



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Natasha Paixão da Silva

**EFEITO DE NOVOS DERIVADOS γ -BENZILIDENOS DA
DIGOXINA SOBRE A Na^+/K^+ -ATPase**

RIO DE JANEIRO

Junho/2015

EFEITO DE NOVOS DERIVADOS γ -BENZILIDENOS DA DIGOXINA SOBRE A Na^+/K^+ -ATPase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal)

Orientadores: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas

Prof. Dr. François Germain Noël

Rio de Janeiro

Junho/2015

Efeito de novos derivados γ -benzilidenos da digoxina sobre a Na^+/K^+ -ATPase

Natasha Paxão da Silva

Orientadores: Prof. Dr. Luís Eduardo Menezes Quintas
Prof. Dr. François Germain Noël

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Aprovada por:

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas – UFRJ

Prof. Dr. François Germain Noël – UFRJ

Prof^a. Suzana Guimarães Leitão – NPPN/UFRJ

Prof. Leandro Augusto de Oliveira Barbosa – UFSJ

Prof^a . Lucienne da Silva Lara Morcillo – UFRJ

Prof^a. Valéria do Monti Nascimento Cunha- UFRJ

Rio de Janeiro

Junho/2015

Agradecimentos

Ao meu orientador professor Luis Eduardo Menezes Quintas, por aceitar me orientar, pelos conhecimentos transmitidos e pela enorme contribuição para meu crescimento profissional. Obrigada por tudo, foi fundamental na minha formação.

Ao meu co-orientador o professor François Noël, pela disponibilidade em sempre querer me ajudar, pela orientação e pelos conselhos sempre ponderados ao longo desse processo.

À professora Cláudia Lúcia Martins Silva, pelos ensinamentos transmitidos e por colaborar para o meu crescimento profissional.

À professora Valéria do Monti Nascimento Cunha, por aceitar revisar este trabalho.

Aos professores, Suzana Guimarães, Leandro Barbosa, Luciene Morcillo por aceitarem avaliar este trabalho e pelas contribuições que não de fazer.

À minha linda e amada família, pelas oportunidades que me foram concedidas, pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao meu marido Vinícius Monteiro de Souza, pelo companheirismo e pela dedicação por todos esses anos.

Aos amigos que fiz no laboratório, Luciana Silva do Amaral pela amizade e paciência para transmitir seus conhecimentos tanto experimentais quanto teóricos. A Thais Emanuele Pompeu, pela amizade de sempre e pela sua disponibilidade em me ajudar em tudo. A vocês, agradeço do imensamente por tudo.

Aos amigos que fiz no laboratório, Fernanda Chagas, Suellen D'Arc, Aline Carvalho, Tassya Cataldi, Carolina Drummond, pelo companheirismo e amizade. Por tornarem nossa convivência diária tão inesquecível.

Ao meu amigo e inesquecível, Geraldino Cunha Filho, pela amizade, pelos ensinamentos passados, pelas longas e divertidas conversas, seu bom humor estarão sempre registrados na minha memória e coração. Sabemos que a partida deste mundo é algo normal e que, de repente, as pessoas vão para um lugar melhor, ao menos é o que dizem, não sabemos se é verdade ou não, pois ninguém nunca voltou para nos contar como são as coisas. O verdadeiro sentimento neste momento é a saudade, a dor da perda e também o arrependimento por ter falado demais ou, de menos. É um momento complicado para quem fica, pois, são os vivos que continuam

com a consciência da existência, quanto os que partiram, deixaram tudo para trás...
Mergulharam no amanhã inevitável e completamente maravilhoso.

A todos os meus amigos, pela paciência, amizade de todos os dias.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Silva, Natasha Paixão

Efeito de Novos Derivados γ -Benzilidenos da Digoxina sobre a Na^+/K^+ -ATPase/Natasha Paixão da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2015.

xi, 57f.:il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadores: Luis Eduardo Menezes Quintas e François Germain Noël

1. Derivados da digoxina. 2. Na^+/K^+ -ATPase. 3. Seletividade funcional 4. Esteroides cardiotônicos. I. Quintas, Luis Eduardo Menezes (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título

RESUMO

SILVA, NATASHA PAIXÃO. Efeito de novos derivados γ -benzilidenos da digoxina sobre a Na^+/K^+ -ATPase. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Os esteroides cardiotônicos (ECTs) são utilizados clinicamente no tratamento da insuficiência cardíaca e o mecanismo clássico de ação envolve a inibição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase. Devido a outras funções recém-descobertas de Na^+/K^+ -ATPase, como transdução de sinal através de interações proteína-proteína, novas possibilidades terapêuticas dos ECTs estão sendo cogitadas. Entretanto, como dissociar estes dois mecanismos ainda é desconhecido, o que nos permitirá estabelecer os requisitos estruturais de potenciais moduladores seletivos para cada uma destas duas funções: atividade e sinalização. Neste contexto, é importante o desenvolvimento e avaliação farmacológica de agentes que possam especificamente agir sobre a função sinalizadora da Na^+/K^+ -ATPase sem afetar a função iônica, ou vice-versa. Nosso objetivo foi avaliar a capacidade da digoxina e de seus derivados (DGB1 à DGB7) de agirem através desses dois mecanismos. Para inibição da atividade Na^+/K^+ -ATPásica, em preparações de hemisférios cerebrais de rato (contendo predominantemente as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e rim humano ($\alpha 1$), a digoxina apresentou um $\text{CI}_{50} = 0,22 \pm 0,04$ e $0,29 \pm 0,02 \mu\text{M}$, respectivamente, enquanto que as DGBs apresentaram diferentes perfis, com potência semelhante à digoxina (DGB2, $\text{CI}_{50} = 0,46 \pm 0,10$ e $0,57 \pm 0,10 \mu\text{M}$, e DGB4, $\text{CI}_{50} = 0,66 \pm 0,20$ e $0,34 \pm 0,09 \mu\text{M}$), com menor potência (DGB3, $\text{CI}_{50} = 18 \pm 10 \mu\text{M}$ e perfil atípico para rim humano, DGB5, $\text{CI}_{50} = 20 \pm 7$ e $9,8 \pm 2,4 \mu\text{M}$, e DGB6, $\text{CI}_{50} = 4 \pm 1$ e $11 \pm 3 \mu\text{M}$), e outras que praticamente não inibiram (DGB1 e DGB7). Nos ensaios de ligação por deslocamento da [^3H]ouabaína, realizado para algumas DGBs na concentração de $10 \mu\text{M}$, observamos que a DGB2 e DGB4 promoveram o deslocamento total do complexo radioligante-receptor, assim como a digoxina, enquanto DGB1 não promoveu deslocamento. Avaliamos, então, o efeito celular da digoxina e as DGBs. Nas concentrações de 10 e 100 nM, a digoxina foi capaz de estimular em torno de 100% a proliferação celular após 72 h de tratamento. Na concentração de $1 \mu\text{M}$, que inibe praticamente toda a atividade Na^+/K^+ -ATPásica, observa-se logo em 24 h uma drástica redução do número de células e morte celular. Com as DGBs, nenhuma delas resultou em mudança do perfil de crescimento celular nas concentrações testadas, exceto DGB2, DGB3 e DGB4, que tiveram um perfil antiproliferativo em 10, 1 e $20 \mu\text{M}$, respectivamente. Para verificar o efeito sobre a sinalização celular, analisamos se elas eram capazes de ativar uma das cinases ligadas às vias de transdução mediadas pela Na^+/K^+ -ATPase, qual seja, ERK1/2. Após 15 min de tratamento, não foi observada alteração significativa da densidade de ERK1/2 fosforilada (ativada) com a digoxina ou com as DGBs testadas (1, 2 e 4). Nosso trabalho é o primeiro a propor ECTs derivados da digoxina como possíveis substâncias com seletividade funcional, restando a capacidade inibitória, mas deficientes quanto a capacidade de estimular a sinalização mediada pela Na^+/K^+ -ATPase.

Palavras-Chave: Derivados da digoxina. 2. Na^+/K^+ -ATPase. 3. Seletividade funcional. 4. Esteroides cardiotônicos.

ABSTRACT

SILVA, NATASHA PAIXÃO. Effect of new digoxin γ -benzylidene derivatives on Na^+/K^+ -ATPase. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cardiotonic steroids (CTSs) are used clinically in the heart failure and the classic mechanism of action involves inhibition of Na^+/K^+ -ATPase activity. Due to other newly discovered functions of Na^+/K^+ -ATPase, as signal transduction through protein-protein interactions, new therapeutic possibilities of CTSs are being debated. However, how to dissociate these two mechanisms are still unknown, and will allow us to establish the structural requirements of potential selective modulators for each of these two pathways. In this context, it is important the development and evaluation of pharmacological agents that might specifically act on the signal function of Na^+/K^+ -ATPase without affecting the ionic function, or vice versa. Our goal was to evaluate the ability of digoxin and its derivatives (DGB1 to DGB7) to act through these two mechanisms. For the inhibition of Na^+/K^+ -ATPase activity in preparations of rat brain hemispheres. (containing predominantly the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ isoforms) and human kidney ($\alpha 1$), digoxin presented an $\text{IC}_{50} = 0.22 \pm 0.04$ and $0.29 \pm 0.02 \mu\text{M}$, respectively, while the DGBs presented different profiles, with similar potency to digoxin (DGB2, $\text{IC}_{50} = 0.46 \pm 0.10$ and $0.57 \pm 0.10 \mu\text{M}$, and DGB4, $\text{IC}_{50} = 0.66 \pm 0.20$ and $0.34 \pm 0.09 \mu\text{M}$), with lower potency (DGB3, $\text{IC}_{50} = 18 \pm 10 \mu\text{M}$ and atypical profile to human kidney, DGB5, $\text{IC}_{50} = 20 \pm 7$ and $9.8 \pm 2.4 \mu\text{M}$, and DGB6, $\text{IC}_{50} = 4 \pm 1$ and $11 \pm 3 \mu\text{M}$), and others that hardly inhibited (DGB1 and DGB7). For the binding assays with [^3H]ouabain displacement, performed for some DGBs at $10 \mu\text{M}$, we observed that the DGB2 and DGB4 promoted the total displacement of the radioligand-receptor complex, as well as digoxin, while DGB1 did not promote any displacement. We evaluated the cellular effect of digoxin and DGBs. At 10 and 100 nM , digoxin was able to stimulate cell proliferation by 2-fold after 72 h of treatment. At a concentration of $1 \mu\text{M}$, which inhibits virtually all Na^+/K^+ -ATPase activity, we observed a drastic reduction in the number of cells and cell death after 24 h. With DGBs, none of them resulted in changes of cellular growth in the concentrations tested, except DGB2, DGB3 and DGB4, which had an antiproliferative profile at 10 , 1 and $20 \mu\text{M}$, respectively. In order to check the effect on cell signaling, we analyzed if they were able to activate one of the kinases related to signal transduction pathways mediated by Na^+/K^+ -ATPase, *i.e.* ERK1/2. After treatment for 15 min, no significant change was observed in the density of phosphorylated ERK1/2 (activated) with digoxin or the DGBs tested (1, 2 and 4). Our work is the first to propose CTSs derived from digoxin as potential substances with functional selectivity, retaining the inhibitory capacity, but with impaired ability to stimulate the signaling mediated by Na^+/K^+ -ATPase.

Keywords: Digoxin derivatives. 2. Na^+/K^+ -ATPase. 3. Functional selectivity. 4. Cardiotonic steroids.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Abreviaturas	x
1. Introdução	1
1.1 Esteroides Cardiotônicos	2
1.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase: Alvo Molecular dos Esteroides Cardiotônicos	5
1.2.1. Subunidades e isoformas	6
1.3 Novas Funções da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	9
1.4 Usos Terapêuticos Tradicionais e Potenciais dos Esteroides Cardiotônicos	11
1.4.1 Insuficiência Cardíaca Congestiva	11
1.4.2 Hipertensão Arterial	13
1.4.3 Câncer	14
1.5 Busca de Novos Ligantes da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e Seletividade Funcional	16
2. Objetivos	20
2.1. Metas	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1. Obtenção dos derivados da digoxina	23
3.2. Linhagem celular	23
3.3. Obtenção e preparação dos órgãos	24
3.4. Dosagem de proteína	25
3.5. Inibição da atividade Na ⁺ /K ⁺ -ATPásica	25
3.6. Avaliação da proliferação celular	26
3.7. Avaliação da sinalização intracelular por Western blot	27
3.8. Ensaios de ligação com [³ H]ouabaína	27
3.9. Análise de Dados	28
3.10. Soluções utilizadas	28
4. Resultados	32
4.1. Inibição da atividade Na ⁺ /K ⁺ -ATPásica	33
4.2. Ligação à Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	36
4.3. Proliferação celular	37
4.4. Modulação da atividade de ERK1/2	39
5. Discussão	41
6. Conclusões	48
7. Referências Bibliográficas	50
8. Anexo I (Artigo: Rocha e cols. 21-Benzylidene digoxin: a proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. PLoS One . 9(10):e108776, 2014	
9. Anexo II (Artigo: Alves e cols. γ-Benzylidene digoxin derivatives synthesis and molecular modeling: evaluation of anticancer and the Na,K-ATPase activity effect. Bioorg Med Chem . 23(15):4397, 2015.	

Abreviatura

ACTH	hormônio adrenocorticotrópico
AKT	do inglês <i>serine/threonine-specific protein kinase</i> , serina/treonina-proteína cinase específica
ATP	trifosfato de adenosina
AT1	receptor de angiotensina II do tipo 1
CDK1	do inglês <i>cyclin-dependent kinase 1</i> , cinase 1 dependente de ciclina
DTT	ditiotreitól
ECT	esteroide cardiotônico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor do fator de crescimento epidérmico
EGTA	ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetra-acético
ERK	do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i> , cinase regulada por sinal extracelular
FAK	do inglês <i>focal adhesion kinase</i> , cinase de adesão focal
GPI	glicosilfosfatidil-inositol
GPCR	receptor acoplado a proteína G
Grb2	do inglês <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> , proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento
HC	hemisfério cerebral de rato
IC	insuficiência cardíaca
LLC-PK1	células epiteliais renais de túbulo proximal porco
MAP	do inglês <i>mitogen activated protein</i> , proteína ativada por mitógeno
MAPK	do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i> , proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	do inglês <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> , proteína cinase cinase ativada por mitógeno
mTOR	complexo proteico
NCX	trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NKA	Na^+/K^+ -ATPase
OLF	“ouabain-like factor”

PBS	tampão fosfato salino
Pi	fosfato inorgânico
PKC	proteína cinase C
Raf	serina/treonina cinase
Ras	proteína G monomérica Ras
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i> , espécies reativas de oxigênio
RyR	receptor de rianodina
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SERCA	do inglês <i>sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i> , Ca ²⁺ -ATPase de retículo sarcoendoplasmático
Shc/Sos	do inglês <i>son of sevenless</i>
Src	tirosina cinase Src
TBS-T	do inglês <i>Tris-buffered saline + Tween®</i> , tampão salino composto de Tris + Tween®
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tween®	marca registrada de surfactantes não-iônicos do tipo monolaurato de polioxietileno sorbitano

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. Esteroides Cardiotônicos

Os esteroides cardiotônicos (ECTs) compreendem um grande grupo de substâncias de origem natural que são encontradas no reino vegetal nas Angiospermas, sendo o gênero *Digitalis* um dos principais representantes, como a *D. purpurea* L. (produtora de digitoxina) e a *D. lanata* Ehrh (produtora de digitoxina e digoxina). Assim, ECTs extraídos de plantas do gênero *Digitalis* são conhecidos também como digitálicos. A digoxina, quando em doses terapêuticas, provoca um aumento da força de contração do coração e redução da frequência e, por consequência, é utilizada no tratamento da insuficiência cardíaca (JUILLIÈRE e SELTON-SUTY, 2010). Por outro lado, a ouabaína é um ECT conhecido há mais de dois séculos por seus efeitos cardiotônicos, no entanto, é mais utilizada em pesquisa básica, principalmente *in vitro*, e é extraída das sementes do *Strophantus gratus* Baill, sendo também referida como estrofantidina G (RATES e BRIDI, 2004). A ouabaína também pode ser obtida da casca do tronco da *Acokanthera ouabaio* Lewin. Esses esteroides fazem parte da família dos cardenolidos. Outra família de ECTs são os bufadienolidos. Estes são encontrados em anfíbios, como os sapos do gênero *Bufo* e *Rhinella*, mas também são achados em alguns gêneros de plantas. Estruturalmente os ECTs caracterizam-se por um núcleo esteroidal e uma lactona insaturada ligada na posição 17 β (conjunto chamado de aglicona ou genina) e, no caso dos cardenolidos, um carboidrato pode ser encontrado na posição 3 β (glicosídeo; Fig.1). Nos cardenolidos, o anel lactônico é pentacíclico e nos bufadienolidos este é hexacíclico. O núcleo esteroide tem um padrão estereoquímico peculiar de fusão no sistema de anéis que faz com que este seja estruturalmente distinto dos sistemas de anéis comum aos esteroides endógenos de mamíferos, derivados do colesterol. Os ECTs provindos de plantas ou de anfíbios possuem anéis A-B e C-D unidos na configuração *cis*, enquanto os anéis B-C são *trans* (configuração *cis-trans-cis*), (SCHÖNFELD e cols., 1985).

A utilização clínica dos digitálicos consiste no tratamento de fibrilação e *flutter* atrial e da insuficiência cardíaca congestiva (ICC). O seu uso remonta mais de 200 anos, quando o chá das folhas de *D. lanata* já era empregado para

tratar hidropsia, denominação arcaica para o edema causado por diversas condições, em especial a ICC. O médico inglês responsável pela descoberta e descrição dos casos, William Withering, publicou sua famosa monografia *An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses* (“Um Relato sobre a Dedaleira e alguns de seus Usos Médicos”) estabelecendo assim as bases para a sua utilização medicinal, citação de LEE 2005. Como mencionado anteriormente, a digoxina e, agora em desuso, a digitoxina, erma empregadas nas formas mais graves de insuficiência, em especial aquelas que cursam com taquicardia atrial. Por outro lado, a ouabaína é mais utilizada em pesquisa básica, pois se caracteriza por seus vários grupamentos hidroxila sendo assim mais hidrossolúvel.

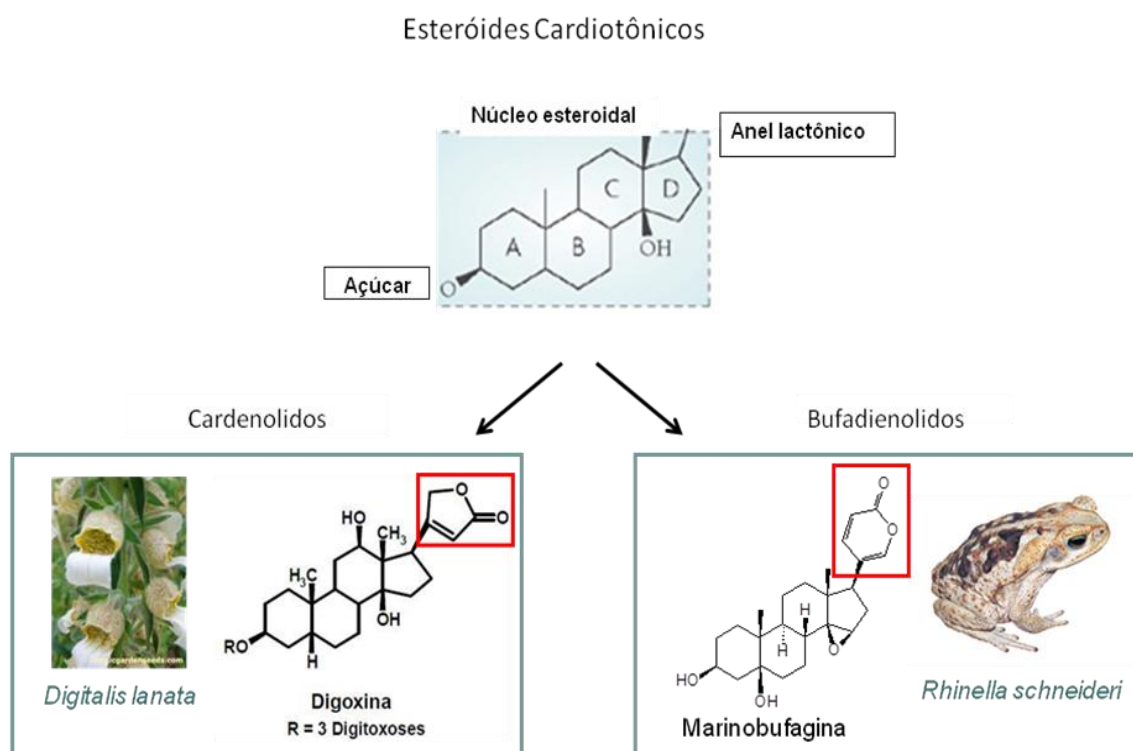


Figura 1. Representação química da estrutura dos esteróides cardiotônicos. Cada molécula desta família é composta por três grupos estruturais distintos: um núcleo esteroidal, uma molécula de açúcar e um anel lactônico. A lactona define a classe funcional de cada composto. Os cardenolidos contêm um anel de cinco membros e são encontrados principalmente em plantas, como por exemplo, a *Digitalis purpurea*, enquanto os bufadienolidos contêm um anel de seis membros e são normalmente encontrados em anfíbios, como o sapo *Rhinella schneideri*.

Os bufadienolidos são encontrados em glândulas parotóides de anfíbios anuros da família Bufonidae, gêneros *Bufo* e *Rhinella* (HAMLYN e cols., 1991). Como exemplo de bufadienolidos temos a bufalina, marinobufagina e telocinobufagina. Estes são componentes de um preparado da medicina tradicional chinesa chamado Chan'su (ou Senso, no Japão), composto da secreção dos sapos *Bufo bufo gargarizans* e *Bufo melanostictus* e utilizado ainda hoje como agente cardiotônico e diurético, mas também para outros fins (NESHER e cols., 2007).

Alguns estudos mostram evidências de que tanto os cardenolidos quanto os bufadienolidos estão presentes como esteroides endógenos em mamíferos (NESHER e cols., 2007; BAGROV e cols., 2009), no entanto os cardenolidos são mais bem caracterizados. A produção e secreção desses ECTs endógenos são reguladas por vários estímulos fisiológicos incluindo o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e a angiotensina II (LAREDO e cols., 1995; 1997). Entretanto, fisiologicamente, esses esteroides circulam no plasma em níveis sub-nanomolares, podendo alcançar concentrações um pouco mais elevadas (nanomolares) em condições patológicas como hipertensão e ICC (FERRANDI e cols., 2005b). Inicialmente, estudos mostraram a existência de um fator denominado *ouabain-like factor* (OLF), ou seja, um fator com grande semelhança à ouabaína e que é sintetizado pelo córtex adrenal. É relevante ressaltar que essa substância é encontrada em concentrações elevadas no plasma de pacientes hipertensos. Este fator é capaz de inibir a Na^+/K^+ -ATPase, mimetizando os efeitos dos ECTs (HAMLYN e cols., 1991). Além do plasma humano, a ouabaína ou um isômero também já foi encontrado em glândulas adrenais bovinas (SCHNEIDER e cols., 1998) e hipotálamo bovino (KAWAMURA e cols., 1999). A glândula adrenal seria o lugar de síntese e/ou estocagem de ouabaína (HAMLYN e cols., 1991). O ACTH, agonistas do adrenoceptor α_1 e angiotensina II estimulam a liberação de ouabaína das células adrenocorticais (LAREDO e cols., 1995, 1997, 2000). Mais tarde, surgiram evidências que células de mamíferos também sintetizam outro cardenolido, a digoxina. Uma substância indistinguível da digoxina foi isolada de urina humana (GOTO e cols., 1990). Ela foi encontrada no plasma, urina, e glândulas adrenais (GOTO e YAMADA, 1998; QAZZAZ e cols., 1996).

Evidências sugerem, entretanto, que a digoxina seria principalmente secretada no sistema nervoso central pela hipófise (BAGROV e cols., 2009).

1.2. Na^+/K^+ -ATPase: Alvo Molecular dos Esteroides Cardiotônicos

Os ECTs têm como alvo molecular a enzima Na^+/K^+ -ATPase, sendo classicamente considerados inibidores específicos desta enzima. A Na^+/K^+ -ATPase é uma proteína integral localizada na membrana plasmática, heteromérica, sendo uma das ATPases mais extensamente estudadas (AIRES e cols., 2008). Foi descoberta por Skou em 1957 através de experimentos com homogeneizado de nervo de caranguejo que demonstraram claramente a existência de uma proteína que está envolvida no transporte ativo de cátions. Ela pertence à família das ATPases do tipo P, que são enzimas na qual o ciclo catalítico envolve a fosforilação e desfosforilação de um resíduo aspartato e promove o transporte de íons através de membranas celulares (Figura 2). Essas enzimas são fundamentais para a manutenção da homeostasia celular, uma vez que são responsáveis pelo balanço osmótico e composição iônica intracelular (DONNET e cols., 2001; APELL, 2003).

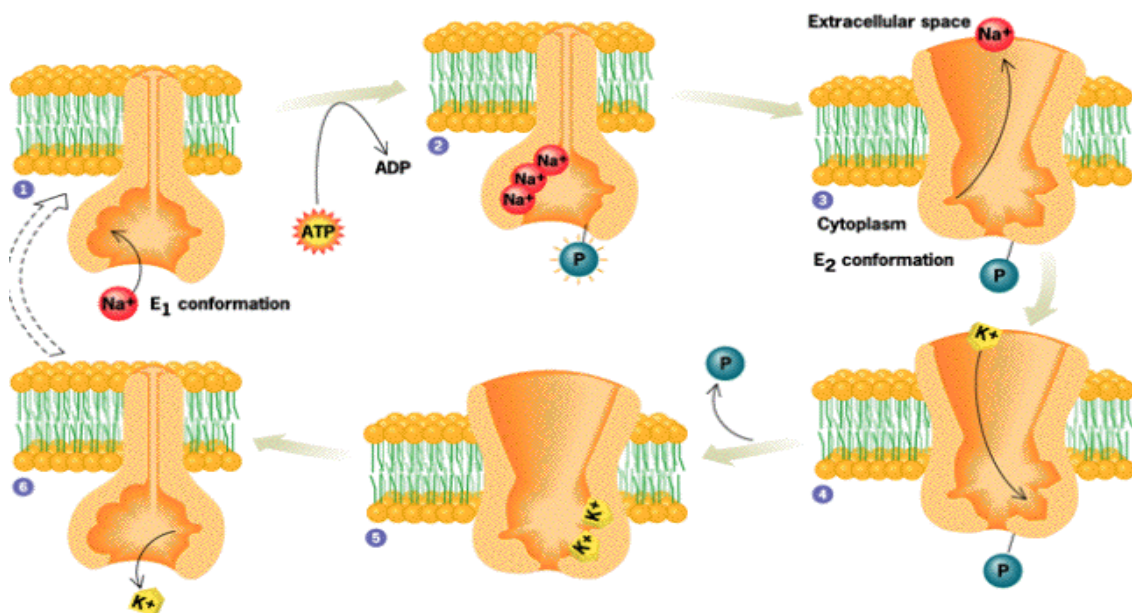


Figura 2. Ciclo catalítico proposto para a Na^+/K^+ -ATPase. A conformação E2-P (3-4) teria maior afinidade para os esteroides cardiotônicos.

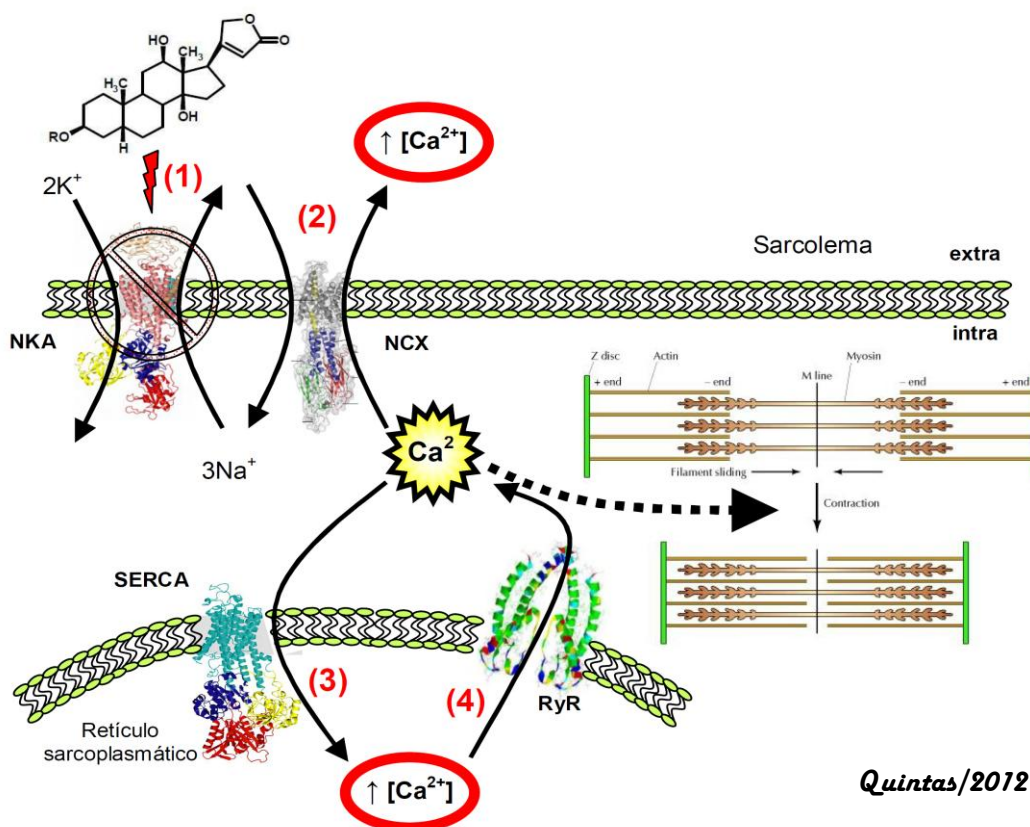
Assim, há a geração de um gradiente eletroquímico através da transdução de energia originada pela hidrólise de ATP, promovendo o efluxo de três íons Na^+ contra o influxo de dois íons K^+ . Esse gradiente se torna essencial para a excitabilidade de células nervosas e musculares e manutenção do potencial de membrana, regulação do volume celular e processos ligados ao gradiente de Na^+ . Apesar de sua grande semelhança estrutural com outras enzimas presentes em abundância nas células eucarióticas como a H^+/K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase, apenas a Na^+/K^+ -ATPase possui regulação específica por ECTs (BATISTA, 2007).

Fisiologicamente, a enzima atua como um regulador indireto da contração cardíaca, pois controla a concentração de Na^+ citoplasmática, que por sua vez controla a concentração de Ca^{2+} intracelular pela ação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. O Ca^{2+} , por sua vez, é bombeado para dentro do retículo sarcoplasmático pelas Ca^{2+} -ATPases do retículo sarcoplasmático (SERCA) (Therien e Blostein, 2000). Quando a Na^+/K^+ -ATPase é inibida, a concentração intracelular de Na^+ aumenta, o que leva a uma inibição/inversão da função do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, gerando assim aumento dos estoques de Ca^{2+} no retículo. A despolarização induz a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (tipo L). Este aumento da concentração de cálcio citossólico estimula então a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, via canais intracelulares sensíveis a rianodina, levando ao aumento na força de contração cardíaca (inotropismo positivo) e com isso ao incremento do volume de ejeção e do débito cardíaco, deficiente na insuficiência cardíaca (Figura 3).

1.2.1. Subunidades e Isoformas

A Na^+/K^+ -ATPase possui pelo menos duas subunidades polipeptídicas, α e β , que estão presentes nas células em proporções equimolares, e em alguns tecidos a subunidade da família FXYD (Figura 4). A subunidade α é uma proteína que contém 10 segmentos transmembranares composta por uma massa molecular de aproximadamente 112 kDa, esta por sua vez contém os sítios de ligação para o ATP-Mg^{2+} , para os íons Na^+ e K^+ , e para os ECTs (LINGREL, 1992; MERCER, 1993; KAPLAN, 2002). Também foram identificados nesta estrutura sítios de fosforilação por diversas cinases regulatórias e sítios de ligação para proteínas estruturais, dentre outros. Ela

apresenta quatro isoformas até então identificadas (α_1 , α_2 , α_3 e α_4), que possuem algumas diferenças entre si, como por exemplo a localização tecidual (BLANCO e MERCER, 1998; THERIEN e BLOSTEIN, 2000). A isoforma α_1 está presente em todos os tipos de células de mamíferos, por isso é chamada de ubíqua, e tem sua atividade e/ou expressão pouco influenciadas por alterações ambientais. É a única isoforma encontrada nos rins (BLANCO e MERCER, 1998). O complexo $\alpha_1\beta_1$ é encontrado em quase todos os tecidos e parece ser a forma mais comum da enzima (FAMBROUGH, 1988; SWEADNER, 1989; LEVENSON, 1994).



Quintas/2012

Figura 3. Inibição da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) pelo esteroide cardiotônico digoxina. A digoxina inibe a atividade da enzima (1), levando ao aumento nas concentrações intracelulares de Na^+ . Isso resulta em redução da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (2) levando ao aumento nas concentrações reticulares de Ca^{2+} (via Ca^{2+} -ATPase SERCA) (3) e maior mobilização de Ca^{2+} pelo canal de Ca^{2+} receptor de rianodina (RyR) (4), culminando no efeito inotrópico positivo em cardiomiócitos (5).

A isoforma α_2 , cuja expressão é influenciada por várias condições fisiopatológicas, é encontrada em musculatura lisa e estriada, cérebro (preferencialmente células da glia), adipócitos, e cartilagem e osso (NOËL e

cols, 1998; MOBASHERI e cols., 2000). A isoforma $\alpha 3$ exibe uma distribuição mais restrita, é particularmente expressa no tecido nervoso (neurônios) e tecido condutor cardíaco, sendo o aspecto modulatório menos conhecido (LUCCHESI e SWEADNER, 1991). A isoforma $\alpha 4$ é apenas encontrada no espermatozoide, na região média da cauda, e está envolvida com a motilidade espermática (SANCHEZ e cols., 2006).

Outra característica peculiar entre as isoformas é que, em roedores, a isoforma $\alpha 1$ é relativamente resistente à ação dos ECTs, enquanto que as demais ($\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) são sensíveis, exibindo alta afinidade (BLANCO e MERCER, 1998). Isso não ocorre em outros mamíferos, incluindo o homem, já que todas as isoformas apresentam alta afinidade para os ECTs.

A subunidade β é um peptídeo com um único segmento transmembranar que interage com a subunidade α de modo não-covalente e possui três sítios de glicosilação, localizada no meio extracelular. Com uma massa molecular que varia de 40 a 60 kDa, ela apresenta uma função regulatória, sendo essencial para a atividade Na^+/K^+ -ATPásica e co-responsável pela modulação da sensibilidade da enzima ao Na^+ e ao K^+ ; (BLANCO e MERCER 1998). A expressão de $\beta 1$ é ubíqua. As isoformas $\beta 2$ e $\beta 3$ são expressas no cérebro, cartilagem e eritrócitos, $\beta 2$ também pode ser encontrada em tecido cardíaco e $\beta 3$ no tecido pulmonar (MÜLLER-EHMSEN e cols., 2001).

Um outro peptídeo, localizado apenas em associação com a Na^+/K^+ -ATPase renal e designado subunidade γ , apresenta-se ligado ao complexo protéico (REEVES e cols., 1980; MERCER e cols., 1993). Sabe-se que o peptídeo γ faz parte de uma família de proteínas denominadas FXYP. No entanto, apesar de não ser essencial para a atividade da enzima, esta subunidade parece ter uma função regulatória sobre a Na^+/K^+ -ATPase, adaptando as propriedades cinéticas do transporte ativo de Na^+ e K^+ , de acordo com as necessidades celulares (GEERING, 2005).

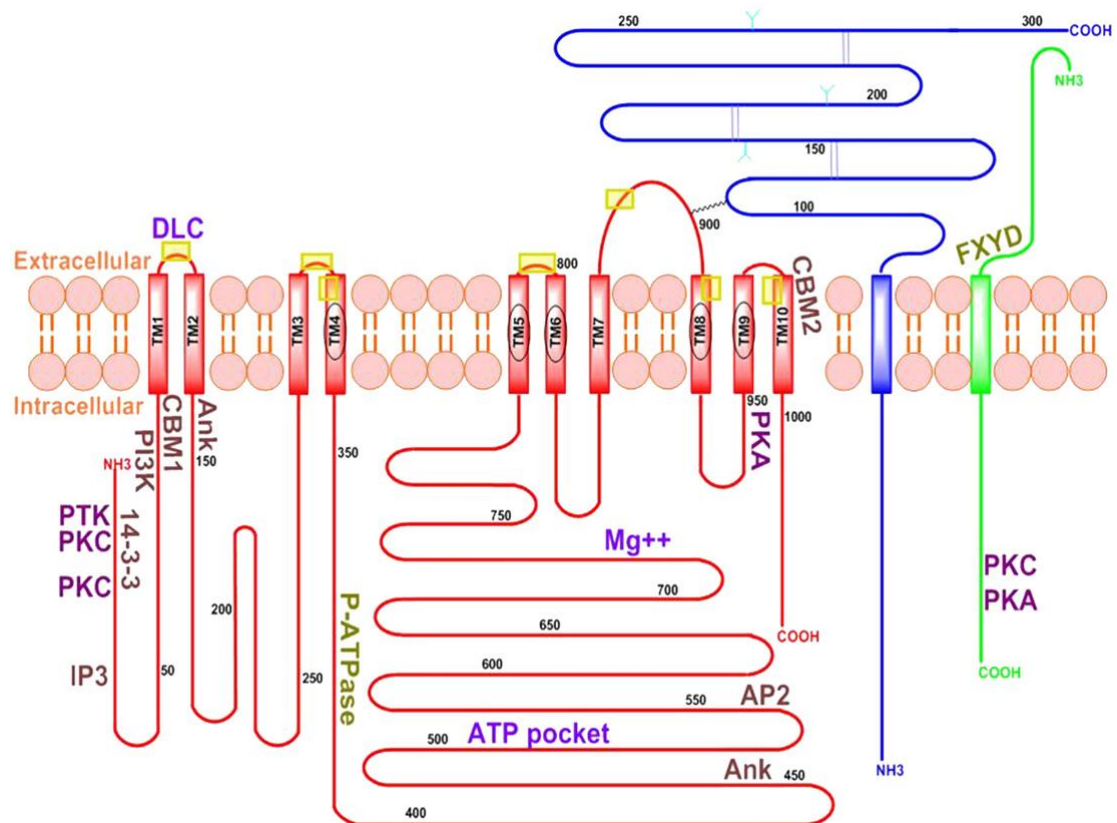


Figura 4. Estrutura da Na^+/K^+ -ATPase. Subunidades α (vermelha), β (azul) e FXYP (verde). Os retângulos amarelos indicam os sítios de ligação dos esteroides cardiotônicos (DLC). A figura ainda mostra as regiões de interação de diversos fatores (retirada de NESHER e cols., 2007).

1.3. Novas Funções da Na^+/K^+ -ATPase

A Na^+/K^+ -ATPase sempre foi descrita como uma bomba iônica e seu papel biológico derivado de tal atividade. Entretanto, desde o final da década de 1990 vem se consolidando o entendimento sobre outras funções que estão além do transporte iônico. Assim, a enzima também funciona como transdutora de sinal através de interações proteína-proteína. A cascata de ativação ocorre através da interação da enzima com ECTs, que nesse caso atuam como agonistas, e não inibidores enzimáticos, e estimulação subsequente da proteína tirosina cinase Src que transativa o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), juntamente ao recrutamento de proteínas adaptadoras e Ras, proteína G monomérica (Figura 5). Ras ativada leva ao incremento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação da cascata de proteínas cinases Ras/ Serina-Treonina cinase (Raf)/ proteína

cinase ativada por mitógeno (MEK)/ cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (XIE e ASKARI, 2002; XIE e CAI, 2003), ambas resultando em uma série de efeitos como contração, hipertrofia, proliferação e diferenciação celular, apoptose, etc (Riganti e cols., 2011). É importante notar que a quase totalidade de estudos realizados sobre essas vias abrange sobretudo a ouabaína e a isoforma $\alpha 1$ da Na^+/K^+ -ATPase (Silva e Soares-da-Silva, 2012).

Neste momento, acredita-se que existam pelo menos duas populações diferentes de Na^+/K^+ -ATPases coexistindo em equilíbrio dinâmico: uma que agiria como a clássica bomba iônica (*pumping pumps*) e outra cuja função exclusiva seria a de receptor (*nonpumping pumps*), estando relacionada à atividade de transdução de sinal (e também estrutural – ou *scaffolding* – CAI e cols., 2008). Existem indícios de que as diferentes populações de Na^+/K^+ -ATPases estariam localizadas em domínios distintos do plasmalema. As que apresentam a função bombeadora de íons estariam localizadas na maior parte da membrana plasmática. Por outro lado, aquelas que desempenham o papel de transdução de sinal estariam compartimentalizadas em um domínio específico da membrana celular que é rico em múltiplas proteínas sinalizadoras (HUNTER, 2000), as cavéolas, que são invaginações da membrana plasmática identificadas morfológicamente como microdomínios de membrana especialmente ricos em colesterol, glicoesfingolípídeos e proteínas ancoradoras a membrana por GPI (glicosilfosfatidil-inositol, COHEN e cols., 2004). A parte externa das cavéolas varia entre as células e exhibe diversos perfis de curvatura proporcionados pela proteína caveolina como principal constituinte e marcador bioquímico (Figura 5; LIU e cols., 2003; WANG e cols., 2004).

Como várias proteínas contêm domínios de ligação à caveolina (e.g., receptor acoplado a proteína G – GPCR, EGFR, tirosina cinase (Src), Ras), as caveolinas são capazes de funcionar como arcabouço para agregar moléculas sinalizadoras na cavéola, regular o estado de ativação dessas moléculas, além de potencializar interações e a eficiência do processo de sinalização (PARTON e SIMONS, 2007). Demonstrou-se que a região N-terminal da subunidade $\alpha 1$ da Na^+/K^+ -ATPase interage diretamente com a caveolina-1 *in vitro* e que em frações caveolares isoladas o complexo Na^+/K^+ -ATPase-caveolina-1-Src é responsável pela ativação de ERK1/2 em resposta a ouabaína (LIU e cols.,

2003; WANG e cols., 2004). Nesse sentido, a depleção de colesterol com metil- β -ciclodextrina ou *knockdown* de caveolina-1 *in vitro* (WANG e cols., 2004) ou o *knockout* de caveolina-1 *in vivo* (QUINTAS e cols., 2010) previnem a estimulação de ERK1/2 induzida pela ouabaína. Corroborando a proposição da existência de duas populações, tais manipulações aumentam a quantidade de Na^+/K^+ -ATPases bombeadoras, sem alterar o número total de enzimas na membrana (LIANG e cols., 2007; QUINTAS e cols., 2010).

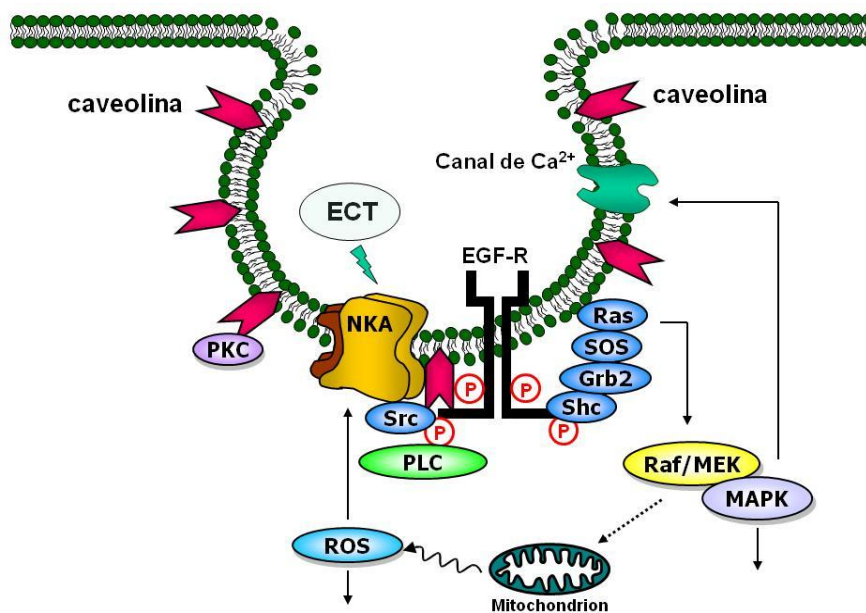


Figura 5. Na^+/K^+ -ATPase (NKA) com função sinalizadora. Em cavéolas, a interação com um esteroide cardiotônico (ECT) ativa Src, iniciando uma cascata de sinalização envolvendo transativação do EGFR e recrutamento de proteínas adaptadoras, levando a ativação da via Ras/Raf/MEK/ERK e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre outras. A proteína caveolina, essencial para a formação caveolar, também parece envolvida nesse processo. Proteínas adaptadoras: FAK (Cinase de Adesão Focal), Grb2 (Proteína 2 Ligada a Receptor de Fator de Crescimento), Shc e SOS (son of sevenless) (Retirado de SHAPIRO e cols., 2006).

1.4. Usos Terapêuticos Tradicionais e Potenciais dos Esteroides Cardiotônicos

1.4.1. Insuficiência Cardíaca Congestiva

Os ECTs têm um papel importante no tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca (IC). A IC é considerada uma epidemia no âmbito das

doenças cardiovasculares, acometendo 0,4-2% da população ocidental (KAYE e KRUM, 2007) sendo que a expectativa de vida da metade destes pacientes é de apenas de 4 anos. No Brasil, a IC foi responsável por quase 300 mil internações no ano de 2007, e continua atualmente com um custo para o Sistema Único de Saúde de 233 milhões de reais (BOCCHI e cols., 2009). A maior parte dos pacientes apresenta a IC sistólica, onde há perda de contratilidade cardíaca e uma fração de ejeção ventricular menor que a normal. Associados a farmacoterapia de base (diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, antagonistas do receptor AT1, β -bloqueadores) tratamento da IC (disfunção diastólica), a digoxina é o cardiotrópico empregado nesses pacientes, com graus mais avançados de IC e muitas vezes em fase descompensada, apesar do declínio de seu uso ambulatorial (GOLDBERGER e ALEXANDER, 2014). Curiosamente, estudos clínicos que mostravam que a digoxina possuía efeito positivo em pacientes com IC, mas não modificavam a taxa de mortalidade foram recentemente reavaliados e foi constatado que, em pacientes cujos níveis de digoxina eram relativamente baixos, a taxa de mortalidade era, de fato, reduzida (AHMED e cols., 2008), o que deu novo estímulo para a manutenção de seu uso (HELBER e TUCCI, 2010; ALPERT, 2014). No entanto, a digoxina exibe uma estreita janela terapêutica, o que dificulta o tratamento crônico e propicia o aparecimento de efeitos tóxicos potencialmente fatais (e.g., arritmias).

De acordo com o modelo tradicional de ação dos ECTs, acredita-se que os efeitos tóxicos gerados por esses agentes sejam derivados da pouca seletividade dos ECTs pelas isoformas cardíacas humanas da Na^+/K^+ -ATPase. Apesar de menos conhecido na espécie humana, experimentos com camundongos cuja isoforma $\alpha 2$ foi tornada resistente aos ECTs e em cardiomiócitos nativos isolados mostraram que essa isoforma é predominante para indução do efeito inotrópico positivo (DOSTANIC e cols., 2003; DESPA e cols, 2012). Talvez um ECT seletivo para $\alpha 2$ pudesse promover inotropismo na ausência de efeitos cardiotoxícos devidos ao influxo massivo de Ca^{2+} (FINET e cols., 1983; KATZ e cols., 2010, DESPA e BERS, 2007).

Atualmente, outra possível explicação relacionar-se-ia às novas funções da Na^+/K^+ -ATPase. Assim, enquanto baixas concentrações de ECTs ativarão a

casca de transdução de sinal mediada pela Na^+/K^+ -ATPase, concentrações elevadas resultariam em inibição da bomba de Na^+ e na superestimulação da via transdutora constituída pelo complexo binário Na^+/K^+ -ATPase-Src, conduzindo à sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e toxicidade. Até então, ambas as hipóteses não foram devidamente comprovadas, abrindo caminho para o desenvolvimento de substâncias que atuem exclusivamente pela via de sinalização por Src ou como inibidores da Na^+/K^+ -ATPase apenas.

1.4.2. Hipertensão Arterial

Novos usos terapêuticos de ligantes da Na^+/K^+ -ATPase vêm sendo considerados nos últimos anos (PRASSAS e DIAMANDIS, 2008). Por exemplo, há anos sabe-se que a administração crônica de ECTs em animais seria responsável pelo surgimento de hipertensão arterial (ROSSONI e cols., 2002) e, como descrito acima, uma grande porcentagem de pacientes hipertensos apresenta níveis elevados de ECTs endógenos. Associando-se ao fato de que, em geral, o arsenal farmacológico contra a hipertensão primária, apesar de amplo, de que a alta variabilidade individual de resposta aos tratamentos inespecíficos, novas classes de anti-hipertensivos que corrijam especificamente as alterações de base são de grande interesse (GOTO e YAMADA, 1998). Além disso, a terapia da hipertensão primária evoluiu de um conceito genérico de tratamento para uma aplicação mais individualizada, considerando os mecanismos específicos que afetam subgrupos de pacientes (TURNER e cols., 2007). Nesse momento, a única substância proposta como antagonista dos ECTs é a rostafuroxina ou PST 2238 (Figura 6), um derivado da digitoxigenina que antagoniza seletivamente o efeito pressor e hipertrófico da ouabaína (FERRANDI e cols., 2005). Atualmente, encontra-se em nova fase II de avaliação clínica já que o primeiro ensaio clínico foi mal sucedido possivelmente pela escolha aleatória dos hipertensos (STAESSEN e cols., 2011).

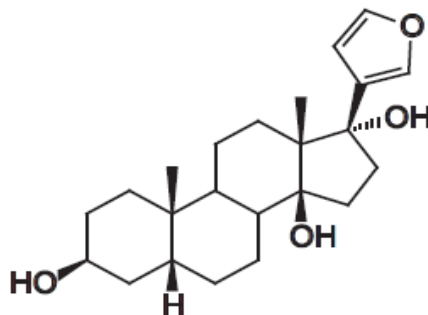


Figura 6: Estrutura química da rosfuroxina

1.4.3. Câncer

Acredita-se que estes compostos tem um grande potencial para o tratamento do câncer (WANG e cols., 2012). As primeiras evidências de que os ECTs possuíam um efeito antitumoral foram baseadas em ensaios clínicos de mulheres com câncer de mama, onde uma fração era tratada com digitálicos, principalmente digoxina, mostrando uma menor capacidade proliferativa que células tumorais (STENKVIST e cols., 1979, 1980) e menor taxa de mortalidade a médio (STENKVIST e cols., 1982) e longo prazo (MENGER e cols., 2013). Estudos mais recentes começaram a demonstrar efeitos antiproliferativos e apoptóticos dessas substâncias em várias linhagens de células tumorais humanas, como câncer de mama (LOPEZ-LAZARO e cols., 2005), próstata (HUANG e cols., 2004), melanoma (NEWMAN e cols., 2006), pulmão (MIJATOVIC e cols., 2007), pâncreas (NEWMAN e cols., 2007), leucemia (RAGHAVENDRA e cols., 2007), neuroblastoma (KULIKOV e cols., 2007) e adenocarcinoma renal (LOPEZ-LAZARO e cols., 2005). Relatos recentes indicam que os ECTs podem inibir o crescimento e induzir apoptose em células tumorais em concentrações comumente encontradas no plasma de pacientes com insuficiência cardíaca tratados com digitálicos (BABULA e cols., 2013). Esses efeitos antiproliferativos e apoptóticos parecem estar relacionados à ativação de cascatas de sinalização da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, que envolveriam as mesmas vias relacionadas com a proliferação celular, que englobam proteína cinase ativada por MAPK, a Src e a transativação do EGFR. Entretanto, existem propostas de outros mecanismos que aparentemente não envolvem a

Na⁺/K⁺-ATPase. Um dado muito interessante dos ECTs é que eles apresentam efeitos diferentes nas células normais e nas células tumorais, pois podem ser inativos/proliferativos em células normais e causar a morte das células tumorais (XIE e cols., 2002; MCCONKEY e cols., 2000; MIJATOVIC e cols., 2007; TIAN e cols., 2009). Células tumorais apresentam mudanças de atividade e expressão da Na⁺/K⁺-ATPase. Alguns estudos mostraram que existe maior sensibilidade da Na⁺/K⁺-ATPase aos ECTs em células tumorais, o que poderia estar relacionado a uma densidade populacional alterada desse transportador na membrana plasmática. Em geral, observa-se uma expressão reduzida das subunidades α e β , e por outro lado, aumento da atividade enzimática, apesar de dados contrários terem sido reportados (MIJATOVIC e cols., 2007). Em um elegante trabalho conduzido por Tian e colaboradores (2009), mostrou-se que, em células normais, a via Akt-mTOR é estimulada por baixas concentrações de ECTs levando a um aumento da expressão de Na⁺/K⁺-ATPase e proliferação celular enquanto que células tumorais perdem a capacidade de sinalização intracelular, resultando em aumento da expressão da proteína inibidora da cinase dependente de ciclina (CDK1) e paralelamente impedindo o aumento de expressão de Na⁺/K⁺-ATPase, bloqueando o ciclo celular. Ou seja, a ineficácia na transdução de sinal induzida por ECTs e mediada pela Na⁺/K⁺-ATPase teria um efeito diferencial no destino de células tumorais quando comparadas com células normais.

Pelos motivos expostos acima, vem sendo observado um número crescente de pedidos de patente de ligantes da Na⁺/K⁺-ATPase, ECTs ou não, com aplicação para certos tipos de cânceres refratários aos tratamentos convencionais (MIJATOVIC e cols., 2012). Ademais, alguns ensaios clínicos concentram-se atualmente nos possíveis usos dos ECTs no tratamento do câncer. Desses, uns poucos se encontram em Fase II, em monoterapia ou em combinação com agentes anticancerígenos já estabelecidos (Tabela 1).

Todavia, os digitálicos usados clinicamente (e.g., digoxina) apresentam baixo índice terapêutico e os efeitos cardiotóxicos podem ser graves, o que pode restringir sua investigação e o desenvolvimento mais aprofundados como fármacos antitumorais, mas impulsiona a busca por novos ligantes da Na⁺/K⁺-ATPase, derivados ou não dos digitálicos, que possam reter o efeito antitumoral em detrimento da cardiotoxicidade (WANG e O'DOHERTY, 2012).

Tabela 1. Ensaios clínicos de esteróides cardiotônicos na terapia dos cânceres (Retirado de (BABULA e cols., 2014))

Esteróides Cardíacos (Combinações)	Condições	Fase de ensaio clínico	Identificador
Digoxina +lapatinibe	Câncer de mama que superexpressão ErbB2	Fase I	NCT00650910
Digoxina	Recorrente em câncer de próstata	Fase II	NCT01162135
Digoxina + erbotinibe	Células não-pequenas carcinoma pulmonar	Fase II	NCT00281021
PBI-05204	Tumores sólidos	Fase I	NCT00554268
UNBS1450	Tumores sólidos avançados	Fase I	NCT00415038
Huachansu (=extrato de pele de sapo bufo)+gencitabina	Adenocarcinoma pancreático irressecável	Fase II	NCT00837239

1.5. Busca de Novos Ligantes da Na^+/K^+ -ATPase e Seletividade Funcional

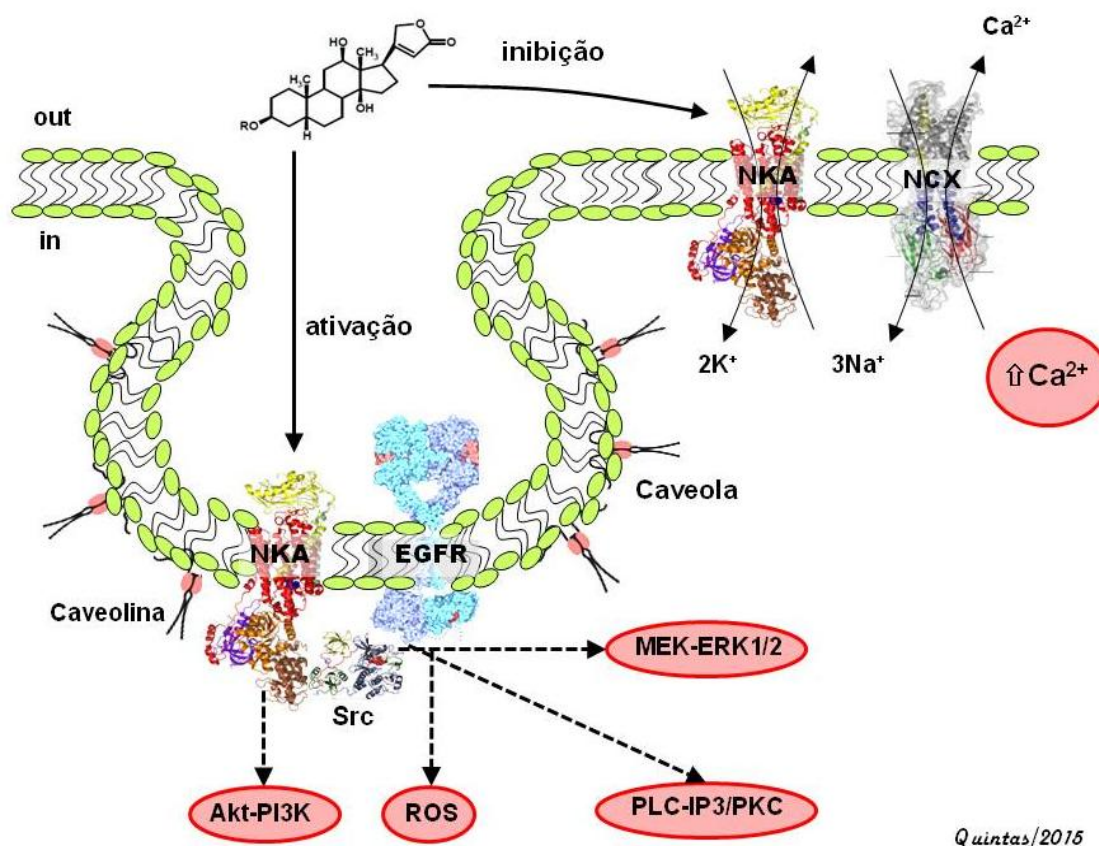
Enfim, observa-se que o desenvolvimento de novos ligantes da Na^+/K^+ -ATPase suscita grande interesse não apenas acadêmico como também da indústria farmacêutica. Assim, a procura por fármacos inotrópicos “ideais” torna-se uma necessidade se avaliarmos os inúmeros casos de IC, nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, e a limitação como, por exemplo: cardiotoxicidade dos fármacos inotrópicos atualmente utilizados. Da mesma forma acontece com novos fármacos contra hipertensão e câncer. Nesse último caso, é notável que apesar da investigação experimental dos ECTs como antitumorais esteja em pleno desenvolvimento, os trabalhos que propõem o estabelecimento de modificações sintéticas dos ECTs com este objetivo são escassos (LANGENHAN e cols., 2005; CUNHA-FILHO e cols., 2010). Por outro lado, existe o entendimento de que é importante conservar a estrutura química básica dos ECTs para o desenvolvimento de novos ligantes da Na^+/K^+ -ATPase, uma vez que a excessiva simplificação de sua estrutura, realizada por vários grupos, resultou no fracasso de obtenção dos mesmos (CERRI e GOBBINI, 2003).

Em uma tentativa de identificar requisitos estruturais dos ECTs que sejam importantes para o efeito antitumoral, MIJATOVIC e colaboradores (2012a) realizaram uma meta-análise de dados produzidos por diversos grupos de pesquisa e gerar informações primárias sobre relação estrutura-atividade. Uma das principais conclusões é que a perda ou abertura do anel lactônico influencia negativamente na ligação e potencial citotóxico, porém a posição, orientação e grupamentos relevantes para o melhoramento da atividade antitumoral ainda são obscuros.

Uma das premissas básicas da Farmacologia é que a especificidade da resposta farmacológica se dá através da interação entre o fármaco, ou ligante, e o receptor, entidade macromolecular presente na célula e responsável pela deflagração do efeito. Os ligantes podem assim ser caracterizados pela sua afinidade ao receptor e eficácia, ou seja, a capacidade de geração da resposta. Nesse contexto, a classificação em agonistas (plenos, parciais ou inversos) e antagonistas foi criada considerando estes um parâmetro que independe do sistema (célula), sendo constante para um determinado par ligante e receptor (KENAKIN e WILLIAMS, 2014).

Esta visão tem se modificado nos últimos anos, particularmente por estudos de receptores acoplados a proteína G (GPCR) que revelaram que alguns ligantes apresentavam diferentes respostas mediadas pelo mesmo e único receptor, dependendo do sistema em questão. Com o crescente número de resultados apontando nessa direção, foram postuladas hipóteses mecanísticas quanto a esse desvio do corolário da interação fármaco-receptor, recebendo vários nomes como *agonismo enviesado*, *agonismo variável*, *acoplamento diferencial*, *eficácia colateral*, *seletividade funcional*, dentre outros (URBAN e cols., 2007; KENAKIN, 2011). Neste contexto, o ligante teria a propriedade de induzir (corroborando com a teoria do ajuste induzido, proposta por KOSHLAND em 1958) ou selecionar (corroborando com a teoria da seleção conformacional, proposta por BURGEN em 1998) uma conformação do receptor que poderia ou não resultar na transdução de sinais intracelulares. Ou seja, estando o receptor estabilizado pelo ligante em uma determinada conformação termodinamicamente favorável, múltiplas possibilidades de ativação (ou de inativação) de vias de sinalização seriam esperadas (URBAN e cols., 2007; KENAKIN, 2011). Com a série de possibilidades hoje conhecidas

em relação ao mecanismo de ação e efeito dos ECTs, o conceito de seletividade funcional deve ser considerado para ligantes da Na^+/K^+ -ATPase (Figura 7). Neste contexto, o desenvolvimento e avaliação farmacológica de agentes que possam especificamente agir sobre a função sinalizadora da Na^+/K^+ -ATPase sem afetar a função bombeadora, ou vice-versa, ofereceria não apenas a oportunidade singular de novas ferramentas para a investigação da cascata de sinalização da Na^+/K^+ -ATPase mas também propor novas abordagens para o tratamento de doenças cardiovasculares e oncológicas.



Quintas/2015

Figura 7. Novas possibilidades de ação dos esteroides cardiotônicos (ECTs). A interação dos ECTs com a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) podem resultar tanto na clássica inibição da atividade enzimática/bombeadora de íons quanto na atual modulação da função sinalizadora. ECTs com seletividade funcional teriam preferência por um ou outro mecanismo de ação.

Como a digoxina é utilizada clinicamente há décadas e há um extenso conhecimento sobre sua farmacologia e terapêutica, abordagens químicas

para alteração da molécula e a investigação de eventuais otimizações de novas características farmacológicas como, por exemplo, a seletividade do efeito antitumoral, são consideradas estratégias racionais e de interesse científico. Nesse contexto, a adição do grupo estireno no anel lactônico foi realizada e parte dos achados, que constam nesta dissertação, foi publicada por nosso grupo (ROCHA e cols., 2014; ALVES e cols., 2015). Outros resultados originais, não publicados, também fazem parte desta dissertação.

Objetivo



2. OBJETIVO

Tendo em vista que novos ECTs podem ser considerados como futuros agentes cardiotônicos, anti-hipertensivos e/ou antitumorais, este trabalho pretende avaliar os efeitos celulares e moleculares de novos derivados de digoxina.

2.1. Metas

1. Avaliar a inibição da digoxina e de seus derivados (DGB1 à DGB7) sobre a atividade Na^+/K^+ -ATPásica;
2. Avaliar a ligação desses ECTs à Na^+/K^+ -ATPase;
3. Avaliar o efeito desses ECTs sobre a proliferação celular;
4. Avaliar a cascata de sinalização mediada pela Na^+/K^+ -ATPase.

Materiais e Métodos



5. MATERIAIS E MÉTODOS

6. Obtenção dos derivados da digoxina

Para realização deste trabalho tivemos a colaboração do Prof. Leandro Augusto de Oliveira Barbosa e do Prof. José Augusto Ferreira Perez Villar (CCS, Universidade Federal de São João del Rei – UFSJ) que realizaram, respectivamente, o planejamento e a síntese de sete derivados, alguns originais da digoxina (DGB1 à DGB7) utilizando ela própria como precursora. As modificações ocorreram através da adição de grupos funcionais no anel lactônico (Figura 1; Rocha e cols., 2014). Essas substâncias apresentam estrutura e peso molecular definidos. Elas foram testadas em comparação com a digoxina, utilizada como padrão dos nossos estudos.

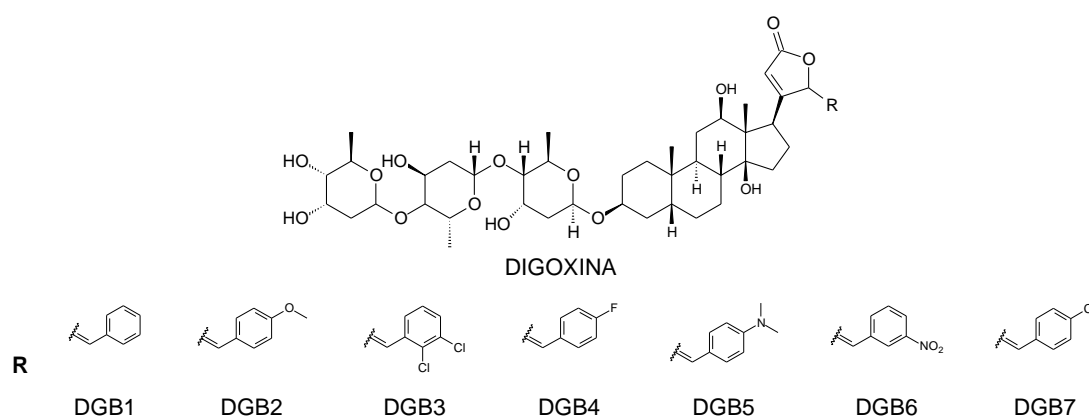


Figura 6. Estrutura química da digoxina e os grupamentos químicos adicionados na posição R da lactona para geração dos derivados DGB1-7.

7. Linhagem celular

A linhagem celular LLC-PK1, células epiteliais renais derivadas de túbulo proximal de porco, foi gentilmente cedida pelos Profs. Marcelo Einicker Lamas e Celso Caruso Neves (IBCCF, UFRJ) e utilizada para os experimentos. As células foram mantidas em estufa (37°C, 5% CO₂; Hitashi, Japão) em meio de cultura DMEM (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA) NaHCO₃ (44 mM) e gentamicina (40 mg/L) (pH 7,4). Quando

confluentes, as células foram subcultivadas utilizando solução EDTA-tripsina 0,25% (Invitrogen, EUA).

8. **Obtenção e preparação dos órgãos**

Essa etapa foi realizada de acordo com Bettero e cols. (2011) e Touza e cols. (2011). Ratos Wistar, albinos, machos, entre 3 e 4 meses de idade foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação, tendo seus cérebros imediatamente retirados, de acordo com protocolo aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais do CCS-UFRJ (Processo DFBCICB011). Os cérebros (hemisférios cerebrais – HC) foram colocados sobre uma placa de gelo, onde os hemisférios foram rapidamente dissecados e lavados com solução de sacarose tamponada gelada.

Amostras de tecido renal humano (do polo não afetado) foram obtidas de pacientes submetidos à nefrectomia unilateral devido a hipernefroma bem encapsulado em um dos polos renais. Todos os procedimentos para a utilização de partes de órgãos descartados foram feitos de acordo com o Comitê Institucional de Ética (CEP-038/08). Uma porção do órgão que não havia sido afetada pelo tumor foi retirada e mantida em solução de Tyrode gelada para o transporte.

Os órgãos (HC e rim) foram secos com auxílio de um papel de filtro, pesados e armazenados em ultra-freezer a -70°C até a preparação do homogeneizado.

Para preparação purificada em Na^+/K^+ -ATPase, os HCs de rato ou amostras de rim humano foram homogeneizados com Potter elétrico (Fisatom, Brasil) com a solução sacarose-HOMOG na proporção de 3 mL/g de tecido, em 3 passagens de 30 s. No caso do rim humano, pela sua textura, ele foi anteriormente picotado com tesoura em pequenos pedaços e em seguida foram homogeneizados em Ultra-Turrax com a solução sacarose-HOMOG com PMSF 0,1 mM em uma proporção de 5 mL/g de tecido. O homogeneizado foi então submetido a tratamento caotrópico, que constitui em incubação na presença de altas concentrações de KI (4 M) sob agitação constante com auxílio de um agitador magnético por 1 h a 4°C , na proporção de 1:1. Em seguida foi adicionada água ultrapura gelada na proporção de 1,5 mL/mL de homogeneizado. Esta suspensão foi submetida a 3 centrifugações de 1 h a

100.000xg sendo os dois primeiros sedimentos ressuspensos em sacarose-HOMOG e o último, em sacarose-DOC, na proporção de 10 mL/g de tecido, permanecendo em freezer a -18°C durante uma noite. Após este período, o homogeneizado foi descongelado à temperatura ambiente e submetido a centrifugações diferenciais (Noël e Godfraind, 1984). O sedimento final foi ressuspenso em solução de sacarose tamponada com auxílio de um homogeneizador manual do tipo Dounce (0,2 mL/g de tecido).

9. **Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas foi adaptada para microplacas, segundo uma modificação do método colorimétrico proposto por Lowry e cols. (1951). Para realização da curva-padrão, foi utilizada a albumina sérica bovina (BSA), cujas concentrações variaram entre 50 e 350 μg de BSA/mL. Nos poços destinados a curva-padrão foram adicionados 30 μL de cada concentração. Nos outros poços, foram adicionados 30 μL de proteína diluída. Em seguida, em todos os 96 poços da microplaca foi adicionado 250 μL de solução contendo Na_2CO_3 2%, NaOH 0,1% e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5%, seguido da adição de 15 μL do reagente de Folin-Ciocalteus (Merck, EUA). Após um intervalo de 45 min, os valores de absorvância foram obtidos em leitor de microplaca (Tecan, EUA) no comprimento de onda de 700 nm. Os cálculos foram realizados utilizando-se a curva-padrão de absorvância *versus* concentração de proteína, por regressão linear utilizando o software GraphPad Prism[®] (versão 4, GraphPad Software, EUA). O resultado do conteúdo de proteína foi expresso em mg proteína/mL de homogeneizado.

10. **Inibição da atividade Na^+/K^+ -ATPásica**

A atividade ATPásica foi determinada segundo o método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925), o qual se baseou na determinação quantitativa do fosfato inorgânico (Pi) liberado devido à hidrólise enzimática do ATP. A reação foi processada em meio apropriado (item Soluções) à 37°C em banho-maria, contendo concentrações crescentes das DGBs 1-7, e foi iniciada após a adição da proteína devidamente diluída (70x) em solução de sacarose tamponada. Após 2 h de incubação, a reação foi interrompida pela adição de solução de Fiske gelada. Assim, o Pi produzido pela hidrólise enzimática do ATP foi levado

a reagir com o molibdato de amônio, formando o fosfomolibdato de amônio e os valores de absorbância foram determinados por espectrofotômetro (650 nm), após 20 min da adição do reagente de Fiske. A avaliação da inibição da atividade Na^+/K^+ -ATPásica foi realizada através da comparação entre a diferença dos valores de atividade ATPásica total e de atividade basal (estes obtidos na ausência de KCl e em presença de 1 mM de ouabaína – inibidor específico da Na^+/K^+ -ATPase em concentração que atinge a inibição máxima), que caracteriza a atividade sensível à ouabaína (i.e., Na^+/K^+ -ATPásica; Lopez e cols., 2002) e os valores de atividade na presença do ligante a ser testado. Foram preparadas soluções estoques dos esteroides em DMSO, as quais foram acondicionadas à -20°C , e depois diluídas em água para realização das soluções de trabalho. Avaliamos a potência farmacológica dos ligantes através da análise de curvas de inibição e do cálculo dos valores de CI_{50} , concentração do inibidor na qual se obtém 50% da inibição máxima ($I_{\text{máx}}$), por regressão não-linear, como descrito por Touza e cols. (2011).

11. Avaliação da proliferação celular

As células de linhagem LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial entre $1-2 \times 10^4$ células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37°C , 5% CO_2). Após 1 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de diferentes concentrações de digoxina e DGBs 1-7 (1, 10, 100 nM e 1 μM), por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h), para estudo do efeito sobre a proliferação celular. Para proliferação, em cada tempo indicado as células-controle e tratadas de dois poços foram retiradas com tripsina e as células centrifugadas à 2.500 rpm, por 3 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, e em seguida as células foram ressuspensas em solução PBS para contagem. As células foram coradas com azul de Tripán e a contagem foi realizada em hemocítômetro de Neubauer (Amaral, 2011). As células controles e tratadas com digoxina foram fotografadas por microscopia de contraste de fase para avaliação do perfil morfológico (Software CellSens 1.5, Microscópio Olympus IX71, Olympus America, EUA).

12. Avaliação da sinalização intracelular por Western blot

As células LLC-PK1 cultivadas em placas de 6 poços (Techno Plastic Products/TPP, Suíça), ao atingirem 70-90% de confluência, foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com DMEM sem soro durante 12-24 h. Após esse período, as células foram tratadas com digoxina, como padrão, e DGBs em diferentes concentrações (10 e 100 nM) por 15 min. O meio então foi retirado, as células lavadas com PBS e lisadas com tampão de radioimunoensaio modificado (RIPA). O lisado celular foi centrifugado à 13.000xg por 15 min, o sobrenadante foi recolhido para dosagem protéica e experimentos de Western blot para avaliação da ativação de ERK1/2.

A técnica foi realizada como descrita anteriormente (Quintas e cols., 2010; Amaral, 2011). As preparações celulares de LLC-PK1 (20-40 µg proteína/poço) foram diluídas em tampão de amostra na proporção 3:1 (volume de preparação:volume de amostra) e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-PAGE). Foi utilizado padrão de peso molecular para comparação das bandas ao final do experimento. Após a corrida, as amostras foram eletrotransferidas para membrana de PVDF durante 2 h. Em seguida, as membranas foram coradas com Rouge de Ponceau por 5-10 min para visualização das proteínas transferidas e então incubadas por 1 h em solução TBS com Tween 20 0,1% (TBS-T) e 5% de leite desnatado (Molico[®]), com agitação constante, visando evitar a marcação inespecífica do anticorpo à membrana, e incubadas durante uma noite com anticorpos monoclonais primários de coelho contra as proteínas cinases ERK 1/2 (fosforiladas ou totais) e por mais 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugados à peroxidase. A imunoreatividade foi detectada pelo sistema Supersignal (Pierce, EUA). As autorradiografias foram escaneadas em Scanner (HP Scanjet G4050) e quantificadas por análise densitométrica utilizando o software ImageJ (versão 1.42q, EUA).

13. Ensaios de ligação com [³H]ouabaína

Os ensaios de ligação foram realizados com uma concentração fixa de [³H]ouabaína (10 nM), na ausência ou presença de uma alta concentração de digoxina, DGB1, DGB2 ou DGB4 (10 µM). A reação foi iniciada por meio da

adição de 250 µg de proteína a cada um dos tubos contendo um meio de incubação contendo 3 mM MgCl₂ e 3 mM H₃PO₄, tamponado com TRIS (pH 7,4). Após 4 h, o processo foi interrompido pela adição de tampão Tris-HCl 5 mM gelado (3 x 4 mL), seguido de filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro com 25 mm de diâmetro (GMF 3, Filtrak, Alemanha). A ligação inespecífica, nesse caso, foi definida na presença de uma concentração elevada de ouabaína não marcada (1 µM), sendo a radioatividade retida no filtro determinada através de espectroscopia de cintilação líquida em contador Tri Carb 2100TR (Packard, EUA).

14. Análise dos Dados

As análises estatísticas foram feitas por ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls, utilizando o software GraphPad Prism[®] (versão 4, GraphPad Software, EUA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados representam os resultados de três ou mais experimentos e foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

15. Soluções

Sacarose tamponada

Sacarose	250 mM
Tris 5 mM-HCl	até pH 7,2 à temperatura ambiente

Sacarose-HOMOG

Sacarose	250 mM
DTT	2 mM
Tris 5 mM-HCl	até pH 7,2 à temperatura ambiente
PMSF	0,1 mM, adicionar quando usar

Sacarose-DOC

Sacarose	250 mM
Desoxicolato de sódio	0,1% (m/v), após aferir o pH
Ac. Maleico 20 mM-Tris	até pH 7,2 à temperatura ambiente

Solução de Fiske

NaHSO ₃	1,45 mM
Na ₂ SO ₃	2,19 mM
Ácido 2-amino 2-hidroxi naftaleno sulfônico	0,19 mM
Molibdato de amônio	3 mM
H ₂ SO ₄	375 mM

Meio de incubação para inibição da atividade Na⁺/K⁺-ATPásica

NaCl	90 mM
KCl	3 mM
MgCl ₂	3 mM
ATPNa ₂	3 mM
EGTA	1 mM
Tampão maleato-Tris 20 mM	pH 7,4 a 37°C

Tampão fosfato salino (PBS)

NaCl	125 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
NaH ₂ PO ₄	2 mM
KCl	5 mM

Tampão de radioimunoensaio modificado (RIPA)

NP-40	1%
Desoxicolato de sódio	0,25%
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
PMSF	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF	1 mM
Aprotinina	10 µg/mL
Leupeptina	10 µg/mL
Ácido ocadáico	10 nM
Tris 50 mM-HCl	até pH 7,2 à temperatura ambiente

Líquido de cintilação

POPOP	0,1 g
PPO	4,0 g
Tolueno	1 L

Tampão de amostra

Glicerol	30%
SDS	10%
2-Mercaptoetanol	15%
Bromofenol 1%	0,03%
Tampão Tris 0,5 M-HCl (pH 6,8)	24%

Tampão de corrida

Glicina	21,6 g
SDS	1,5 g
Tris base 4,5 g-HCl	até pH 8,3 à temperatura ambiente
H ₂ O	qsp 300 mL

Solução corante Rouge de Ponceau

Rouge de Ponceau	0,2%
Ácido tricloroacético	3%

Solução TBS-T

NaCl	4,0 g
Tween 20	0,1%
Tris 1,21 g-HCl	até pH 7,6 à temperatura ambiente
H ₂ O	qsp 1 L

Solução de lavagem

Tris 5 mM-HCl	até pH 7,4 a 4°C
---------------	-------	------------------

Tampão de transferência

Glicina	21,6 g
---------	-------	--------

Tris	4,55 g
Metanol	300 mL
H ₂ O	qsp 1,5 L

Solução A

Acrilamida	7,3 g
Bis-acrilamida	0,2 g
H ₂ Odd	qsp 25 mL

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Inibição da atividade Na^+/K^+ -ATPásica

Os experimentos iniciais foram destinados a avaliar os diferentes derivados da digoxina (DGB1-7) quanto ao clássico efeito de inibição da atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase. Escolhemos a preparação de rim humano pela relevância clínica e por apresentar apenas a isoenzima $\alpha 1\beta 1$. Como mostrado na Figura 7, quando comparados ao ECT padrão digoxina, as DGBs apresentaram diferentes perfis de inibição, onde algumas exibiram uma potência inibitória semelhante a digoxina (DGB2 e DGB4), duas apresentaram uma menor potência (DGB5 e DGB6) e outras praticamente não inibiram (ou inibiram de forma atípica) a enzima (DGB1, DGB3 e DGB7). As concentrações inibitórias médias estão colocadas na Tabela 2. Nota-se que fomos limitados quanto a utilização de concentrações maiores, que poderiam ter facilitado a estimação dos valores de CI_{50} , pela baixa solubilidade dos DGBs e pelo efeito intrínseco do solvente DMSO quando usado em concentração elevada.

Para verificar se esse perfil era compartilhado por outras isoformas da Na^+/K^+ -ATPase, realizamos em seguida experimentos com preparações purificadas de hemisférios cerebrais (HC) de rato, enriquecidas com as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$, com uma pequena proporção de $\alpha 1$ (aproximadamente 20%), que em roedores é pouco sensível aos cardenolidos. Como podemos avaliar nos gráficos da Figura 8, a digoxina inibe a atividade Na^+/K^+ -ATPásica de forma bifásica, ou seja, em concentrações menores inibe as isoformas de maior afinidade $\alpha 2$ e $\alpha 3$, enquanto que em concentrações mais altas inibe $\alpha 1$. É interessante notar que globalmente observamos o mesmo perfil visto com a $\alpha 1$ humana, havendo uma gradação na potência inibitória. DGB1 e DGB7 não inibem mesmo na faixa micromolar de concentração (Figura 8 e Tabela 2).

Apesar desses derivados serem semelhantes estruturalmente, eles apresentaram perfis de inibição enzimática muito diferentes entre si e esses resultados nos guiaram para nossos próximos passos.

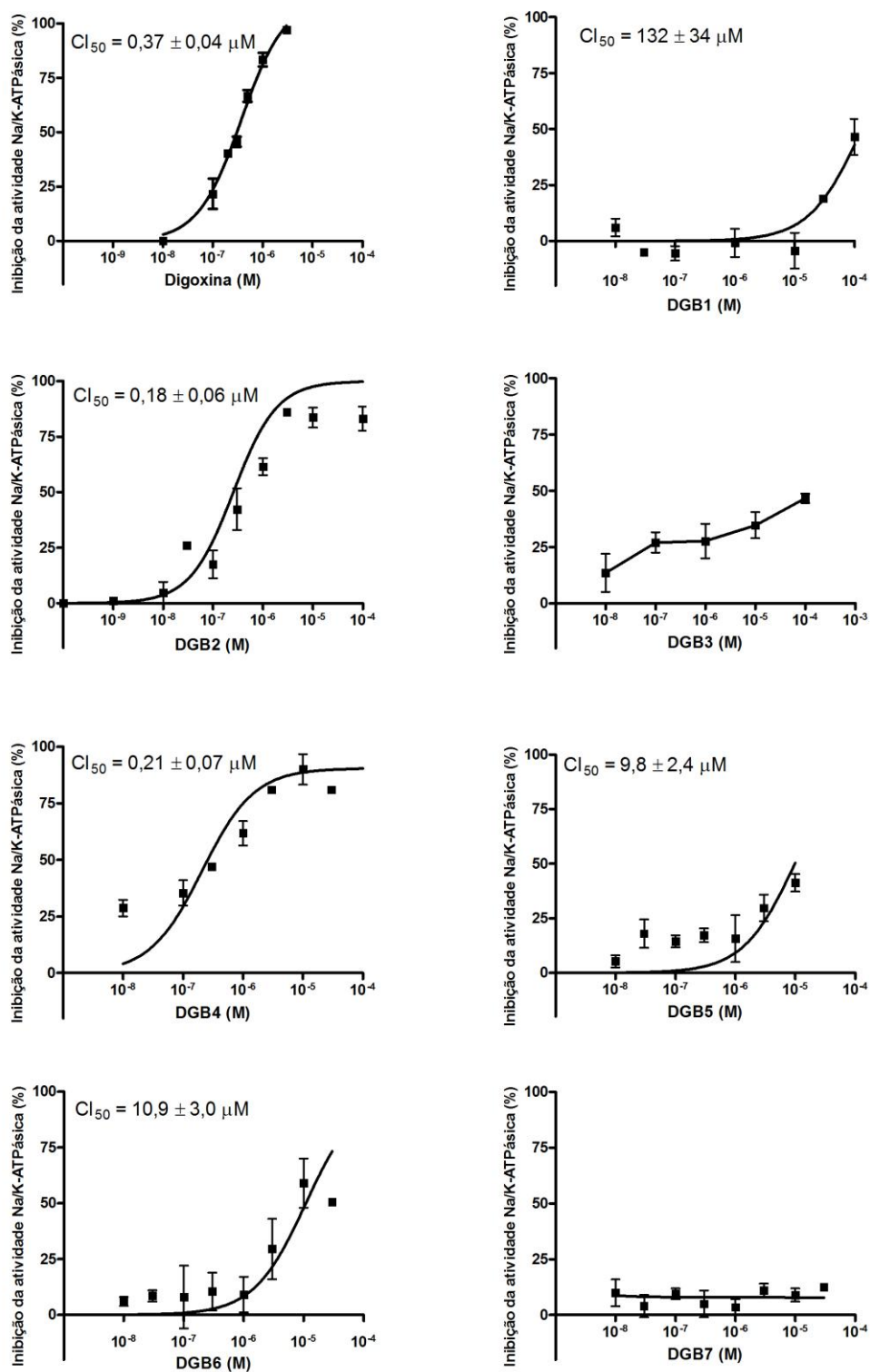


Figura 7. Perfil de inibição da digoxina e DGBs sobre a atividade Na⁺/K⁺-ATPásica em preparações membranares de rim humano. Cada ponto representa a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos realizados em triplicata.

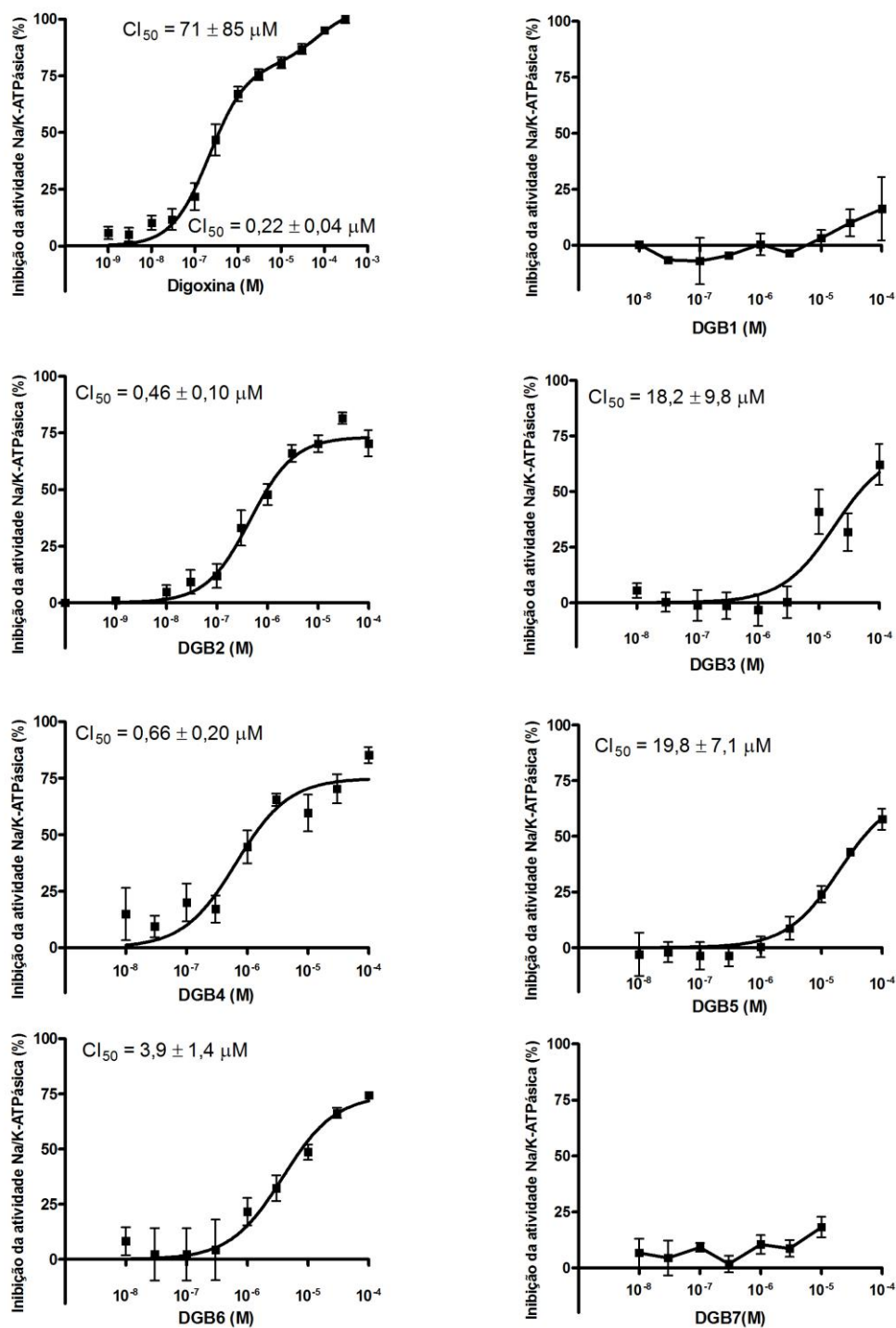
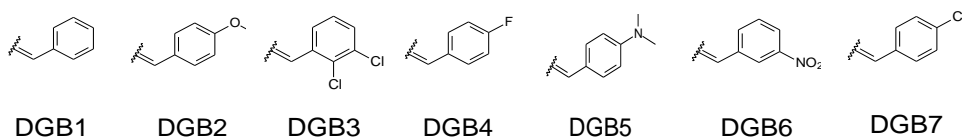


Figura 8. Perfil de inibição da digoxina e DGBs sobre a atividade Na⁺/K⁺-ATPásica em preparações purificadas de hemisférios cerebrais de rato. Cada ponto representa a média ± EPM de pelo menos 3 experimentos realizados em triplicata.

Tabela 2. Potência de inibição Na⁺/K⁺-ATPásica da digoxina e DGBs

	CI ₅₀ ± EPM (µM)							
	Digoxina	DGB1	DGB2	DGB3	DGB4	DGB5	DGB6	DGB7
Rim humano (α1)	0,29 ± 0,02	> 100	0,57 ± 0,10	-	0,34 ± 0,09	9,8 ± 2,4	11 ± 3	-
HC rato (α2/α3)	0,22 ± 0,04	-	0,46 ± 0,10	18 ± 10	0,66 ± 0,20	20 ± 7	4 ± 1	-

HC: hemisférios cerebrais



4.2. Ligação à Na⁺/K⁺-ATPase

Para avaliar a capacidade de ligação dos DGBs à Na⁺/K⁺-ATPase, realizamos experimentos de deslocamento da ligação da [³H]ouabaína, que reconhecidamente interage de forma específica à Na⁺/K⁺-ATPase. Este ensaio permite estimar a interação fármaco-receptor de forma indireta, através da competição entre o ligante radioativo e as substâncias-teste não radioativas que competem pelo mesmo sítio de ligação do receptor.

Assim, decidimos realizar este ensaio para algumas de nossas substâncias em concentrações fixas (10 µM): DGB1, que não inibe a atividade enzimática, e DGB2 e DGB4, que exibem um perfil de inibição semelhante ao da digoxina, além da própria digoxina.

Podemos observar que os resultados corroboram com os nossos dados obtidos nos ensaios de inibição enzimática. A digoxina, como esperado, promoveu a dissociação do complexo radioligante-receptor quase completamente, e DGB2 e DGB4 seguiram o mesmo padrão (Figura 9). Por outro lado, DGB1 não teve efeito sobre a ligação do radioligante ao seu receptor (Figura 9).

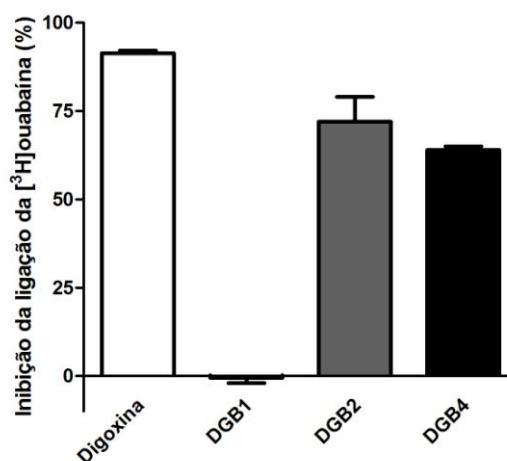


Figura 9. Inibição da ligação da [³H]ouabaina à Na⁺/K⁺-ATPase pela digoxina e DGBs (10 μM) em preparações membranares de rim humano. Os valores representam a média ± EPM de 2 experimentos realizados em quadruplicata.

4.3. Proliferação celular

Já foi mostrado por nós (QUINTAS e cols., 2010; LUCAS e cols., 2012) e outros (NESHER e cols., 2007; TIAN e cols., 2009) que a sinalização mediada pela Na⁺/K⁺-ATPase caveolar é responsável pela proliferação de diversos tipos celulares com baixas concentrações de ECTs, enquanto que sabe-se há décadas que concentrações mais elevadas levam a morte celular por inibição massiva do transporte de Na⁺ e K⁺ (GINN e cols., 1998). Assim, após os experimentos de inibição enzimática e ligação, decidimos então verificar o efeito dessas substâncias sobre a proliferação celular. Para isso utilizamos células da linhagem LLC-PK1, cuja caracterização desse efeito está bem descrita (TIAN e cols., 2009) e cuja afinidade aos ECTs é semelhante a do homem, tratadas com 1, 10, 100 nM, 1, 10 ou 20 μM de digoxina ou DGBs.

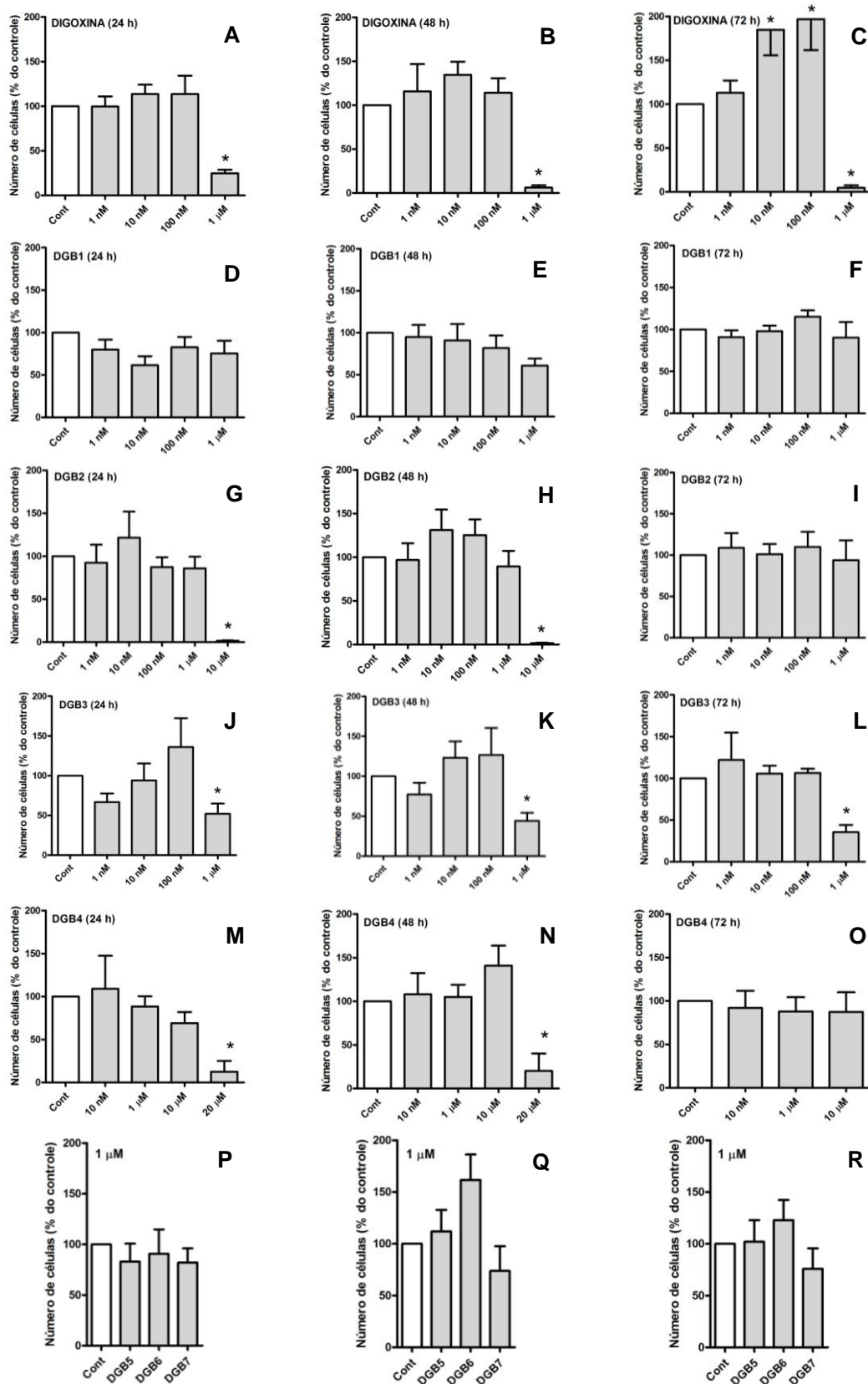


Figura 10. Avaliação da proliferação das células LLC-PK1 tratadas com digoxina e DGBs. Os valores representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos realizados em duplicata. No caso dos DGB5,6 e 7, foi usada uma única concentração (1 μ M). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle (ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls).

Como observado na Figura 10, as concentrações 10 e 100 nM de digoxina foram capazes de aumentar o número de células após 72 h de tratamento em relação às células controles (Figura 10C). Na concentração de 1 μ M, que inibe praticamente toda a atividade Na^+/K^+ -ATPásica, observa-se que logo em 24 h há uma drástica redução do número de células (Figura 10A-C). As micrografias da Figura 11 mostram o curso temporal do efeito de morte celular provocado pela digoxina na concentração de 1 μ M em relação ao controle (Figura 11A, C-E). A Figura 11 também mostra a morfologia celular normal após 72 h com 100 nM de digoxina (Figura 11B) e o perfil proliferativo à 10 e 100 nM em relação ao controle (Figura 11F-H). Com as DGBs, nenhuma delas estimulou a proliferação celular nas concentrações testadas (Figura 10D-Z). Aquelas que não conseguiram inibir a enzima também não resultaram em efeitos celulares significativos – DGB1 (Figura 10D-F) e DGB7 (apenas testado em 1 μ M, Figura 10P-R). Por outro lado, DGB2 e DGB4, que tiveram um perfil inibitório semelhante à digoxina, causaram efeito antiproliferativo significativo apenas em concentrações mais elevadas – 10 μ M de DGB2 (Figura 10G e H) e 20 μ M de DGB4 (Figura 10M e N). Somente DGB3, cujo perfil inibitório foi atípico no rim humano, teve um efeito similar ao da digoxina em 1 μ M (Figura 10J-L). Tanto DGB5 quanto DGB6 foram avaliados somente na concentração 1 μ M, sem qualquer efeito (Figura 10P-R).

4.4. Modulação da atividade de ERK1/2

Diversas vias de sinalização intracelular podem ser moduladas pela Na^+/K^+ -ATPase (NESHER e cols., 2007). Cascatas como a MEK1/2-ERK1/2 (TIAN e cols., 2009; QUINTAS e cols., 2010; LUCAS e cols., 2012), PI3K-Akt (ZHOU e cols., 2001; LIU e cols., 2007; WU e cols., 2013) estão envolvidas na proliferação, hipertrofia e viabilidade celular. Avaliamos por Western blot se uma dessas vias (ERK1/2) seria ativada após incubação por 15 min com a digoxina ou seus derivados, baseado em dados anteriores de nosso grupo com outros ECTs (Amaral, 2011).

Como pode ser visto na Figura 12, não houve estimulação significativa, estimada através da relação da marcação ERK-P/ERK-T.

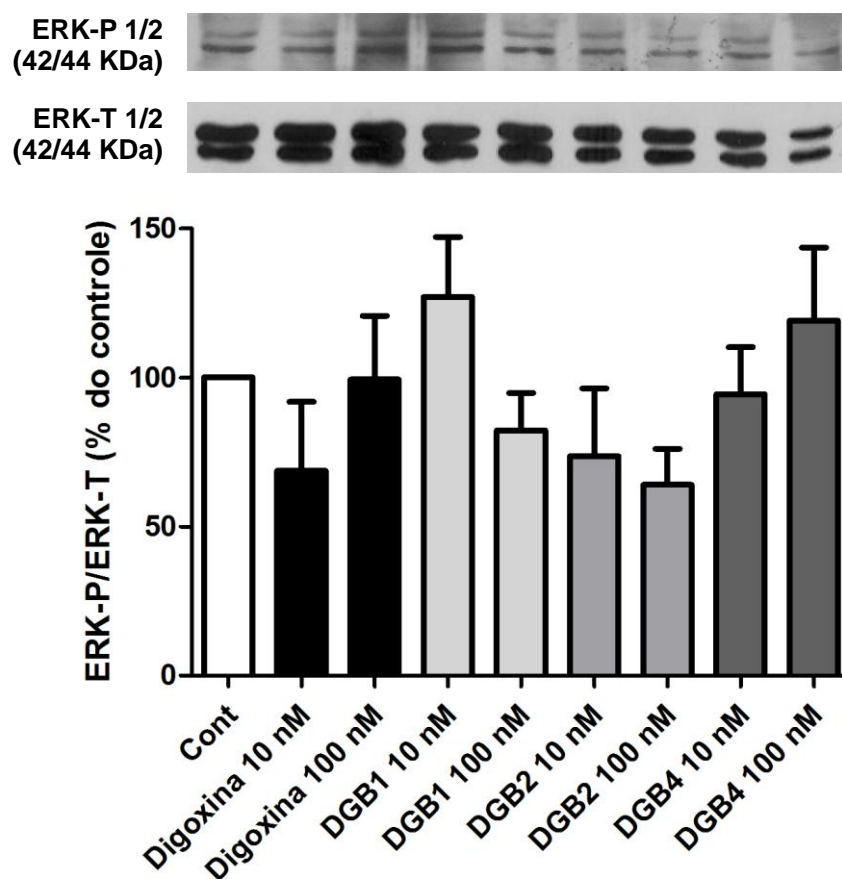


Figura 12. Western blot das proteínas ERK1/2 fosforilada e total de células LLC-PK1 tratadas por 15 min com digoxina ou DGBs. O controle não recebeu tratamento. n = 3.

Discussão



5. DISCUSSÃO

O leque de possibilidades terapêuticas atualmente consideradas para os ECTs foi o motivo principal para a síntese de derivados da digoxina utilizados neste trabalho. Sabe-se que um grupamento farmacofórico principal para a interação ECT- Na^+/K^+ -ATPase de alta afinidade é o anel lactônico na posição C-17 β do núcleo esteroide, que no caso dos cardenólidos é uma γ -butirolactona- α,β -insaturada. A troca da lactona por outros grupos funcionais pode abolir a capacidade inibitória (CERRI e cols., 2000). Alterações no anel lactônico já foram realizadas por diversos pesquisadores com o intuito de reduzir os efeitos cardioprotóxicos dos ECTs, mantendo o efeito inotrópico positivo, propiciando o desenvolvimento de esteroides com uma faixa terapêutica mais ampla (MENDEZ e cols., 1974; WIESNER e TSAI, 1986). Nesse sentido, a manutenção de uma carga parcial positiva em C-17 parece essencial para o efeito inotrópico positivo (SMITH e cols., 1982; PATI e WIESNER, 1986) enquanto que o aumento relativo do volume poderia aumentar a capacidade de inibição enzimática (FARR e cols., 2002; PAULA e cols., 2005). XU e colaboradores (2010) foram os primeiros a reportar a síntese de derivados da digoxina com substituições no anel lactônico, visando prioritariamente compostos que pudessem aumentar a contratilidade cardíaca com menos efeitos cardioprotóxicos. Aqui, observamos que as substituições no anel lactônico da digoxina são capazes de gerar derivados consideravelmente diferentes em relação à capacidade e potência inibitória. Estes perfis de inibição diferentes foram encontrados quer seja em preparações de rim humano (que contém exclusivamente a isoenzima $\alpha 1\beta 1$, sensível aos ECTs) ou de hemisférios cerebrais de rato (que contém as isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, na qual $\alpha 1$ é cerca de 100-1000x menos sensível aos ECTs). Mostramos anteriormente que as potências relativas de ECTs, cardenólidos ou bufadienólidos, são praticamente idênticas entre as isoformas de alta afinidade de rato ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) e a de rim humano ($\alpha 1$) (TOUZA, 2011). Devido às limitações de hidrossolubilidade dos derivados, não foi possível utilizar altas concentrações para verificar se eles são capazes ou não de inibir $\alpha 1$ de rato (cerca de 20-25% da população de Na^+/K^+ -ATPase encontrada em nossa preparação de hemisférios cerebrais). Entretanto, para DGB1, foram realizados experimentos com preparações de rim

de camundongo e de células Sf9 transfectadas com $\alpha 1\beta 1$ de rato e observa-se que a concentração mais alta, 100 μM , é capaz de inibir a enzima (ROCHA e cols., 2014). Junto com nossos dados mostrando que DGB1 apenas foi capaz de inibir a enzima de rim humano ($\alpha 1\beta 1$) nesta faixa de concentrações e inativa em relação às isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ presentes na preparação de cérebro de rato, estes dados talvez possam indicar uma seletividade para essa isoforma, mas mais estudos são necessários para chegar a essa conclusão. Os resultados de inibição para DGB1 foram publicados na revista PLoS One (ROCHA e cols., 2014) e os de DGB2 a DGB7 estão na fase de resposta aos revisores para a revista Bioorganic and Medicinal Chemistry (ALVES e cols., 2015).

A capacidade inibitória pode não estar necessariamente vinculada à capacidade de ligação à Na^+/K^+ -ATPase. Através de estudos de modelagem molecular associada a ensaios de inibição enzimática e de ligação, PAULA e colaboradores (2005) notaram, apesar de existir uma correlação geral, algumas exceções importantes. O aumento de volume na região do anel lactônico seria responsável por um aumento da capacidade inibitória em detrimento da afinidade de ligação (PAULA e cols., 2005). Desta forma, após verificar o efeito sobre a inibição da Na^+/K^+ -ATPase, analisamos a capacidade de ligação dos DGBs através do ensaio de *binding*, que nos permite avaliar a interação fármaco-receptor de forma indireta, através de ensaio de competição onde o ligante radioativo ($[\text{}^3\text{H}]$ ouabaína) e as substâncias-teste não-radioativas (DGBs) competem pelo mesmo sítio de ligação do receptor. Observamos que os ensaios de ligação corroboraram com os nossos resultados obtidos nos ensaios de inibição enzimática, já que a digoxina promoveu a dissociação do complexo radioligante-receptor em aproximadamente 95%, conforme esperado para uma substância que interage diretamente com o sítio de ligação da ouabaína na Na^+/K^+ -ATPase. A DGB1, uma das substâncias que não inibem a enzima, não promoveu a dissociação do complexo $[\text{}^3\text{H}]$ ouabaína-receptor. DGB2 e DGB4, por outro lado, revelaram resultados semelhantes à digoxina. Em células humanas HeLa (carcinoma cervical) o resultado com DGB1 foi semelhante ao da Fig. 9, onde 10 μM DGB1 inibiu menos de 20% da ligação da $[\text{}^3\text{H}]$ ouabaína (ROCHA e cols., 2014).

Após os experimentos de inibição enzimática e de ligação, decidimos verificar o perfil celular dessas substâncias sobre a proliferação celular em linhagem LLC-PK1, células epiteliais renais de túbulo proximal de porco com distribuição de proteínas membranares polarizadas, exibindo maior densidade de bombas de Na^+ na região basolateral (MUTH e cols., 1998; DUNBAR e CAPLAN, 2001). A escolha deste tipo celular deve-se ao fato que muitos estudos seminais sobre as vias de sinalização mediadas pela Na^+/K^+ -ATPase através de interações proteína-proteína foram realizados na LLC-PK1 (XIE e CAI, 2003). Como citado anteriormente, já foi descrito na literatura que os ECTs podem promover um efeito proliferativo em concentrações que inibem pouco ou praticamente não inibem a atividade Na^+/K^+ -ATPásica, efeito esse mediado pela Na^+/K^+ -ATPase sinalizador que está localizada na caveola. A digoxina induziu a proliferação celular quando usada em concentrações relativamente baixas (10 e 100 nM). Esse efeito também já foi reportado, principalmente para a ouabaína, em LLC-PK1 (TIAN e cols., 2009) e outros tipos celulares, como células de músculo liso vascular (AYDEMIR-KOKSOY e cols., 2001; ABRAMOWITZ e cols., 2003; LI e cols., 2007) e de próstata (CHUEH e cols., 2001), fibroblastos (QUINTAS e cols., 2010) e em células epiteliais renais (DMITRIEVA e DORIS, 2003; KHUNDMIRI e cols., 2006). Por outro lado, a digoxina promoveu citotoxicidade na concentração de 1 μM , já após 24 h de tratamento. Em células HeLa e RKO (carcinoma de cólon humano), o CI_{50} para o efeito citotóxico foi estimado em 2,2 e 0,4 μM , respectivamente (ALVES e cols., 2015), condizente com nosso resultado com a LLC-PK1. Como já esperado, numa concentração na qual praticamente toda a população de Na^+/K^+ -ATPase está inibida, há bloqueio do transporte eletrogênico promovendo assim morte celular. Ao contrário da digoxina, as DGBs em geral não modificaram significativamente a proliferação celular em nenhuma das concentrações empregadas. Para DGB2 e DGB4, que tiveram perfil de inibição similar à digoxina, observamos que elas foram capazes de causar morte celular quando usadas em concentrações acima de 1 μM , como esperado. A única que gerou alguma alteração na proliferação nas concentrações-padrão foi a DGB3, com efeito antiproliferativo em 1 μM . Globalmente para as DGBs, esses efeitos são condizentes com os dados em outras linhagens celulares (HeLa RKO, MDCK – epitélio renal tubular distal canino –, e WI-26 – fibroblasto pulmonar

humano), onde os efeitos, geralmente citotóxicos, apresentaram CI_{50} acima de 20 μM (ROCHA e cols., 2014; ALVES e cols., 2015). É interessante notar que para a linhagem MDCK, 50-100 μM de DGB1 resultou em evidente proliferação celular (ROCHA e cols., 2014). Por outro lado, DGB5, e não a DGB3, promoveu redução da viabilidade das células HeLa, RKO e WI-26 (CI_{50} = 0,26; 0,48 e 0,65, respectivamente), como a digoxina (ALVES e cols., 2015). Variações de espécie e tipo celular podem estar envolvidos nessas diferenças.

Após verificar o efeito celular destas substâncias, analisamos se estas eram capazes de ativar uma das cascatas de sinalização mediadas pela Na^+/K^+ -ATPase. Várias cinases podem ser ativadas pela Na^+/K^+ -ATPase sinalizadora, dentre elas ERK1/2, Akt, PKC, etc (NESHER e cols., 2007). Estudos determinaram para alguns ECTs que os efeitos regulatórios sobre as vias de sinalização podem ocorrer em concentrações menores do que aquelas que exercem efeito sobre a atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase (SAUNDERS e SCHEINER-BOBIS, 2004; KOTOVA e cols., 2006; KULIKOV e cols., 2007; KARPOVA e cols., 2010). Estas cinases são rapidamente estimuladas, e a maioria dos estudos trata por até 30 min diferentes tipo celulares com ECTs para demonstrar algum efeito nessas vias. Mostramos que a digoxina foi capaz de estimular a proliferação e sabe-se que a via Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 é uma das mais importantes para ocorrência deste fenômeno. Ademais, encontramos poucos relatos que exibem a habilidade da digoxina em ativar ERK1/2, e.g., WINNICKA e BIELAWSKI (2010), utilizando 30 nM de digoxina em fibroblastos humanos, entretanto após 24 h de tratamento. KOMETIANI e colaboradores (2005), também reportaram o efeito antiproliferativo da digoxina em células MDA-MB-435s (carcinoma mamário humano negativo para o receptor de estrógeno), e observaram um aumento pequeno, mas significativo, de ERK1/2 após tratamento por 5 min (5 e 25 nM). Portanto, avaliamos a capacidade de ativação de ERK1/2 através da detecção das proteínas ERK1/2 fosforiladas em preparações de linhagem celular LLC-PK1 após 15 min de incubação, condição na qual já evidenciamos anteriormente ser apropriada para detectar indução desta via por outros ECTs nessa linhagem celular (AMARAL, 2011). Utilizando as concentrações em que foi visto o efeito proliferativo da digoxina, não foi observada alteração significativa da densidade de ERK-P1/2. O mesmo aconteceu com as outras

substâncias testadas, DGB1, DGB2 e DGB4, que já não haviam apresentado efeito celular significativo nessas concentrações. Entretanto, surpreendentemente, a digoxina também não foi capaz de estimular ERK1/2 em baixas concentrações, como já visto para outros ECTs. Apesar destes resultados, não podemos descartar a possibilidade da digoxina estimular outras vias de transdução de sinal que fomentem a proliferação celular. De fato, foi relatado que a digoxina, ao contrário da ouabaína, não induz a fosforilação do resíduo de tirosina responsável pela ativação de Src *in vitro* (KATZ e cols., 2010). *In vivo*, ZULIAN e colaboradores (2013) mostraram recentemente que a digoxina não ativa Src nem ERK1/2 em células musculares lisas de artéria mesentérica de ratos tratados com digoxina, ao contrário da ouabaína. Vias de sinalização como a PI3K/Akt/mTOR, que também são responsáveis pelo efeito proliferativo em algumas linhagens celulares, são ativadas pela Na⁺/K⁺-ATPase independentemente de Src (WU e cols., 2013).

Nossos dados apontam que as alterações realizadas no anel lactônico resultaram em derivados com diferentes graus de ligação à Na⁺/K⁺-ATPase, estando correlacionado ao mecanismo de ação clássico inerente a todos os ECTs, a inibição enzimática. Contudo, parece que originou uma deficiência generalizada na capacidade de sinalizar por interação proteína-proteína. Na literatura, discute-se a possibilidade de desenvolvimento de antagonistas competitivos da digoxina como fármaco alternativo para o tratamento da superdosagem com digitálicos (PAULA e cols., 2005). Clinicamente usa-se o Digibind, fragmentos Fab de anticorpos policlonais anti-digoxina de carneiro, entretanto seu emprego é limitado por reações adversas como hipersensibilidade e alto custo (CHAN e BUCKLEY, 2014). Para que um antagonista seja eficaz, ele precisará ter uma elevada afinidade pelo sítio de ligação da Na⁺/K⁺-ATPase, mas uma baixa potência inibitória e alterações no anel lactônico seriam um bom ponto de partida para a concepção de tais compostos, ou até mesmo compostos com uma menor toxicidade comparados com a digoxina (PAULA e cols., 2005). Nesse momento, não temos dados suficientes para considerar as DGBs como possíveis antagonistas, particularmente aquelas com baixa potência inibitória, mas outra possibilidade pode surgir com base nos resultados. Percebendo que, apesar de inibir e se ligar à Na⁺/K⁺-ATPase, DGB2 e DGB4 não foram capazes de alterar o

comportamento celular nem de ativar ERK1/2, talvez elas pudessem ser consideradas substâncias que possam antagonizar a ativação de vias de sinalização mediadas pela Na^+/K^+ -ATPase e induzidas por ECTs, exibindo, portanto, seletividade funcional. Diversas condições patológicas, como a ICC, insuficiência renal, hipertensão arterial, apresentam elevação da concentração plasmática de ECTs endógenos e acredita-se que efeitos deletérios em longo prazo sejam, pelo menos em parte, gerados pela sinalização dependente da Na^+/K^+ -ATPase (BAGROV e SHAPIRO, 2008; BAGROV e cols., 2009). Tentativas nesse sentido são escassas, e revelaram moléculas diferentes dos ECTs, como as hidroxixantonas (Zhang e cols., 2010). Logo, nosso trabalho seria o primeiro a propor ECTs derivados da digoxina como possíveis substâncias com seletividade funcional, retendo a capacidade inibitória, mas deficientes quanto a capacidade de estimular a sinalização mediada pela Na^+/K^+ -ATPase.

Conclusão

CONCLUSÕES

Nosso trabalho demonstra que alterações no anel lactônico do esteroide cardiotônico digoxina são capazes de produzir derivados, neste caso, γ -benzilidenos, com perfis distintos de inibição e capacidade de ligação à Na^+/K^+ -ATPase, com possível deficiência de modulação de vias de sinalização e efeito celular relativo a essas vias, resultando em protótipos promissores para o desenvolvimento de esteroides cardiotônicos com seletividade funcional e novas finalidades terapêuticas.

Referências

ABRAMOWITZ J, DAI C, HIRSCHI KK, DMITRIEVA RI, DORIS PA, LIU L, AND ALLEN JC. Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. **Circulation** 108: 3048-3053, 2003.

AHMED A, PITT B, RAHIMTOOLA SH, WAAGSTEIN F, WHITE M, LOVE TE, BRAUNWALD E. Effects of digoxin at low serum concentrations on mortality and hospitalization in heart failure: a propensity-matched study of the DIG trial. **Int J Cardiol.** 123(2):138-46, 2008.

AIRES, M. M. **Fisiologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALPERT JS. To dig or not to dig. **Am J Med.** 127(6):461-2, 2014.

ALVES SLG, PAIXÃO N, FERREIRA LR, SANTOSA FRS, NEVES LDR, OLIVEIRA GC, CORTES FC, SALOMÉ KS, BARISOND A, SANTOS FV, CENZI G, VAROTTI FP, OLIVEIRA SMF, TARANTO AG, COMAR M, SILVA LM, NOËL F, QUINTAS LEM, BARBOSA LA, VILLAR JAFP. γ -Benzylidene digoxin derivatives synthesis and molecular modeling: evaluation of anticancer and the Na,K-ATPase activity effect. **Bioorg Med Chem**, 2015.

AMARAL LS. Avaliação do efeito de bufadienolídeos em novas vias de sinalização intracelular mediadas pela Na^+/K^+ -ATPase. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal/ICB/UFRJ, 2011.

APELL HJ. Structure-function relationship in P-type ATPases - a biophysical approach. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 150:1-35, 2003.

AYDEMIR-KOKSOY A, ABRAMOWITZ J, AND ALLEN J. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. **J Biol Chem** 276: 46605-46611, 2001.

BABULA P, MASARIK M, ADAM V, PROVAZNIK I, KIZEK R. From Na^+/K^+ -ATPase and cardiac glycosides to cytotoxicity and cancer treatment. *Anticancer Agents*. **Med Chem.** 13(7):1069-87, 2013.

BAGROV AY, SHAPIRO JI, FEDOROVA OV. Endogenous cardiostonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacol Rev.** 61(1):9-38, 2009.

BAGROV AY, SHAPIRO JI. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. **Nat Clin Pract Nephrol.** 4(7):378-92, 2008.

BATISTA, F.J.A. Efeitos de dois esteróides de *Bufo schneideri* Werner na atividade de isoformas da Na^+ , K^+ - ATPase e no sistema cardiorrenal. 2007. Dissertação (Mestrado acadêmico em ciências fisiológicas) – **Faculdade Estadual do Ceará**, Fortaleza, 2007.

BATTERO G.M.;SALLES,L.; ROSÁRIO,R.M.F.; VON POSER, G.L.;RATES, S.M.K.;NOEL,F.;QUINTAS,L.M.E. In vitro effect of valepotriates isolated from *valeriana glechomifolia* on rat p-type ATPases.**Planta medica**.doi:10.1005/s-0030-1271084,2011.

BLANCO G. & MERCER R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **Am J Physiol Renal Physiol** 275:F633-50, 1998.

BOCCHI EA Braga.,F. G. M.,Ferreira, S. M. A., Rohde, L. E. P., Oliveira, W. A., Almeida D. R., Moreira, M.C. V., Bestetti, R. B., Bordignon, S., Azevedo C.,Tinoco, E.M., Rocha, R.M., Issa,V.S., Ferraz, A., Cruz, F.D.,Guimarães, G.V., Montera, V. S. P., Albuquerque, D.C., Bacal, F.,Souza, G. E. C., Neto, J.M. R., Clausell, N.O.,Martins, S.M.; Siciliano, A., Neto, J. D.S.,Moreira, L.F., Teixeira, R.A., Moura, L.Z., Silva, L.B., Rassi, S.,Azeka, E.,Horowitz, E., Ramires F., Simões, M.V., Castro, R.B.P., Salemi, M.C., Junior, H.V., Vila, J.H.,Simões, R., Albanesi, F., Montera, M.W. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arq Bras Cardiol.** 93(supl.1):1-71, 2009.

BURGEN AS. Conformational changes and drug action. **Fed Proc.** 40:2723–2728, 1998.

CAI T, WANG H, CHEN Y, LIU L, GUNNING WT, QUINTAS LEM, XIE ZJ. Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase. **J Cell Biol.** 182(6):1153-69, 2008.

CERRI, A., ALMIRANTE, N., BARASSI, P., BENICCHIO, A., FEDRIZZI, G., FERRARI, P., MICHELETTI, R., QUADRI, L., RAGG, E., ROSSI, R., SANTAGOSTINO, M., SCHIAVONE, A., SERRA, F., ZAPPAVIGNA, M. P., MELLONI, P. 17 β -Aminoalkyloximes of 5 β -androstane-3 β ,14 β -diol with digitalis-like activity: Synthesis, cardiotoxic activity, structure-activity relationships, and molecular modeling of the Na⁺,K⁺-ATPase receptor, **J Med Chem.** 43:2332-2349, 2000.

CERRI A, GOBBINI M. Simplified digitalis-like compounds acting on Na⁺,K⁺-ATPase. **J Enzyme Inhib Med Chem.**18(4):289-95, 2003.

CHAN BS, BUCKLEY NA. Digoxin-specific antibody fragments in the treatment of digoxin toxicity. **Clin Toxicol.** 52(8):824-36, 2014.

CHUEH S, GUH J, CHEN, LAI M, AND TENG C. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. **J. Urol.** 66: 347-353, 2001.

COHEN, A. W., HNASKO, R., SCHUBERT, W., LISANTI, M. P. Role of caveolae and caveolins in health and disease. **Physiol Rev.**84(4):1341-79,2004.

CUNHA-FILHO GA, RESCK IS, CAVALCANTI BC, PESSOA CO, MORAES MO, FERREIRA JR, RODRIGUES FA, DOS SANTOS ML. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon.** 56(3):339-48, 2010.

DESPA S, BERS DM. Functional analysis of Na⁺/K⁺-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol.** 293(1):C321-7, 2007

DESPA S, LINGREL JB, BERS DM. Na⁺/K⁺-ATPase α 2-isoform preferentially modulates Ca²⁺ transients and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cardiac myocytes. **Cardiovasc Res.** 95(4):480-6, 2012.

DMITRIEVA RI, DORIS PA. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. **J Biol Chem** 278(30):28160-6, 2003.

DONNET C, ARYSTARKHOVA E, SWEADNER KJ. Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and gamma subunit association with the C-terminal domain. **J. Biol. Chem.** 276: 7357-65, 2001.

DOSTANIC I, LORENZ JN, SCHULTZ JEL J, GRUPP IL, NEUMANN JC, WANI MA, LINGREL JB. The $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase mediates ouabain-induced cardiac inotropy in mice. **J Biol Chem.** 278(52):53026-34, 2003.

DUNBAR LA, CAPLAN MJ. Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺- and H⁺, K⁺-ATPases. **J Biol Chem.** 276(32):29617-20, 2001.

FARR CD, BURD C, TABET MR, WANG X, WELSH WJ, BALL WJ JR. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by cardiotonic steroids using comparative molecular field analysis. **Biochemistry** 41(4):1137-48, 2002.

FAMBROUGH, D. M. The sodium pump becomes a family. **Trends in Neuroscience.** 11: 325-328,1988.

FERRANDI M, BARASSI P, MOLINARI I, TORIELLI L, TRIPODI G, MINOTTI E, BIANCHI G, FERRARI P. Ouabain antagonists as antihypertensive agents. **Curr Pharm Des.** 11(25):3301-5, 2005.

FERRANDI M, MANUNTA P, FERRARI P, BIANCHI G. The endogenous ouabain: molecular basis of its role in hypertension and cardiovascular complications. **Front Biosci.** 10:2472-7, 2005.

FINET, M., GODFRAIND, T. & NOEL, F. The inotropic effect of ouabain and its antagonism by dihydroouabain in rat isolated atria and ventricles in relation to specific binding sites. **Br. J. Pharmacol.**, 80, 751-759,1983.

FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.** 66: 375-392, 1925.

GEERING K. Function of FXYD proteins, regulators of Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** 37: 387-92, 2005.

GINN FL, SHELBURNE JD, TRUMP BF. Disorders of cell volume regulation. I. Effects of inhibition of plasma membrane adenosine triphosphatase with ouabain. **Am J Pathol.** 53(6):1041-71,1998.

GOLDBERGER ZD, ALEXANDER GC. Digitalis use in contemporary clinical practice: refitting the foxglove. **JAMA Intern Med.** 174(1):151-4, 2014.

GOTO A , YAMADA K. Purification of endogenous digitalis-like factors from normal human urine. **Clin Exp Hypertens.** 20: 551-556, 1998.

GOTO A, YAMADA K. An approach to the development of novel antihypertensive drugs: potential role of sodium pump inhibitors. **Trends Pharmacol Sci.** 19(6):201-4, 1998.

GOTO, A., ISHIGURO, T., YAMADA, K., ISHII, M., YOSHIOKA, M., EGUCHI, C., SHIMORA, M., SUGIMOTO, T. Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 173: 1093–1101, 1990.

HAMLYN, J.M., BLAUSTEIN, M.P., BOVA, S., DU CHARME, D.W., HARRIS, D.W., MANDEL, F., MATHEWS, W.R., LUDENS, J.H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88:6259-6263, 1991.

HELBER I, TUCCI P.J. Digoxin: the results of the DIG study in the XXI century. **Arq Bras Cardiol.** 95(4):e108-11, 2010.

HUNTER T. Signaling - 2000 and beyond. **Cell.** 100(1):113-27, 2000.

HUANG, Y. T., CHUE H.B., S.C., TENG, C.M., JIH-HWA GUH, J.H. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Biochem Pharmacol** 67:727-33, 2004.

JUILLIÈRE Y, SELTON-SUTY C. Digoxin therapy: A persisting interest despite contrary winds. **Arch Cardiovasc Dis** 103(5):281-4, 2010.

KAPLAN, J.H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu. Rev. Biochem.** 71:511-35, 2002.

KARPOVA LV, BULYGINA ER, BOLDYREV AA. Different neuronal Na(+)/K(+)-ATPase isoforms are involved in diverse signaling pathways. **Cell Biochem Funct.** 28(2):135-41, 2010.

KATZ A, LIFSHITZ Y, BAB-DINITZ E, KAPRI-PARDES E, GOLDSHLEGER R, TAL DM, KARLISH SJ. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase. **J Biol Chem.** 285(25):19582-92, 2010.

KAYE, D.M E KRUM, H. .Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline? **Nat Rev Drug Discov.** 6:127-39, 2007.

KAWAMURA, A., GUO, J., ITAGAKI, Y., BELL, C., WANG, Y., HAUPERT JR., G.T., MAGIL, S., GALLAGHER, R.T., BEROVA, N., NAKANISHI, K. On the structure of endogenous ouabain. **Proc Natl Acad Sci USA** 96: 6654–6659, 1999.

KENAKIN T. Functional selectivity and biased receptor signaling. **J Pharmacol Exp Ther.** 336(2):296-302, 2011.

KENAKIN T, WILLIAMS M. Defining and characterizing drug/compound function. **Biochem Pharmacol.** 87(1):40-63, 2014.

KHUNDMIRI SJ, METZLER MA, AMEEN M, AMIN V, RANE MJ, AND DELAMERE NA. Ouabain induces Cell Proliferation through Calcium Dependent Phosphorylation of Akt (Protein Kinase B) in Opossum Kidney Proximal Tubule Cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** 291: C1247-C1257, 2006.

KOMETIANI P, LIU L, ASKARI A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. **Mol Pharmacol.** 67(3):929-36, 2005.

KOSHLAND DE (1958) Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 44:98-104, 1958.

KOTOVA O, AL-KHALILI L, TALIA S, HOOKE C, FEDOROVA OV, BAGROV AY, CHIBALIN AV. Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a SRC- and ERK1/2-dependent mechanism. **J. Biol Chem** 281(29):20085-94, 2006.

KULIKOV A, EVA A, KIRCH U, BOLDYREV A, SCHEINER-BOBIS G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochim Biophys Acta** 1768(7):1691-702, 2007.

LANGENHAN JM, PETERS NR, GUZEI IA, HOFFMANN FM, THORSON JS. Enhancing the anticancer properties of cardiac glycosides by neoglycorandomization. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102(35):12305-10, 2005.

LAREDO J, HAMILTON JP, AND HAMLYN JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochem Biophys Res Commun**. 212:487-493, 1995.

LAREDO J, SHAH JR, LU ZR, HAMILTON BP, HAMLYN JM. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension** 29:401–407, 1997.

LAREDO J, SHAH JR, HAMILTON BP, AND HAMLYN JM. α 1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. In: *Na/K-ATPase and Related ATPases*, edited by Taniguchi K and Kayas S. Amsterdam: Elsevier Science. 671-679, 2000.

LEE, M. R. William Withering: A biographical sketch of a Birmingham Lunatic. JLL Bulletin: Commentaries on the history of treatment evaluation (www.jameslindlibrary.org): 1741-1799,2005

LEVENSON R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. 123:1-45, 1994.

LI, M., WANG, Q., GUAN, L. Effects of ouabain on proliferation, intracellular free calcium and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells. **J Comp Physiol B** 177(5):589-95, 2007.

LIANG, M., TIAN, J., LIU, L., PIERRE, S., LIU, J., SHAPIRO, J., XIE, Z.J. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **J Biol Chem**. 282:10585–10593, 2007.

LINGREL JB. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. **J Bioenerg Biomembr**. 24(3):263-70, 1992.

LIU L, MOHAMMADI K, AYNASHAR B, WANG H, LI D, LIU J, IVANOV AV, XIE Z, ASKARI A. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. **Am J Physiol Cell Physiol** 284: C1550-C1560, 2003.

LIU L, ZHAO X, PIERRE SV, ASKARI A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**. 293(5):C1489-97, 2007.

LAZARO,M.L.,PASTOR,N.,AZRAK,S.S.,AYUSO,M.G,AUSTIN,C.A.,CORTÉS,f.Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **J Nat Prod** 68:1642-5,2005.

LOPEZ LB, QUINTAS LE, NOËL F. Influence of development on Na(+)/K(+)-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** 131(2):323-33, 2002.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-75, 1951.

LUCAS TF, AMARAL LS, PORTO CS, QUINTAS LEM. Na⁺/K⁺-ATPase α 1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells. **Reproduction** 144(6):737-45, 2012

LUCCHESI PA, SWEADNER KJ. Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity. **J. Biol. Chem.** 266: 9327-9331, 1991.

MCCONKEY, D. J., LIN, Y., Nutt, L. K., Ozel, H. Z., Newman, R; A. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostateadenocarcinoma cells. **Cancer Res.**60(14):3807-12, 2000.

MENDEZ R, PASTELIN G, KABELA E. The influence of the position of attachment of the lactone ring to the steroid nucleus on the action of cardiac glycosides. **J Pharmacol Exp Ther.**188(1):189-97, 1974.

MENGER, L. et al. Trial watch: Cardiac glycosides and the cancer therapy. **Oncoimmunology.** 2: e-23081-e-2308, 2013.

MERCER RW. Structure of the Na,K-ATPase.**Int Rev Cytol.** 137C:139-68, 1993.

MERCER RW, BIEMESDERFER D, BLISS DP JR, COLLINS JH, FORBUSH B 3RD. Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. **J Cell Biol** 121: 579-586, 1993.

MIJATOVIC T, DUFRASNE F, KISS R. Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na⁺/K⁺-ATPase to combat chemoresistant cancers. **Curr Med Chem.** 19(5):627-46, 2012.

MIJATOVIC T, DUFRASNE F, KISS R. Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. **Pharm Pat Anal.**1(1):91-106, 2012

MIJATOVIC T, VAN QUAQUEBEKE E, DELEST B, DEBEIR O, DARRO F, KISS R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochim Biophys Acta** 1776(1):32-57, 2007.

MOBASHERI A., AVILA J., COZAR-CASTELLANO I., BROWNLEADER M.D., TREVAN M., FRANCIS M.J., LAMB J.F., MARTIN-VASSALLO P. Na⁺,K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Biosci Rep.** 20: 51-91, 2000.

MÜLLER-EHMSSEN, J., JUVVADI, P., THOMPSON, C.B., TUMYAN, L., CROYLE, M., LINGREL, J.B., SCHWINGER, R.H.G., MCDONOUGH, A., FARLEY, R.A. Ouabain and substrate affinities of human Na⁺,K⁺-ATPase α ₁ β ₁, α ₂ β ₁ and α ₃ β ₁ when expressed separately in yeast cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** 281:C1355-C1364, 2001.

MUTH TR, GOTTARDI CJ, ROUSH DL, CAPLAN MJ. A basolateral sorting signal is encoded in the alpha-subunit of Na-K-ATPase. **Am J Physiol.** 274(3 Pt 1):C688-96, 1998.

NESHER, M., SHPOLANSKY, U., ROSEN, H., LICHTSTEIN, D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. **Life Sci.** 80:2093-107, 2007.

NEWMAN, R. A, KONDO, Y., YOKOYAMA, T., DIXON, S., CARTWRIGHT, C., CHAN, D., JOHANSEN, M., YANG, P. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integr Cancer Ther** 6:354-64,2007.

NEWMAN, R.A., YANG, P., HITTELMAN, W. N., LU, T., HO, D. H, NI, D., CHAN, D., VIJESWARAPU, M., CARTWRIGHT, C., DIXON, S., FELIX, E., ADDINGTON, C.Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. **J Exp Ther Oncol.** 5:167-81,2006.

NOËL F, QUINTAS LEM, FREITAS E, CARICATI-NETO A, LAFAYETTE SS, WANDERLEY AG, JURKIEWICZ A. Quantitative analysis of the high-affinity binding sites for [³H]ouabain in the rat vas deferens and their immunological identification as the $\alpha 2$ isoform of Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochem Pharmacol** 55:1531-5, 1998.

NOËL, F., GODFRAIND, T. Heterogeneity of ouabain specific binding sites and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition in microsomes from rat heart. **Biochem. Pharmacol.** 33:47-53, 1984.

OLEJ B, DOS SANTOS NF, LEAL L, RUMJANEK VM. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. **Biosci Rep.** 18(1):1-7, 1998.

PATI UK, WIESNER K. Synthesis of 17 β -(3'-thiophenyl)-5 beta-androstane-3 beta,14 β -diol 3-D-glucopyranoside, an anti-inotropic cardiac glucoside. **Steroids.** 55(2):65-8, 1990.

PAULA S, TABET MR, BALL WJ JR. Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E2-Pi form of the enzyme versus activity inhibition. **Biochemistry.** 44(2):498-510, 2005.

PARTON RG, SIMONS K. The multiple faces of caveolae. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8(3):185-94, 2007.

PRASSAS I, DIAMANDIS EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nat Rev Drug Disc.** 7:926-935, 2008.

QAZZAZ HMAM, GOUDY SL, VALDES RJ. Deglycosylated products of endogenous digoxin-like immunoreactive factor in mammalian tissue. **J Biol Chem** 271: 8731-8737, 1996

QUINTAS LEM, PIERRE SV, LIU L, BAI Y, LIU X, XIE ZJ. Alterations of Na⁺/K⁺-ATPase function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. **J Mol Cell Cardiol.** 49(3):525-31, 2010.

RAGHAVENDRA, P. B., SREENIVASAN, Y., RAMESH, G. T., MANNA, S. K.. Cardiac glycoside induces cell death via FasL by activating calcineurin and NF-AT, but apoptosis initially proceeds through activation of caspases. **Apoptosis.**12:307-18,2007

RATES, S.M.K.; BRIDI, R. Heterosídeos Cardioativos. In: Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. 5^a.ed Porto Alegre/ Florianópolis: Universidade (UFRGS)/ Editora UFSC, 2004. p. 686-710.

REEVES A.S., COLLINS J.H., SCHWARTZ A. Isolation and characterization of Na⁺,K⁺-ATPase proteolipid. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 95: 1591-1598, 1980.

RIGANTI C, CAMPIA I, KOPECKA J, GAZZANO E, DOUBLIER S, ALDIERI E, BOSIA A, GHIGO D. Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. **Curr Med Chem.** 18(6):872-85, 2011.

ROCHA SC, PESSOA MT, NEVES LD, ALVES SL, SILVA LM, SANTOS HL, OLIVEIRA SM, TARANTO AG, COMAR M, GOMES IV, SANTOS FV, PAIXÃO N, QUINTAS LEM, NOËL F, PEREIRA AF, TESSIS AC, GOMES NL, MOREIRA OC, RINCON-HEREDIA R, VAROTTI FP, BLANCO G, VILLAR JA, CONTRERAS RG, BARBOSA LA. 21-Benzylidene digoxin: a proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. **PLoS One.** 9(10):e108776, 2014.

ROSSONI LV, SALAICES M, MIGUEL M, BRIONES AM, BARKER LA, VASSALO DV, ALONSO MJ Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 283:H2110-8, 2002.

SANCHEZ G, NGUYEN AN, TIMMERBERG B, TASH JS, BLANCO G. The Na,K-ATPase α 4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. **Mol Hum Reprod.** 12:565-76, 2006.

SAUNDERS R, SCHEINER-BOBIS G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. **Eur J Biochem** 271(5):1054-62, 2004.

SCHNEIDER, R., ANTOLOVIC, R., KOST, H., SICH, B., KIRCH, U., TEPEL, M., ZIDEK, W., SCHONER, W. Proscillaridin A immunoreactivity: its purification, transport in blood by a specific binding protein and its correlation with blood pressure. **Clin Exp Hyperten.** 20:593–599, 1998.

SCHÖNFELD, W., WEILAND, J., LINDIG, C., MASNYK, M., KABAT, M.M., KUREK, A., WICHA, J., REPKE, R.H. The lead structure in cardiac glycosides is 5 β , 14 β -androstan-3 β , 14-diol. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 329:414-426, 1985.

SILVA E, SOARES-DA-SILVA P. New insights into the regulation of Na⁺,K⁺-ATPase by ouabain. **Int Rev Cell Mol Biol.** 294:99-132, 2012.

STAESSEN, J.A., THIJS, L., SKRZYPEK, S. K., BACCHIERI, A., BARTON, J., ESPOSITI, E. D., LEEUW, P. W., DŁUŻNIEWSKI, M., GLORIOSO, N., JANUSZEWICZ, A., MANUNTA, P., MILYAGIN, V., NIKITIN, Y., SOUČEK, M., LANZANI, C., CITTERIO, L., TIMIO, M., TYKARSKI, A., FERRARI, P., VALENTINI, G., JASZCZ, K., BIANCHI, G. Main results of the ouabain and adducin for Specific Intervention on Sodium in Hypertension Trial (OASIS-HT): a randomized placebo-controlled phase-2 dose-finding study of rostafuroxin. **Trials**. 14;1213, 2011.

SMITH P, BROWN L, BOUTAGY J, THOMAS R. Cardenolide analogues. 14. Synthesis and biological activity of glucosides of C17 β -modified derivatives of digitoxigenin. **J Med Chem**. 25(10):1222-6, 1982.

STENKVIST B, BENGTSSON E, DAHLQVIST B, ERIKSSON O, JARKRANS T, NORDIN B. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. **N Engl J Med**. 306(8):484, 1982.

STENKVIST B, BENGTSSON E, ERIKSSON O, HOLMQUIST J, NORDIN B, WESTMAN-NAESER S. Cardiac glycosides and breast cancer. **Lancet** 1(8115):563, 1979.

STENKVIST B, BENGTSSON E, EKLUND G, ERIKSSON O, HOLMQUIST J, NORDIN B, WESTMAN-NAESER S. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. **Anal Quant Cytol**. 2(1):49-54, 1980.

SWEADNER K.J. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochim Biophys Acta** 988(2):185-220, 1989.

THERIEN AG, BLOSTEIN R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol** 279(3):C541-66, 2000.

TIAN J, LI X, LIANG M, LIU L, XIE JX, YE Q, KOMETIANI P, TILLEKERATNE M, JIN R, XIE Z. Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth. **J Biol Chem** 284(22):14921-9, 2009.

TOUZA N. Caracterização da inibição da Na⁺,K⁺-ATPase por bufadienolidos endógenos e semi-sintéticos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, **ICB/UFRJ**, 2011.

TURNER ST, SCHWARTZ GL, BOERWINKLE E. Personalized medicine for high blood pressure. **Hypertension** ;50(1):1-5,2007

URBAN JD, CLARKE WP, VON ZASTROW M, NICHOLS DE, KOBILKA B, WEINSTEIN H, JAVITCH JA, ROTH BL, CHRISTOPOULOS A, SEXTON PM, MILLER KJ, SPEDDING M, MAILMAN RB. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. **J Pharmacol Exp Ther**. 320(1):1-13, 2007.

WANG H, HAAS M, LIANG M, CAI T, TIAN J, LI S, XIE Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺ -ATPase. **J Biol Chem** 279: 17250-17259, 2004.

WANG HY, O'DOHERTY GA. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**. 22(6):587-605, 2012.

WIESNER K, TSAI TYR. Some recent progress in the synthetic and medicinal chemistry of cardioactive steroid glycosides. **Pure Appl Chem**. 58:799-810, 1986.

WINNICKA K, BIELAWSKI K, BIELAWSKA A, MILTYK W. Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. **Nat Prod Res.** 24(3):274-85, 2010.

WU J, AKKURATOV EE, BAI Y, GASKILL CM, ASKARI A, LIU L. Cell signaling associated with Na⁺/K⁺-ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. **Biochemistry.** 52(50):9059-67, 2013.

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

XIE, Z., ASKARI, A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 269:2434-9, 2002.

XU HW, LIU GZ, ZHU SL, HONG GF, LIU HM, WU Q. Digoxin derivatives substituted by alkylidene at the butenolide part. **Steroids.** 75(6):419-23, 2010.

YU SP . Na⁺,K⁺-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. **Biochem Pharmacol.** 66(8):1601–1609, 2003.

ZHANG Z, LI Z, TIAN J, JIANG W, WANG Y, ZHANG X, LI Z, YOU Q, SHAPIRO JI, SI S, XIE Z. Identification of hydroxyxanthenes as Na/K-ATPase ligands. **Mol Pharmacol.** 77(6):961-7, 2010.

ZHOU X, JIANG G, ZHAO A, BONDEVA T, HIRSZEL P, BALLA T. Inhibition of Na,K-ATPase activates PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-PK1 cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 285(1):46-51, 2001.

ZULIAN A, LINDE CI, PULINA MV, BARYSHNIKOV SG, PAPPARELLA I, HAMLIN JM, GOLOVINA VA. Activation of c-SRC underlies the differential effects of ouabain and digoxin on Ca²⁺ signaling in arterial smooth muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 304(4):C324-33, 2013.

ANEXO I