanabe, A; Yoshimoto, T; Watanabe, Y; Kurimoto, F; Horiba, N; Tamura, M; Inagami, T; Demura, H. Does plasma immunoreactive ouabain originate from the plasma adrenal gland? *Hypertension*, 1994, 23 (suppl I) I 102-105

Padilha, A.S. Efeito da administração aguda de 1nM de ouabaína na reatividade vascular à fenilefrina no leito vascular caudal de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. 2003 Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas. Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo 2003

Padilha, AS; Moreira, CM; Meira, EF; Siman, FDM; Stefanon, I; Vassallo, DV. Chronic ouabain treatment enhances cardiac myosin ATPase activity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2008, 1-6

Pamnani, M; Huot, S; Buggy, J; Clough, DL; Haddy, FJ;. Demonstration of a humoral inhibitor of Na⁺K⁺ pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*, 1981;2(Suppl II): II 96-IIa

Poston, L; Sewell, RB; Wilkson, SP; Richardson, PJ; Williams, R; Clarkson, EM; MacGregor, GA; de Wardener, HE. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *British Medical Journal*, 1981; 282: 847-849

Rayment, I; Holden, HM; Whittaker, M; Yohn, CB; Lorenz, M; Holmes, KC; Milligan, RA. Structure of actin-myosin complex and its implication for muscle contraction. *Science*, 1993; 261: 58-65

Reuter, H.; Pott, C.; Goldhaber, J.I.; Henderson, S.A.; Philipson, K.D.; Schwinger, R.H.G. Na^+ - Ca^{2+} Exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Cardiovascular Research*, 2005 ; 67: 198-207

Ringer, SA. A further contribution regarding the influence of the different constituents on the blood on the contraction of the heart. *Journal of Physiology* 1883; 4: 29-47

Ross, G; Manunta, P; Hamlyn, JP; Pavan, E; Di Toni, R; Semplicini, A; Pessina, AC. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasm renin, aldosterone and blood pressure levels. *Journal of hypertension*, 1995; 13 (10): 1181-1191

Ross, Jr.; Waldhausen, J.A.; Braunwald, E. Direct effects on peripheral vascular resistance. *The Journal Clinical Investigation*, 1960; 39: 930-936

Rossi, G; Manunta, P; Hamlyn, JM; Pavan, E; Di Toni, R; Semplicini, A; Pessina, AC. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasm rennin, aldosterona and blood pressure levels. *Journal of hypertension*, 1995; 13 (10): 1181-1191

Rossoni, LV; Salaices, M; Miguel, M; Briones, AM; Barker, LA; Vassallo, DV; Alonso, MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002

Rossoni, LV; Xavier, FE; Moreira, CM; Falcochio, D; Amanso, AM; Tanoure, CU; Carvalho, CRO; Vassallo, DV. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Science*, 2006 17: 1-9

Sagawa, T.; Sagawa, K.; Kelly, J.E.; Tsushima, R.G.; Wassestrom, J.A. Activation of ryanodine receptors by cardiac glycosides. *American Journal of Physiology*, 2002; 282: 1118-1126

Schillinger, W; Janssen, PM; Emami, S; Henderson, AS; Ross, RS; Teucher, N; Zeitz, O; Philipson, KD; Prestle, J; Hasenfuss G. Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na(+)-Ca(2+) exchanger. *Cir.Res.*, 2000;87(7):581-7

Shattock, MJ. Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a drugable target in disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2009, 9:160–166

Salas M.A., Vila-Petroff M. G., Palomeque J., Aiello E.A., Mattiazi A. Positive Inotropic and Negative Lusitropic Effect of Angiotensin II: Intracellular Mechanisms and Second Messengers *Journal Molecular Cellular Cardiology* 33, 1957–1971 (2001)

Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. 293: C509–C536

Siragy, HM. The role of AT₂ receptor in hypertension. *American Journal of Hypertension*, 2000; 13:62S-67S

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

Solaro,RJ; Rarick, H. M. Troponin and tropomyosin—proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res*, 1998; 83:471–480.

Swift, F.; Tovrsrud, N.; Enger, U.H.; Sjaastad, I.; Sejersted, O.M. The Na⁺/K⁺-ATPase α2-isoform regulates cardiac contractility in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 2007; 75 : 109–117

Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological Reviews*, 1999; 79: 216-261

Therien A. G. and Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000; 279: C541–C566.

Tian J. and Xie Z. The Na-K-ATPase and Calcium-Signaling Microdomains. *Physiology*, 2008; 23: 205-211

Touzy, RM; Berry, C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002; 35:1001-1015

Ullian, M.E.; Linas S.L. Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* , 1989; 84: 840–846

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Disponível em :WWW.sbh.org.br
acesso em: 10 abril de 2009

Valdivia, H. H.; Kaplan, J. H.; Ellis-Davies, G. C. R.; Lederer, W. J. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science*, 1995, 267: 1997–2000.

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

Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Stefanon I, Leite CM, Mill JG. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat rates in various calcium concentrations. *Pharmacology Research* 1994; 29:251-260

Vassallo DV, Oliveira EM, Stefanon I. Contratilidade Miocárdica In: Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2008. p 435-469 3ª Ed.

Vassallo, D.V. & Mill, J.G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana*, 1988; 38: 87-97

Vassallo, DV; Songu-Mize, E; Rossoni, LV, Amaral, SMC. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1997; 30: 545-552

Vassallo DV, Vasquez EC, Mill JC, Cabral AM. Time-course effects of sinoartical denervation on contractile state of the rat myocardium. *Am.J. Physiol.* 1991; 261: H639-43.

Veerasingham, SL; Leenen, FHH. Ouabain and central sodium-induced hypertension depend on the anteroventral third ventricle region. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*, 1999, 276:63-70

Velema J., Zaagsma J. Purification and characterization of cardiac sarcolemma and sarcoplasmic reticulum from rat ventricle muscle. *Archives Biochemical and Biophysics* 1981; 212: 676-688

Verheijck, E.E.; Antoni C. G; Wilders,R.; Bouman,LN. Contribution of L-type Ca²⁺ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276:1064-1077

Weir, MR; Dzau, VJ. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management. *American Journal of Hypertension*, 1999; 12:205S-213S.

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

Wyss, JM. The role of the sympathetic nervous system in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 1993; 2:265-73

Xu, K. Y. Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005; 338 : 1669-1677

Yingst DR, Doci TM, Massey KJ, Rossi NF, Rucker E, Mattingly RR. Angiotensin II stimulates elution of Na-K-ATPase from a digoxin-affinity column by increasing the kinetic response to ligands that trigger the decay of E2-P. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008 294: 990–1000.

Yu, S-M; Tsai, S-H; Guh, J-H; Ko, F-N; Teng, C-M; Ou, JT. Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1996; 94: 547-54

Zhang, J., Leenen F.HH. AT1 receptor blockers prevent sympathetic hyperactivity and hypertension by chronic ouabain and hypertonic saline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001 280: H1318–H1323

Zhang, X.Q.; Song, J.; Rothblum, L.I.; Wang, M L X; Ding, F.; Lytton, J.D.J; McDermott, P.J.; Cheung, J.Y. Overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger alters contractility and SR Ca²⁺ content in adult rat myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001 281: H2079–H2088