

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS –GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação do efeito da ouabaína na viabilidade e modulação de citocinas em timócitos e linfócitos expostos a radiação ultravioleta**

**Anne Kaliery de Abreu Alves**

**João Pessoa – PB**

**2018**

---

**Anne Kaliery de Abreu Alves**

**Avaliação do efeito da ouabaína na viabilidade e modulação de citocinas em timócitos e linfócitos expostos a radiação ultravioleta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Coorientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior

**João Pessoa – PB**

**2018**

**ANNE KALIERY DE ABREU ALVES**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A474a Alves, Anne Kaliery de Abreu.

Avaliação do efeito da ouabaína na viabilidade e modulação de citocinas em timócitos e linfócitos expostos a radiação ultravioleta / Anne Kaliery de Abreu Alves. - João Pessoa, 2018.

88 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: José Pinto de Siqueira Junior.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Biotecnologia.

1. Inflamação, timócitos, linfócitos, radiação. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Junior, José Pinto de Siqueira. III. Título.

UFPB/BC

---

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OUABAÍNA NA VIABILIDADE E MODULAÇÃO DE CITOCINAS EM TIMÓCITOS E LINFÓCITOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**.

Dissertação de Mestrado aprovada em: \_\_\_\_\_

## BANCA EXAMINADORA

*Sandra Rodrigues Mascarenhas*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Orientadora)

*Adna Cristina Barbosa de Sousa*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adna Cristina Barbosa de Sousa  
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Avaliadora interna)

*Fabiola da Cruz Nunes*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiola da Cruz Nunes  
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Avaliadora externa)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Piuvezam  
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB. Suplente)

---

Prof. Dr. Eneas Ricardo de Moraes Gomes  
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB. Suplente)

---

Dedico esse trabalho para o meu eterno anjo lindo, que eu tive a chance de conhecer, que me fez ser uma madrinha daquelas que parecem mãe, que foi um exemplo de luta, de generosidade e de amor. Ele veio para ensinar e eu estava sempre ao seu lado para aprender.

Francisco de Assis Gomes de Lima Neto

(In memoriam)

## Agradecimentos

A **Deus** pela dádiva da vida e por todos os dias me ofertar a chance de continuar, de sonhar e de seguir na vida.

A minha amada **família** do interior por todo amor nessa vida, por terem construído as minhas raízes, especialmente aos meus pais **Fátima e José** que me fizeram ser uma pessoa do bem e lutadora. A minha irmã **Amanda**, **vovó**, **tias**, **tios**, **primas e primos** que sempre desejam o melhor para o meu caminho.

Aos meus amigos e amigas da universidade e do trabalho: **Natália**, **Cícero** e **Emanuele**, amigos que eu ganhei no mestrado, vale dizer que sem eles eu não teria conseguido, pois a cada necessidade de mudança de horário de alguma aula, eles foram os melhores. No trabalho, me dividindo entre farmácia hospitalar e bioquímica, eu quero agradecer especialmente à: **Carminha e a equipe de farmacêuticos (as) hospitalares e clínicos (as)**, sem esquecer do auxiliares de farmácia (**Cris**, **Elly** e **Júlia**) que desejam o melhor pra mim. Do lado bioquímica da vida quero agradecer por todo o incentivo que recebi das minhas amigas: **Patrícia**, **Paula** e **Priscila**, além da equipe de técnicos de laboratório: **Vera**, **Lucy**, **Macerlo** e **Rayenne**. Trabalhar com vocês é muito bom.

A minha família do coração que foram presentes do **meu anjo Francisco**, eu quero agradecer aos meus pais, **Terezinha e Francisco**, por me acolherem como filha, dispensando a construção de um passado que não houve e por me colocarem em suas vidas como se fosse algo desde o início da minha, onde os laços de amor preenchem a cada dia a dia o nosso álbum de família. Muito obrigada por tudo.

Aos **irmãos de coração** que ganhei também de Francisco, cinco presentes, que a cada dia eu gosto mais. Tenho os melhores! Ainda pela magia de Francisco eu recebi uma sobrinha princesa, **Sofia**, para me ensinar sobre os brinquedos da nova vida.

A minha gratidão imensa à **Professora Sandra Mascarenhas**, pela orientação e sobretudo pela paciência em compreender o caminho difícil que percorri até aqui. Obrigada por tudo.

---

Aos meus amigos de laboratório de pesquisa (**Éssia, Deyse, Luis, Guilherme, Marreiro, Julia e Juliane**) por todo o companheirismo nesse período do mestrado. **Éssia e Deyse**, minhas grandes pesquisadoras, que me ajudaram em tantos experimentos e compartilharam da vida corrida que eu tinha associada ao mestrado. Obrigada! Desejo um futuro brilhante para vocês.

A **todos os professores** do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por todo conhecimento transmitido e por serem grandes mestres.

Aos professores membros da Banca Examinadora, **Adna Cristina e Fabíola Nunes**, por aceitarem o convite de participar dessa banca e contribuir para o enriquecimento desse trabalho. Muito obrigada.

A **José Crispim** por toda sua dedicação ao biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e pela sua disponibilidade em ajudar.

A técnica de laboratório **Tcris**, por toda ajuda na autoclavagem de material. A **Mônica** (serviços gerais) pela generosidade em suas palavras quando nos encontrava fazendo experimentos desde cedo.

Muito obrigada.

## Resumo

A ouabaína é um glicosídeo cardíaco que foi descoberto no plasma humano em 1991 (HAMLYN et al., 1991). Essa substância endógena é capaz de inibir a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e vem sendo amplamente estudada por sua capacidade em interferir em vários mecanismos que regulam e mantêm a homeostase. Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar in vitro e in vivo a ação da ouabaína na viabilidade celular e no perfil de citocinas pró-inflamatórias em células do timo e linfonodo mesentérico expostas a radiação UV. Para isso foram usados camundongos Swiss albinus e realizada a cultura de células do timo e linfonodo mesentérico. Essas células foram tratadas com ouabaína nas concentrações de 100,10, 1 µM e 100 nM na placa de 96 poços, como também através do pré-tratamento com ouabaína na dose de 0,56 mg/kg por três dias através da injeção intra-peritoneal dessa dose. As células obtidas da maceração dos órgãos foram centrifugadas, resuspensas e contadas. A concentração foi ajustada para 4x10<sup>5</sup>céls/ml com PBS e plaqueadas para a exposição a UVC e UVB por 2 minutos. Após o estímulo, adicionou-se o meio RPMI suplementado com 10% de SFB e manteve-se essas células em cultura por 6 e 24 horas. A viabilidade foi analisada com o MTT 5 mg/mL. O sobrenadante da cultura foi utilizado para determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 pelo método de ELISA. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com ouabaína na dose de 0,56 mg/Kg na cultura de 6 horas apresentou um efeito citoprotetor nos timócitos e linfócitos linfonodo mesentérico expostos a UVC e UVB. Esse mesmo tipo de célula em cultura por 6h e 24h na presença de ouabaína em diferentes concentrações 100,10, 1 µM e 100 nM, apresentou efeito em 24 horas mediante o estímulo da UVC, esse dado não foi observado para UVB. A concentração de 100 nM protegeu os timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico da morte celular. No sobrenadante dessa concentração houve aumento do TNF-α e redução de IL-6 quando, e no pré-tratamento com 0,56 mg/Kg não houve alteração dessas citocinas comparada ao grupo que recebeu radiação. Esses resultados contribuem para o entendimento da sua ação ouabaína sobre parâmetros importantes do processo inflamatório, viabilidade e citocinas, desencadeado por radiação ultravioleta.

**Palavras chave:** inflamação, timócitos, linfócitos, radiação

## **Abstract**

Ouabain is a cardiac glycoside discovered in human plasma in 1991 (HAMLYN et al., 1991). This endogenous substance can inhibit Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> -ATPase and has been extensively studied for its ability to interfere with various mechanisms that regulate and maintain homeostasis. Thus, the aim of this study was to evaluate in vitro and in vivo ouabain regarding cell viability and the profile of pro-inflammatory cytokines in thymus and mesenteric lymph node cells exposed to UV radiation. Therefore, Swiss albinus mice were used conducting cell culture from the thymus and the mesenteric lymph node. These cells were treated with ouabain 100, 10, 1  $\mu$ M and 100 nM in a plaque of 96 wells, and also with a pre-treatment with ouabain 0.56 mg/kg during three days via intraperitoneal injection. The cells obtained from the maceration of the organs were centrifuged, resuspended and counted. The concentration was adjusted to  $4 \times 10^5$  cells/ml with PBS and plated for exposure to UVC and UVB for 2 minutes. After the stimuli, the RPMI medium supplemented with 10% of SFB is added and cells are kept in culture for 6 to 24 hours. Viability was analysed with the MTT 5 mg/mL and with the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6, as determined by the method ELISA. Our results showed that after 6h and 24h the culture in the presence of ouabain in different concentrations 100, 10, 1  $\mu$ M and 100 nM, only in the 100 nM the cells were protected from cell death, this result was observed for the 24h culture of thymocytes and lymphocytes that were stimulated by UVC, but this was not observed for UVB stimulation. In these cells, the pre-treatment with 0.56 mg/Kg ouabain in the 6 hours culture presented a cytoprotective effect on the thymocytes and mesenteric lymph node lymphocytes exposed to UVC and UVB. Besides these effects on viability, ouabain in the concentration of 100 nM increased TNF- $\alpha$  and reduced IL-6. Nevertheless, the pre-treatment with 0.56 mg/Kg did not modulate these cytokines compared to the group receiving radiation. These results contribute to the understanding of the ouabain action over important parameters of the inflammatory process, viability and cytokines, triggered by ultraviolet radiation.

**Keywords:** inflammation, thymocytes, lymphocytes, radiation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Esquema do processo de recrutamento de leucócitos do sangue para sítio de inflamação

**Figura 2:** Ação do TNF- $\alpha$  ao ligar-se em seu receptor TNFR1

**Figura 3:** Modelo para a via de sinalização IL-6/Stat3

**Figura 4:** Estrutura química da ouabaína

**Figura 5:** Protocolo de pré-tratamento com a ouabaína 0,56 mg/Kg

**Figura 6:** Esquema da conversão do MTT em formazan

**Gráfico 1:** Viabilidade dos timócitos irradiados por 2 minutos de UVC e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 2:** Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico irradiados por 2 minutos de UVC e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 3:** Viabilidade dos timócitos irradiados com UVB e mantidos em cultura por 6h (A) e 24h (B)

**Gráfico 4:** Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico irradiados com UVB e mantidos em cultura por 6h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 5:** Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de timócitos (A) e linfócitos do linfonodo mesentérico (B) que foram estimulados com UVC

**Gráfico 6:** Determinação dos níveis de IL-6 no sobrenadante da cultura de timócitos (A) e linfócitos do linfonodo mesentérico (B) que foram estimulados com UVC

**Gráfico 7:** Viabilidade dos timócitos, pré-tratados com ouabaína e irradiados por 2 minutos de UVC e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 8:** Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico, pré-tratados com ouabaína e irradiados por 2 minutos de UVC e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 9:** Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 no sobrenadante da cultura de timócitos (A: TNF- $\alpha$  e C: IL-6) e linfócitos do linfonodo mesentérico (B: TNF- $\alpha$  e D: IL-6) que foram estimulados com UVC

---

**Gráfico 10:** Viabilidade dos timócitos, pré-tratados com ouabaína e irradiados por 2 minutos de UVB e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 11:** Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico, pré-tratados com ouabaína e irradiados por 2 minutos de UVB e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B)

**Gráfico 12:** Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 no sobrenadante da cultura de timócitos (A: TNF- $\alpha$  e C: IL-6) e linfócitos do linfonodo mesentérico (B: TNF- $\alpha$  e D: IL-6) que foram estimulados com UVB

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Avidin-HRP</b>	Do inglês “avidin horseradish peroxidase”
<b>CEUA</b>	Comissão de ética no uso de animais
<b>COX-2</b>	Ciclo-oxigenase 2
<b>CXCL-1</b>	Quimiocina CXC com especificidade para os receptores CXCR2
<b>DMSO</b>	Dimeltisulfóxido
<b>ELISA</b>	Do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidermal
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da média
<b>ERK</b>	Do inglês “extracellular signal – regulated kinase”
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>JNK</b>	Do inglês “c-Jun N-terminal kinases”
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LAK</b>	células Killer ativadas por linfoquinas
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MTT</b>	Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
<b>n</b>	Número de animais
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase</b>	Bomba de sódio e potássio ATPase
<b>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup></b>	Trocador de sódio e cálcio
<b>NF-κB</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NFATc</b>	Fator nuclear de células T ativadas
<b>p38</b>	Proteína quinase ativadora de mitógeno p38
<b>PBS</b>	Solução fosfato tamponado
<b>PBST</b>	Solução fosfato tamponado contendo tween
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RPMI</b>	Meio de cultura do inglês “Roswell Park Memorial”
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>Src</b>	Proteína quinase não receptora Src
<b>TLRs</b>	Receptores do tipo Toll (Toll-like)
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina

---

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVA</b>	Ultravioleta A
<b>UVB</b>	Ultravioleta B
<b>UVC</b>	Ultravioleta C
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão celular-vascular-1

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	16
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	20
2.1 Inflamação .....	21
2.2 Produção de citocinas na inflamação .....	23
2.3 Radiação .....	26
2.4 Ouabaína e sua ação no sistema imunológico .....	28
<b>3. Justificativa do trabalho</b> .....	33
<b>4. Objetivos</b> .....	35
4.1 Objetivo geral .....	35
4.2 Objetivo específico .....	35
<b>5. Material e método</b> .....	36
5.1 Camundongos Swiss albinus .....	37
5.2 Tratamento com a ouabaína .....	37
5.2.1 Tratamento in vitro com diferentes concentrações de ouabaína.....	37
5.2.2 Pré-tratamento in vivo com ouabaína por três dias consecutivos .....	37
5.3 Obtenção da suspensão celular de timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico.....	38
5.4 Irradiação das células .....	38
5.5 Análise da viabilidade celular por MTT .....	39
5.6 Doseamento das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 .....	40
<b>6. Análise estatística</b> .....	41
<b>7. Descrição dos resultados</b> .....	42
7.1 Exposição dos timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico à radiação UVC na presença de diferentes concentrações de ouabaína.....	43
7.2 Exposição dos timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico à radiação UVB na presença de diferentes concentrações de ouabaína .....	47
7.3 Avaliação dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 em culturas de 24h estimulados com UVC .....	50
7.4 Análise do pré-tratamento in vivo com ouabaína 0,56 mg/Kg na cultura de timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico .....	53

7.5	Viabilidade celular dos linfócitos do timo e linfonodo mesentérico pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/Kg e expostos a radiação UVC .....	53
7.6	Avaliação dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 da cultura de linfócitos irradiados com UVC .....	56
7.7	Viabilidade celular dos linfócitos do timo e linfonodo mesentérico pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/Kg e expostos a radiação UVB .....	59
7.8	Avaliação dos níveis de citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 da cultura de linfócitos irradiados com UVB .....	62
<b>8.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>74</b>
<b>10.</b>	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>76</b>
<b>11.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>86</b>
11.1	CEUA .....	86
11.2	Premiação CINASAMA .....	87
11.3	Participação na publicação de artigo .....	88

---

# Introdução

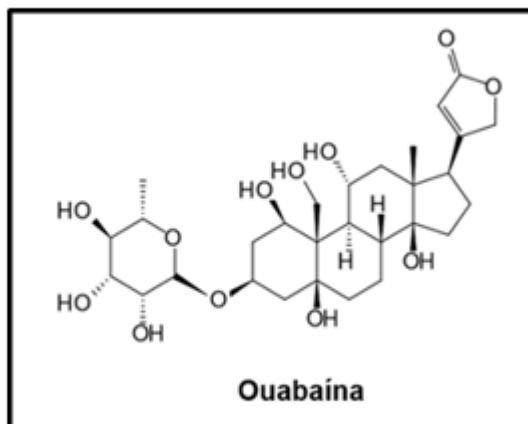
## 1. Introdução

Os Glicosídeos cardiotônicos ou digitálicos cardiotônicos constituem uma família de compostos naturais que apresentam uma grande diversidade na sua forma estrutural e nas atividades biológicas desempenhadas. Esses compostos possuem em comum a capacidade de inibir a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, uma proteína que estabelece o gradiente eletroquímico desses íons através da membrana (SHATZMANN, 1953).

Os digitálicos são classificados em dois grupos principais: os cardenolídeos, que são compostos identificados originalmente em plantas, e os bufadienolídeos, que foram identificados em veneno de sapo. No grupo dos cardenolídeos podemos citar dois exemplos principais: a ouabaína e a digoxina. Nos bufadienolídeos, temos como exemplo a marinobufagenina (NESHER et al., 2009).

A ouabaína (figura 1) é um hormônio esteróide conhecido por ser inicialmente isolado de plantas, tais como a árvore *Acocanthera ouabaio* e também presente nas sementes de *Strophanthus gratus* (SCHONER, 2002) ambos membros da família *Apocynaceae*, que inclui um variado número de espécies que produzem substâncias cardioativas (WITHERING, 1785; BLAUSTEIN & HAMLYN, 2010; TOUZA et al., 2011).

**Figura 1: Estrutura molecular da Ouabaína.**



Fonte: TOUZA et al, 2011

Em 1991, a ouabaína foi descrita como uma substância endógena, circulante no plasma de mamíferos superiores e com as mesmas características estruturais, biológicas e imunológicas encontrada nos vegetais (HAMLIN et al., 1991). Essa classe de compostos são amplamente utilizados na clínica e na pesquisa científica em decorrência da alta afinidade que possuem pelo domínio extracelular da subunidade  $\alpha$  da Na,K-ATPase, atuando como inibidores dessa enzima (KAPLAN, 2002). Com a inibição e o impedimento da atividade normal da Na,K-ATPase ocorre um desequilíbrio hidroeletrolítico, promovido pelo aumento dos níveis citoplasmáticos de sódio e pela perda do íon potássio. Diante disso podemos destacar que a ouabaína é capaz de regular a viabilidade celular quando em concentrações semelhantes aos seus níveis circulantes no organismo (BAGROV et al., 2009; DVELA et al., 2011), o que sugere uma relevância fisiológica para o efeito exercido por esses esteroides cardiotônicos na viabilidade celular. Dessa forma a ação desse hormônio tem sido estudada em diferentes modelos experimentais.

A inflamação é uma complexa resposta que pode ser modulada por substâncias ativas que possuem a capacidade de suprimir uma inflamação desregulada ou até mesmo, aumentar essa resposta inflamatória. O sistema imunológico é constituído por órgãos, células e moléculas que são capazes de manter a homeostase do organismo. A sua linha de defesa compreende desde barreiras físicas como a pele, até processos mais elaborados, que são os fatores humorais e tipos celulares especializados na defesa do organismo contra agentes patogênicos (NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011; FERREIRA et al., 2016).

Dentro desse contexto já foram descritas inúmeras ações para a ouabaína no sistema imunológico, sugerindo que este hormônio atua também como um imunomodulador. Experimentos demonstraram que a ouabaína é capaz de inibir a proliferação linfocitária induzida por vários mitógenos (QUASTEL & KAPLAN 1968; MORAES et al., 1989) como a IL-2(STOECK et al, 1983) o éster de forbol (TPA) (OLEJ et al., 1994), concavalina A (Con A) (SZAMEL et al., 1981) e fitohemaglutinina (PHA) (MORAES et al., 1989), entre outros. Além disso, já foi descrito que em timócitos e linfócitos periféricos a ouabaína aumenta a mobilização de cálcio intracelular (ECHEVARRIA-LIMA et al, 2003) e a expressão da molécula CD69, que está presente em células ativadas (RODRIGUES MASCARENHAS et al, 2003). A ouabaína também é capaz de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  *in vivo* (MATSUMORI et al, 1997; MATSUMORI et al, 2000; FOEY et al, 1997),

induzir o aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos do peritônio de ratos estimulados com lipopolissacarídeos (SOWA et al, 1997) e estimular a apoptose de linfócitos humanos de sangue periférico induzidos por mitógenos (OLEJ et al, 1998; ESTEVES et al, 2005). Dentro de um contexto referente a inflamação e analgesia foi descrito, *in vivo*, por nosso grupo, que a ouabaína atua na inibição de prostanglandina E2, bradicinina e degranulação de mastócito (VASCONCELOS et al, 2011), mostrando então que a ouabaína tem capacidade de modular mediadores do processo inflamatório e por atuar negativamente no reduzindo a produção de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na inflamação (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; DE PAIVA et al., 2011; DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; LEITE et al., 2015; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2008, 2009, 2014). Adicionalmente para compreender melhor as propriedades anti-inflamatórias da ouabaína, também foram realizados estudos com modelo de infecção por *Leishmania amazonensis*, onde houve redução dos níveis de citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos animais infectados (JACOB et al., 2013). Os estudos com a ouabaína vem demonstrando sua ação em vários tipos celulares e na presença de diferentes agentes flogísticos, mas não há relato na literatura sobre a ação da ouabaína na inflamação desencadeada por um agente físico como a radiação ultravioleta.

A radiação ultravioleta (UV) e a luz visível situam-se entre 200 nm e 760 nm e constituem o espectro fotobiológico, resultando na sequência do espectro luminoso de cores (SAMPAIO, RIVITTI, 1998). Ao atingir a pele desprotegida, com ação cumulativa a radiação UV provoca um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas, desenvolvendo uma processo inflamatório. Dentro desse contexto, a exposição à radiação ultravioleta pode resultar na formação de espécies reativas de oxigênio alterações histoquímicas de diferentes gravidades, espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermoepidermica. A radiação UV pode ativar componentes do sistema imunológico cutâneo, gerando uma resposta inflamatória, tais como: ativação direta de queratinócitos e outras células que liberam mediadores inflamatórios e redistribuição e liberação de autoantígenos sequestrados de células danificadas pela própria radiação (MAVERAKIS et al., 2010). A presença da radiação ultravioleta pode ainda desencadear: imunodepressão sistêmica mediada por linfócitos T, diminuição das células *Natural Killer* (NK), regulação imprópria das citocinas e mudança na apresentação de antígenos às células de Langerhans (DUTHIE et al., 1999).

Os mecanismos pelos quais a radiação ultravioleta suprime a resposta imunológica cutânea tem início pelo dano no DNA que desencadeia alterações na morfologia e na função das células de Langerhans apresentadoras de antígenos promovendo a liberação de citocinas IL-1, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Além disso promove a síntese de prostaglandinas E2, que é um mediador inflamatório (SCHRODER et al., 2006).

Diante disso muitos estudos vêm buscando caracterizar o mecanismo de ação da ouabaína no processo inflamatório frente a vários aspectos da resposta imunológica e considerando os efeitos da radiação em processos inflamatórios, esse trabalho busca investigar a ação desse glicosídeo em linfócitos do timo e do linfonodo mesentérico estimulados por radiação ultravioleta UVC e UVB.

---

# Revisão bibliográfica

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Inflamação

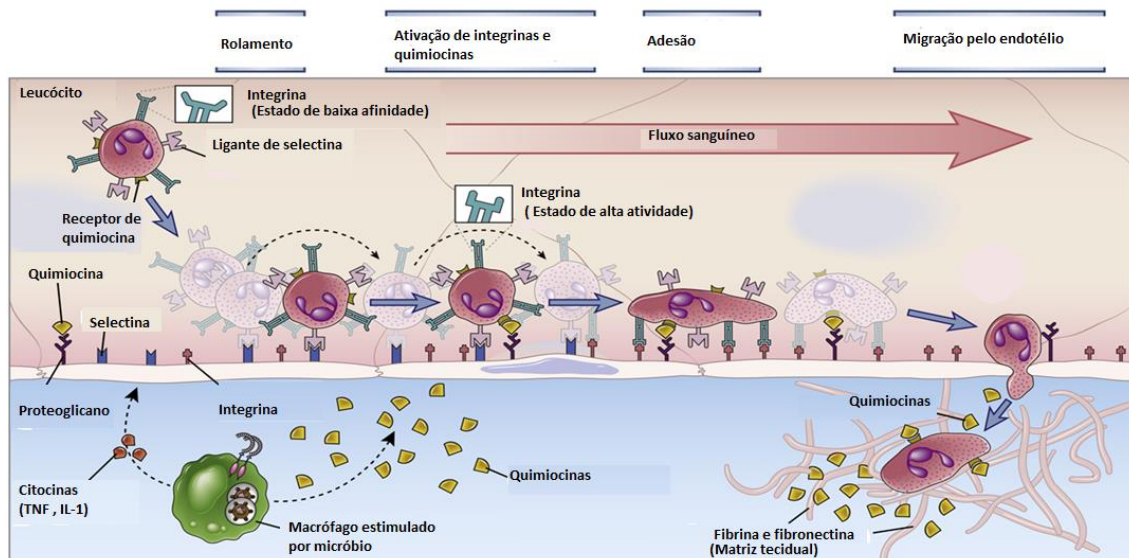
O primeiro processo inflamatório relatado no século I do calendário gregoriano foi elucidado pelo escritor egípcio Aulus Cornelius Celsus, que descreveu a inflamação como um processo ligado a quatro sinais cardinais: dor, rubor, edema e calor. Essa definição é hoje vista como limitada, pois resume o conceito de inflamação a apenas seus sintomas clínicos, deixando de lado a fisiopatologia (SCOTT, 2004). Tal conceito foi então expandido por Galen cerca de dois séculos após os estudos de Celsus sob um ponto de vista humoral do processo inflamatório, propondo que a inflamação seria uma resposta benéfica ao agente lesivo e não outra patologia sobreposta. Essa visão persistiu até o século XIX quando o médico alemão Rudolf Virchow propôs a adição de um quinto sinal cardinal ao processo inflamatório, a perda de função, conectando a inflamação a processos patológicos (PERKINS, 2010).

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por coordenar a ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, bem como o recrutamento de células para o tecido alvo (NAVARRO-XAVIER et al., 2010). Esse evento se inicia imediatamente após o reconhecimento do agente lesivo ou injúria tecidual que induzem uma cascata de sinalização iniciada pela dilatação e permeabilidade vascular. Através do aumento da permeabilidade vascular e da expressão de moléculas de adesão no endotélio ocorre a chegada de células, anticorpos e mediadores ao local da inflamação (ALLER et al., 2007; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Para que aconteça a migração das células para o sítio inflamatório através do endotélio dos vasos, etapa denominada de rolamento, as células residentes do tecido secretam citocinas, dentre elas, o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas IL-1 e IL-6, que estimulam a secreção de quimiocinas como CCL-2 e CXCL-1, além de induzir as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão chamadas selectinas e integrinas (MESQUITA et al., 2008). A ativação de receptores para quimiocinas desencadeia a ativação das integrinas dos leucócitos. A ativação dessas integrinas vai promover uma forte adesão dos leucócitos ao endotélio como as

moléculas ICAM-1 e VCAM-1 favorecendo a passagem dessas células para o local inflamado. Essa etapa é chamada de diapedese, como pode ser observado na figura 2 (WEBER; FRAEMOHS; DE JANA, 2007).

**Figura 2: Esquema do processo de recrutamento de leucócitos do sangue para o sítio de inflamação.**



(Fonte: WEBER; FRAEMOHS; DE JANA, 2007)

Na migração das células pelo endotélio dos vasos, o neutrófilo é um dos primeiros e um dos mais abundantes leucócitos a chegar ao sítio inflamado, sendo considerado uma célula muito importante para a compreensão do processo inflamatório agudo (EPSTEIN & WEISS, 1989; SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003).

Apesar da diversidade de estímulos que podem desencadear a resposta inflamatória, este processo pode ser dividido em fases distintas que envolvem diferentes células do sistema imunológico. A inflamação pode ser classificada didaticamente como aguda ou crônica dependendo do agente causal, da sua duração e das características celulares. A fase aguda do processo é caracterizada por coordenar a ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, bem como o recrutamento de células para a região da inflamação. A continuidade desse evento resulta do desequilíbrio entre recrutamento celular e a depuração do infiltrado imunológico, seguido da proliferação celular local e da apoptose, regulando assim a intensidade da

resposta inflamatória (BUCKLEY et al., 2015). Logo, quando esse processo inflamatório não é contido na fase aguda ou recebe estímulos para se estabelecer continuamente, ele evolui para a fase crônica. A sua resolução é dinâmica e envolve a supressão da expressão de genes pró-inflamatórios, migração de alguns leucócitos e a regulação de mediadores químicos que estão exacerbados na inflamação. Na maioria das vezes, essas células sofrerão morte por apoptose seguida da depuração por fagócitos acarretando a restauração do tecido inflamado e o retorno à homeostasia (SERHAN; SAVILL, 2005, NAVARRO-XAVIER et al., 2010). Durante o processo da resposta inflamatória, a resposta imune desenvolve-se de forma a construir uma imunidade protetora, e uma das células envolvidas é o linfócito, que se originam na medula óssea, migram para os órgãos linfóides primários, como timo para os linfócitos T, e vão para os órgãos linfóides secundários (DOAN et al., 2006).

No caso dos linfócitos do timo (timócitos) o processo de maturação funcional ocorre na medula tímica (EGERTON et al., 1990). Após a etapa de maturação os timócitos são atraídos para a periferia por quimiocinas presentes na corrente sanguínea, migrando para órgãos linfóides secundários como por exemplo o linfonodo mesentérico (TAKAHAMA, 2006).

## **2.2. Produção de citocinas na inflamação**

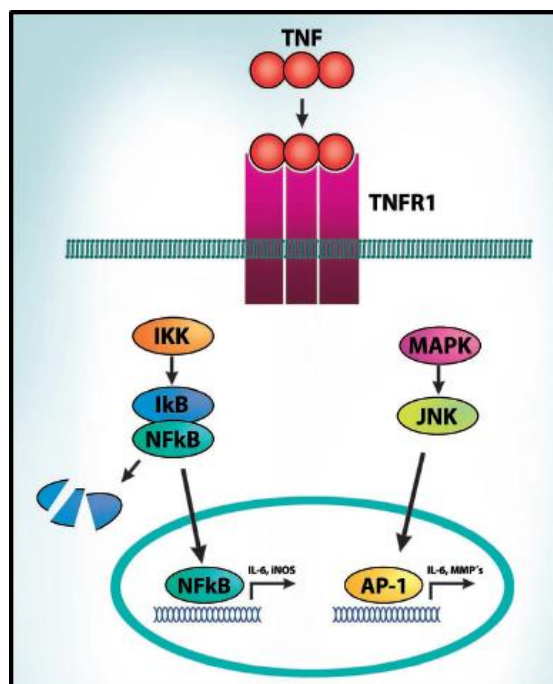
As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa em resposta a microrganismo, agentes químicos e físicos. São substâncias pleiotrópicas que modulam a resposta inflamatória nos locais da infecção, agindo contra os estímulos fisiológicos agressivos, sendo determinantes para o infiltrado celular e para os efeitos sistêmicos durante a inflamação aguda. (OLIVEIRA et al., 2011).

Essas moléculas atuam estimulando o crescimento e a diferenciação de linfócitos, ativação de diferentes células efectoras para eliminação de antígenos, e estimulando a produção de células hematopoéticas. Macrófagos e linfócitos eram considerados as principais fontes de citocinas; entretanto, foi demonstrado que outras células do sistema imunológico podem secretar citocinas sob diferentes circunstâncias (TRAYHURN & WOOD, 2004). A presença de estímulos inflamatórios também favorece a ativação das vias da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), envolvida na síntese de citocinas pró-inflamatórias (TURPEINEN et al., 2010).

As citocinas mais frequentemente caracterizadas dentro de um processo inflamatório, são o fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e a quimiocina CXCL-8 são importantes devido a sua influência na patofisiologia de muitas doenças (LACY; STOW,2011).

O TNF- $\alpha$  é uma proteína de membrana que atua como importante regulador da imunidade e inflamação, bem como da diferenciação e da morte celular (CLARK, 2007). A ação dessa citocina ocorre não só no processo inflamatório, mas também no reparo (remodelamento) tecidual através do estímulo de fibroblastos, angiogênese e produção de proteína quimiotática de monócitos que controla a infiltração de macrófagos e linfócitos (ADEFUYE, 2012). A sua expressão já foi confirmada em vários microambientes de tumores malignos, como câncer de ovário, próstata, melanoma, entre outros (SZLOSAREK et al., 2006), sendo relacionada com o pior prognóstico (BALKWILL & MANTOVANI 2001). No processo inflamatório essa citocina atua por vias de sinalização intracelular que ativam fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B que vão modular a transcrição gênica de várias proteínas pró-inflamatórias. Adicionalmente essa citocina também pode ativar a via das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) como a ERK 1/2, ERK 5, JNK (figura 2) e p 38, que ao serem ativadas atuam fosforilando outras proteínas que regulam a ativação de genes inflamatórios, como demonstrado na figura 3 (ROTHWARE; KARI, 1999; KAMINSKA, 2005).

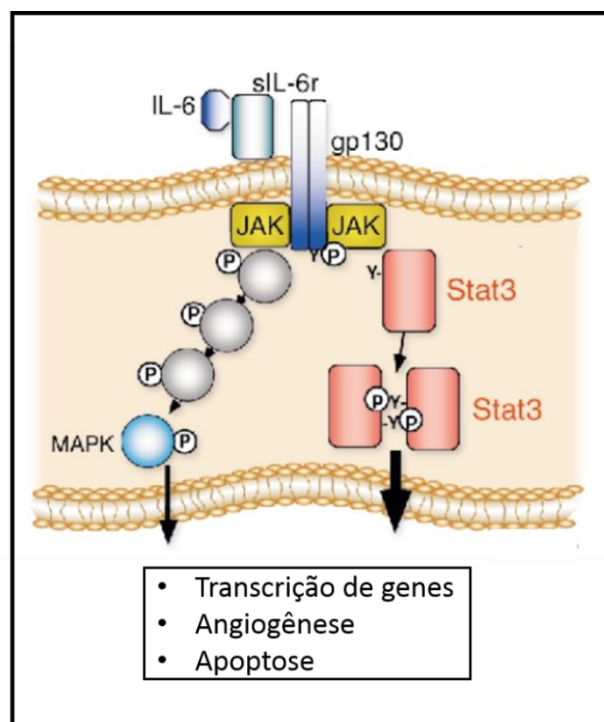
### **Figura 3: Ação do TNF- $\alpha$ ao ligar-se ao receptor TNFR1**



(Fonte: Adaptado de OSÓRIO-COSTA; CARVALHEIRA, 2003). O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) ao se ligar ao receptor de TNF 1 (TNFR1) fosforila o inibidor do fator kappa B nuclear (IKK $\beta$ ) levando à degradação do inibidor de I $\kappa$ B e a migração do fator nuclear NF- $\kappa$ B para o núcleo. O TNF- $\alpha$  também promove a fosforização da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), resultando na atividade da JNK e da proteína ativadora AP-1. Dessa forma, o NF- $\kappa$ B vai ativar fatores de transcrição envolvidos na transcrição de várias proteínas inflamatórias.

A IL-6 que é outra citocina pró-inflamatória com atuação em diversas células alvo que possui muitas atividades biológicas, como principalmente a regulação de respostas inflamatórias e imunes. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são os principais indutores da sua biossíntese (CHAI et al.,1996). O seu nível sistêmico está relacionado com a gravidade de doenças, tais como, obesidade, diabetes e vários tipos de câncer (NEURATH, 2014). A sua ação ocorre mediante a interação com o receptor de membrana IL-6 Ra (figura 4) que está envolvido na via de sinalização JAK-STAT levando a produção de outras citocinas, quimiocinas e recrutamento de leucócitos que fazem parte do arsenal inflamatório (TAUB, 2003).

**Figura 4: Via de sinalização IL-6 / Stat3**



(Fonte: Adaptado de TAUB, 2003). A IL-6 liga-se ao seu receptor solúvel, sIL-6r, que se liga ao receptor da gp130, resultando na ativação da Janus quinase (JAK). Isto leva à ativação da via MAPK e ativação de Stat3 pela fosforilação da tirosina (Y). Stat 3 dimerizado é capaz de translocar para o núcleo e ativar a transcrição gênica.

A IL-6 também desenvolve efeitos anti-inflamatórios ativando uma via alternativa que realiza uma trans-sinalização para a ativação de outros fatores de transcrição envolvidos na cinética molecular do processo inflamatório. Essa via de sinalização ativada, por sua vez, regula a expressão de genes responsáveis pela proliferação celular, angiogênese e apoptose (DMITRIEVA et al., 2016; WANG et al., 2013; YU; PARDOLL; JOVE, 2009).

### 2.3 Radiação

A luz ultravioleta é um tipo de radiação eletromagnética que possui um comprimento de onda menor do que o da luz visível (HOCKBERGER, 2002) e pode ser dividida em três segmentos, de acordo com seu comprimento de onda. A radiação ultravioleta (UV) foi subdividida em três bandas: UVC (240 nm), que fica retida na camada de ozônio, UVB (320 nm) e UVA (320 nm-400 nm) (MAVERAKIS et al., 2010).

Os efeitos da radiação ultravioleta, a depender dos níveis de exposição, envolvem a ativação da resposta inflamatória, com a indução e o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e estão associados a indução de morte celular. Na literatura vários trabalhos investigam o efeito da radiação ultravioleta *in vitro* e *in vivo*. Um estudo *in vivo*, com peixe zebra, relatou o estresse causado pela radiação UV, ativando leucócitos e aumentando citocinas pró-inflamatória como a IL-1, eventos que contribuem para o estabelecimento do processo inflamatório (BANERJEE; LEPTIN, 2014). Em estudos com exposição de radiação UVB em queratinócitos foi visto que a apoptose induzida por radiação pode ser mediada via citocinas, que são mediadores presentes na resposta inflamatória a um estímulo (SCHWARS et al, 2001).

A resposta celular à radiação ionizante produz muitos efeitos lesivos que vão desde a interrupção do crescimento até a morte celular por apoptose, senescência, necrose ou catástrofe mitótica e autofagia (ILYENKO et al., 2011). Os danos celulares deletérios e irreversíveis podem ocorrer imediatamente após a administração de altas doses de radiação, do tipo de radiação emitida, da expressão de determinados genes e do tipo celular (FAVAUDON, 2007). A forma como a célula inicia o seu fenômeno de morte celular é dose-dependente de radiação, ou seja, o dano é tanto maior quanto maior for a dose de radiação absorvida durante o tempo de exposição. Esse fenômeno é caracterizado pela perda da integridade da membrana plasmática, a ativação dos lisossomos e a rápida degradação das organelas intracelulares, como a mitocôndria (SCHRAUFSTATTER et al., 1986; WATSON et al., 1995; GILAD et al., 1996).

Durante a exposição à radiação ocorre a ativação das MAPKs e outras vias de sinalizações, a ativação do p53 é considerado um dos mais importantes reguladores da resposta celular induzida por UV, isso porque a radiação solar é considerada o mais importante carcinógeno em humanos, induzindo e promovendo alteração de DNA. A expressão do p53, gene supressor de tumores, seria o grande marcador genético da radiação ultravioleta (LATONEN; LAIHO, 2005).

A radiação UVC induz lesões no DNA, conhecidas como fotoprodutos, que geram um bloqueio nos eventos de replicação e transcrição. A radiação é conhecida por causar distúrbios na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e o seu acúmulo nas mitocôndrias (LEACH; VAN; LIN, 2001). O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial também aumenta a atividade funcional das desidrogenases mitocondriais. Diante disso, podemos entender que o  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado na mitocôndria aumentou a atividade das

desidrogenases do meio, tornando as mitocôndrias hiperativas e favorecendo o aumento da viabilidade metabólica na radiação exposta (RAI et al., 2018).

A manutenção da homeostasia tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios, inclusive a apoptose. As vias de sinalização que desencadeiam o processo apoptótico são complexas, sendo subdivididas principalmente em duas: apoptose extrínseca, apoptose intrínseca (dependente de caspase e independente de caspase). Esse termo chamado apoptose extrínseca vem sendo amplamente utilizado para indicar os casos de morte celular por apoptose, que são induzidos por sinais de estresse extracelulares sendo sentidos e propagados por receptores transmembranares específicos, como por exemplo, os receptores de TNF (GALLUZZI et al., 2012; DELCROS; MEHLEN, 2013). Já a apoptose intrínseca pode ser desencadeada por uma infinidade de estresses intracelulares, incluindo danos no DNA, estresse oxidativo, acúmulo de proteínas desordenadas no retículo endoplasmático, como também por radiações (GALLUZZI et al., 2012).

Diferentes agentes lesivos como isquemia, hipóxia, hipertermia, metabólitos tóxicos e radiação, podem levar à perda da integridade da membrana plasmática das células (citólise) e à alteração de seus gradientes eletroquímicos. Adicionalmente como resposta a esses estímulos corre a liberação de constituintes intracelulares para o meio extracelular estimulando uma resposta inflamatória local, que não sendo debelada pode ampliar-se até para uma lesão tecidual (PATEL, 2000).

## **2.4 Ouabaína e sua ação no sistema imunológico**

Os glicosídeos cardiotônicos, também conhecidos como digitálicos, pertencem a uma família de hormônios esteróides que são sintetizados e secretados pela glândula adrenal (SCHONER et al., 2007). A ação dos esteroides cardiotônicos envolve a inibição do transporte ativo de Na<sup>+</sup> e de K<sup>+</sup> realizado pela enzima Na, K-ATPase (SKOU; ESMANN, 1992). Essa interação também leva a ativação de várias cascatas de sinalização que induzem mudanças na homeostase do Ca<sup>2+</sup> intracelular e a expressão de genes específicos (NESHER et al., 2009). Os digitálicos são classificados em dois grupos principais: os cardenolídeos, que são compostos identificados originalmente em plantas, e os bufadienolídeos, que foram identificados em veneno de sapo. No grupo dos cardenolídeos podemos citar 2 exemplos

principais: a ouabaína e a digoxina. Nos bufadienolídeos, temos como exemplo a marinobufagenina (NESHER et al., 2009).

A ouabaína, inicialmente conhecida como um composto de origem vegetal extraída das cascas e raízes da árvore Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*), foi identificada como uma substância endógena, circulante no plasma de mamíferos superiores, sendo produzida pela adrenal, hipófise e hipotálamo. Foi o primeiro esteroide cardiotônico identificado no plasma humano no ano de 1991 (HAMLYN et al., 1991; FERRANDI et al., 1997).

Posteriormente, a ouabaína foi isolada do hipotálamo e glândula adrenal bovina (SCHNEIDER et al., 1998; TYMIAK et al., 1993). A partir disso, o córtex adrenal e o hipotálamo foram considerados sítios de produção desse esteroide (KOMIYANA et al., 2001; MURREL et al., 2005). Nos últimos anos, a ouabaína tem sido bastante estudada por sua capacidade de interferir em vários mecanismos mantenedores e reguladores da homeostase do organismo (BAGROV; SHAPIRO, 2008).

Vários eventos fisiológicos como o estresse agudo ao exercício físico (GOTO et al., 1995; BAUER et al., 2005) e a ação como hormônio natriurético (FERRANDI et al., 1997; BLAUSTEIN, 1993) assim como estímulos patológicos como hipóxia e isquemia (DE ANGGELIS & HAUPERT, 1998) são capazes de aumentar os níveis endógenos da ouabaína, podendo ser estimulada também pelo aumento da concentração plasmática de sódio e pela expansão de volume extracelular (WARDENER et al., 1961; BLAUSTEIN, 1993; YAMANDA et al., 1997). Além desse, existem outros estímulos que favorecem a secreção de ouabaína como o hormônio adrenocorticotrófico e angiotensina II, via receptores AT<sub>2</sub> (LAREDO et al., 1997), agonistas  $\alpha$ <sub>1</sub> adrenérgicos (LAREDO et al., 2000) e estimulação  $\beta$ -adrenérgica durante o exercício físico (BAUER et al., 2005). Adicionalmente, níveis elevados de ouabaína foram encontrados em pacientes hipertensos (SCHONER, 2000) assim como em diferentes modelos de ratos com hipertensão (HUANG; LEENEM, 1996). Já foi demonstrado que o exercício físico é capaz de aumentar os níveis de ouabaína em ratos, cachorros e seres humanos alguns minutos após o início da atividade física (GOTO et al., 1992).

A função fisiológica da ouabaína no sistema imunológico ainda não está esclarecida, acredita-se que este glicosídeo seja o regulador fisiológico da Na,K-ATPase (WARD et al., 2002). Devido ao seu uso na clínica o efeito da ouabaína no organismo foi mais estudado em células cardíacas e renais, no entanto, vários

trabalhos do nosso grupo vêm evidenciando o papel imunomodulador desse digitálico (DE PAIVA et al., 2011; DE VASCONCELOS et al., 2011; LEITE et al., 2015; ECHEVARRIA-LIMA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2014; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2018;). Desde o entendimento de que a ouabaína é uma substância endógena, vários trabalhos envolvendo esse digitálico contribuem para o entendimento do seu papel fisiológico.

A ouabaína é capaz de exercer efeitos inibitórios sobre a proliferação linfocitária induzida por diversos estímulos (QUASTEL & KAPLAN, 1968, DE MORAES et al., 1989, OLEJ et al., 1998), assim como sobre a geração de células killer ativadas por linfoquinas (LAK), sem, no entanto, inibir a atividade citotóxica dessas células (DE MORAES et al., 1989, OLEJ et al., 1994).

Adicionalmente alguns estudos com linfócitos ativados demonstram que na presença de ouabaína, não evoluem através do ciclo celular, falhando em exprimir CD25 e/ou secretar IL-2, e isto leva a crer que a ouabaína seria capaz de interferir na progressão do ciclo celular de linfócitos ativados (DORNAND et al., 1986). Demonstrou-se que sua ação *in vitro* pode inibir uma proliferação de timócitos induzidos por mitógenos (SZAMEL et al., 1981), aumentam os níveis de cálcio intracelular (ECHEVARRIA- LIMA et al., 2003) e atuam *in vitro* (MANN et al., 2001) e *in vivo* (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2006) sinergicamente com corticóides. Outros trabalhos apontam como tendo um papel importante no crescimento, diferenciação e morte celular por apoptose (HUANG, LI, XIE, 1997; KOMETIANI et al, 1998; LICHTSTEIN et al, 2000; ISAEV et al, 2000) e de forma interessante foi visto em células renais que sofrem privações esse efeito é revertido em células embrionárias de ratos, através da exposição à ouabaína, demonstrando o desenvolvimento normal dessas células mesmo em condições adversas (LI et al., 2010).

O papel da Ouabaína sobre linfócitos murinos, especificamente os timócitos demonstra que esse digitálico induz a expressão de CD69 através do influxo de cálcio proveniente do ambiente extracelular (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2003), como também atua inibindo a proliferação dessas células estimuladas por concanavalina A (SZAMEL; SCHNEIDER; RESCH, 1981). Tais efeitos podem está relacionados à sua ação sobre a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, reduzindo sua atividade (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2008). Além disso, existem outras situações patológicas nas quais há um aumento significativo dos níveis

de ouabaína endógena, como hipotireoidismo, insuficiência renal crônica e insuficiência cardíaca congestiva (BLAUSTEIN, 1993; GOTTLIEB et al., 1992; GOTO et al., 1995).

Contribuindo para a elucidação da ação da ouabaína, dados do nosso grupo demonstraram em modelos inflamatórios que a ouabaína administrada por via intraperitoneal foi capaz de diminuir o extravasamento de plasma induzido por zimosan (LEITE et al., 2015) e reduzir o edema de pata induzido por carragenina, além de modular a nocicepção em modelo inflamatório de dor induzido por ácido acético (DE VASCONCELOS et al., 2011), como também redução da inflamação das vias aéreas em modelos experimentais de asma (GALVÃO et al., 2017). De acordo com essas propriedades anti-inflamatórias da ouabaína, outros estudos foram realizados em modelo de infecção por *Leishmania amazonensis* para compreender melhor a capacidade da ouabaína em modular processos inflamatórios na presença de um agente infeccioso. Os animais infectados que receberam ouabaína por injeção intraperitoneal apresentaram uma redução de células na cavidade peritoneal devido à inibição da migração de neutrófilos induzida pelo protozoário. Também foi observado que na presença de ouabaína houve redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos animais infectados (JACOB et al., 2013).

Mediante o exposto, vários estudos sugerem que os esteroides cardiotônicos desempenham atividade imunomoduladora (TAKADA et al., 2009; YANG et al., 2005) em que a ouabaína tem apresentado a capacidade de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica por atuar negativamente no processo inflamatório relacionado a produção de citocinas e a fatores de transcrição envolvidos na inflamação (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; DE PAIVA et al., 2011; DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; LEITE et al., 2015; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2008, 2009, 2014).

Diante da ação da Ouabaína frente a vários aspectos da resposta imunológica, nesse trabalho abordamos sobre as células dos órgãos linfoides primário (timo) e secundário (linfonodo mesentérico) que são importantes para compor a resposta inflamatória a agentes lesivos ou agentes físicos, como a radiação.

---

**Justificativa**

### 3. Justificativa do trabalho

No processo inflamatório há complexidade e dinamismo que são mediados através de eventos celulares e humorais. Nesse contexto o desenvolvimento desse trabalho se justifica pelo fato de diversos trabalhos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, evidenciarem a ação da ouabaína no sistema imunológico, demonstrando dentre seus efeitos um potencial antiinflamatório. Diante disso, nos últimos anos a ouabaína tem sido amplamente estudada por sua capacidade de interferir em diversos mecanismos reguladores e mantenedores da homeostase (BAGROV; SHAPIRO, 2008).

Diversos trabalhos do nosso grupo destacam a ação anti-inflamatória da ouabaína e a elucidação de seu mecanismo vem sendo construída a cada modelo experimental estudando buscando entender o seu papel fisiológico e sendo uma molécula promissora com o intuito de contribuir com o conhecimento científico e para o surgimento de novos alvos terapêuticos. Tendo em vista o seu conhecimento como hormônio capaz de regular a homeostase do organismo, propomos nesse trabalho avaliar a ação da ouabaína frente a ação do estímulo físico representado pelas radiações UVC e UVB, analisando o seu impacto na viabilidade linfocitária e na síntese de citocinas pró-inflamatórias.

---

# Objetivos

## 4. Objetivos

### 4.1 Geral:

Avaliar a atividade da Ouabaína em cultura de células do timo e do linfonodo mesentérico irradiados com UVC e UVB.

### 4.2 Específicos:

- **Tratamento *in vitro* com Ouabaína**
  - ✓ Análise da viabilidade celular por MTT em linfócitos do timo e linfonodo mesentérico mantidos em cultura na presença e na ausência de ouabaína em diferentes concentrações após estímulo com radiação UVC e UVB.
  - ✓ Análise do perfil de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 em linfócitos mantidos em cultura sob estímulo de radiação UVC.
  
- **Pré -tratamento *in vivo* da Ouabaína**
  - ✓ Análise da viabilidade celular por MTT em linfócitos do timo e linfonodo mesentérico mantidos em cultura na presença e na ausência de ouabaína após estímulo com radiação UVC e UVB.
  - ✓ Análise do perfil de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 em linfócitos mantidos em cultura sob estímulo de radiação UVC e UVB.

---

# Metodologia

## 5. MATERIAL E MÉTODO

### 5.1 Camundongos *Swiss albinus*

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, pesando entre 25 e 30g. Os animais foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do IPefarm da Universidade Federal da Paraíba. Esses animais foram mantidos com livre acesso a água e alimento em uma sala com temperatura entre  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , e ciclos claro/escuro de 12h, utilizados e manuseados conforme o as normas do CONCEA, aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) com certidão de nº106/2017.

### 5.2 Tratamento com Ouabaína

#### 5.2.1 Tratamento *in vitro* com diferentes concentrações de Ouabaína

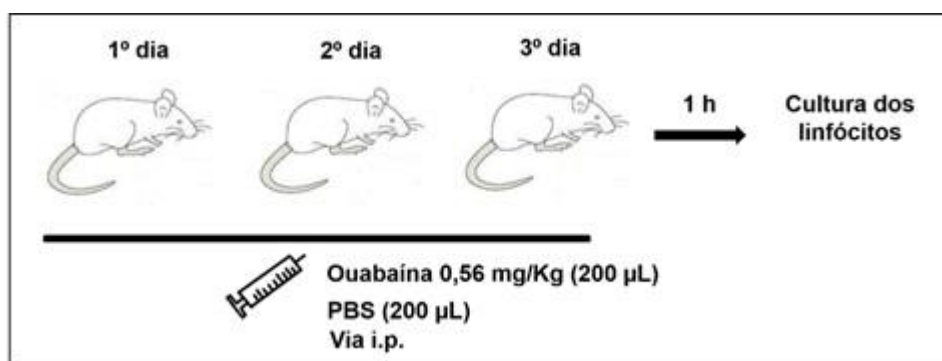
Para a realização dos testes *in vitro* com a ouabaína em cultura utilizando diferentes concentrações, foi preparada uma solução mãe a 1mg/mL de ouabaína em PBS estéril. Dessa solução de ouabaína eram preparadas as soluções de trabalho, para se obter as concentrações de 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 100 nM por poço, colocadas em placas de 96 poços.

#### 5.2.2 Pré-tratamento *in vivo* com Ouabaína por três dias consecutivos

Para os experimentos com o tratamento da ouabaína na dose de 0,56 mg/kg *in vivo*, inicialmente os animais foram separados em grupos denominados ouabaína e controle para diferenciar o tratamento. Os animais eram pré-tratados por três dias consecutivos por via intraperitoneal (i.p) com a injeção de 200  $\mu\text{L}$  de ouabaína 0,56 mg/Kg essa dose foi estabelecida baseada na curva dose-resposta em que foi utilizada três concentrações de ouabaína 0,10 mg/Kg, 0,31mg/Kg e 0,56 mg/Kg (DE VASCONCELOS, et al.,2011; LEITE et al., 2015),

O grupo controle recebeu 200  $\mu$ L de PBS estéril também por via intraperitoneal. No último dia de tratamento, uma hora após administração das soluções, era realizada a cultura de linfócitos do timo e do linfonodo mesentérico.

**Figura 6: Delineamento do pré-tratamento com a ouabaina 0,56 mg/Kg.**



(Fonte: AUTOR, 2018)

### 5.3 Obtenção da suspensão celular de linfócitos do timo e linfonodo mesentérico

Após a anestesia com Ketamina e Xilasina foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical, era realizada a retirada do timo e do linfonodo mesentérico e separados em placas de petri contendo 10mL PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino. Nessas placas os órgãos eram macerados separadamente com o auxílio de duas lâminas histológicas em movimentos de atrito da sua superfície em contato com o órgão. As suspensões foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos para obtenção das células. As células foram resuspensas em PBS para contagem em câmara de Neubauer, coradas com azul de Trypan (1:10), através de um microscópio óptico comum. Após a contagem, as células foram ajustadas para  $4 \times 10^5$  céls/ml e plaqueadas em placa de 96 poços fundo chato colocando 200 $\mu$ l por poço.

### 5.4 Irradiação dos linfócitos

A exposição à radiação UVC (254 nm) do fluxo laminar e UVB (312 nm) acontece em seguida após as células serem plaqueadas, e tempo de exposição em

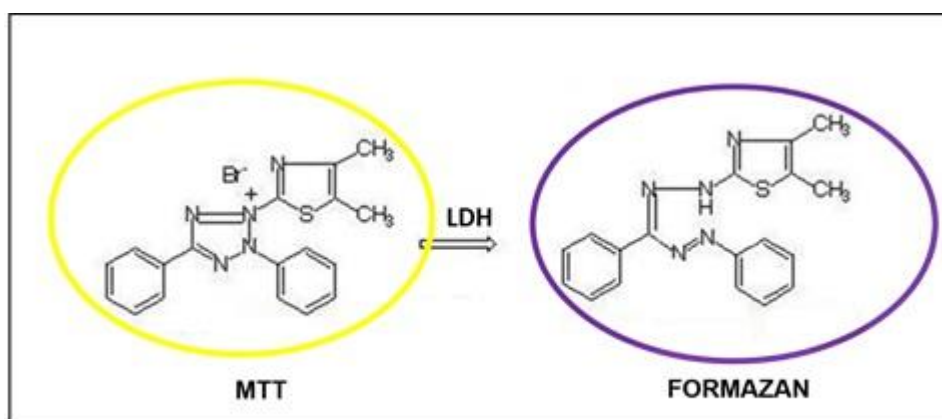
ambas radiações foi de 2 min com as células na presença de PBS. A fonte de UVC usada para irradiação foi o fluxo laminar do laboratório de Imunofarmacologia onde se desenvolveram os experimentos. A fonte de UVB utilizadas foram duas lâmpadas Philips TL20W/12RS. Ambas radiações tiveram suas doses monitoradas com um dosímetro Vilber Lourmat modelo VLX-3W (Vilber Lourmat) equipado com sensor para o comprimento de onda de 245nm e 312 nm, respectivamente.

Após o período de exposição a radiação UVC e UVB, as placas eram centrifugadas a 300g por 7 minutos, o PBS é retirado e adiciona-se o meio RPMI suplementado com 10% de SFB, e foram adicionadas as concentrações de Ouabaína (100µM, 10 µM, 1 µM e 100 nM) para avaliação após 6 e 24 h de cultura, com essas placas mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C. As células obtidas dos animais pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/Kg por três dias consecutivos também passaram pelas mesmas condições de exposição à radiação e foram avaliadas após 6 e 24 h de cultura.

### 5.5 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do método de MTT (brometo de 3-metil-[4-5dimetiliazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) descrito por Mosmann (1983). Esse método é baseado na capacidade das enzimas mitocondriais (desidrogenases) de células viáveis transformar o sal de tetrazólio (MTT), de cor amarela, no seu derivado formazan azul (cor violeta).

Figura 6: Esquema da conversão do MTT em formazan.



Fonte: Adaptado de MOSMANN, 1983

Dessa maneira, quanto maior a intensidade da cor violeta, mais células metabolizaram o MTT em cristais de formazan e assim, maior a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Após coleta do sobrenadante da cultura, foi adicionado à placa 90 µL de meio RPMI e 10 µL de MTT a 5 mg/mL (solução amarela) e a mesma foi incubada por 4 h em estufa de CO<sub>2</sub>. Após isso, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados (formando a cor roxo). A viabilidade celular foi quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda a 570 nm, determinada por um leitor de placas.

### **5.6 Doseamento das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6.**

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 foram quantificadas por ensaio Imunoenzimático ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante Bioscience (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Na determinação das citocinas, as placas de ELISA (NUNC – Immuno™) foram sensibilizadas com anticorpo de captura, anti TNF- $\alpha$ , anti IL-6 e incubados por 18 h a 4°C. Após esse período as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por uma hora e posteriormente lavadas com o PBS-Tween 20. Em seguida foram adicionadas as amostras e as diferentes concentrações de citocinas recombinantes TNF- $\alpha$  e IL-6, para a realização da curva. As placas foram então incubadas por 18 h a 4°C.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo formado pelo anticorpo de detecção foi adicionado às placas e incubados por 1h. Posteriormente foram novamente lavados e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionada. As placas foram incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com o ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em espectrofotômetro num filtro de 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir da curva padrão de cada uma.

## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram analisados utilizando o teste ANOVA não paramétrico, seguido do pós teste de Tukey. As diferenças entre os grupos serão consideradas significativas quando os valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPadPrism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

---

## **Descrição dos resultados**

## 7. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Diante do entendimento de que a radiação é uma agente lesivo potencial para as células, o processo inflamatório causado por esse tipo de exposição foi inicialmente visto nesse trabalho através da viabilidade dessas timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico, irradiados com UVC e UVB, em cultura, na presença e na ausência da ouabaína.

Os resultados foram descritos começando pelos dados obtidos nos experimentos *in vitro* com diferentes concentrações de ouabaína em UVC e UVB e depois descrevemos os resultados referentes ao pré-tratamento com Ouabaína *in vivo* no mesmo modelo experimental.

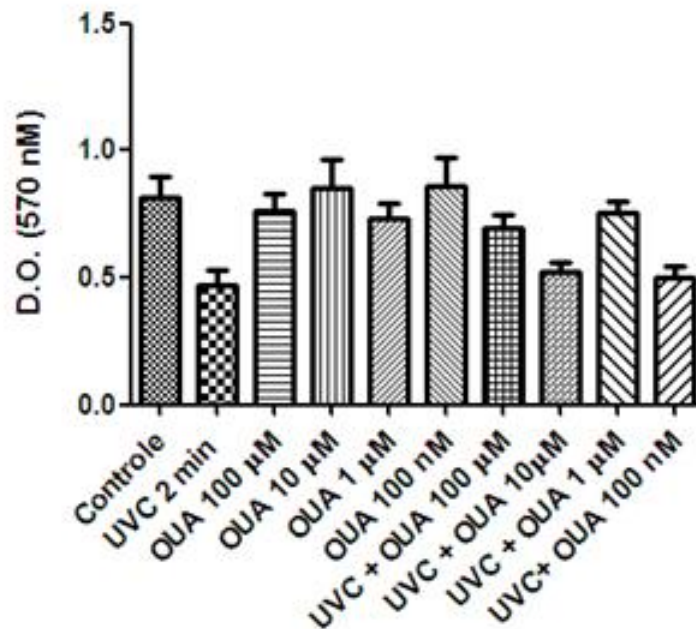
### 7.1 Viabilidade dos linfócitos expostos à radiação UVC na presença de diferentes concentrações de Ouabaína.

A sobrevivência celular analisada através da viabilidade com MTT, foi utilizada como medida para investigação dos efeitos da radiação UVC. O primeiro passo foi avaliar a ação da ouabaína em diferentes concentrações (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10 nM) em cultura de timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico.

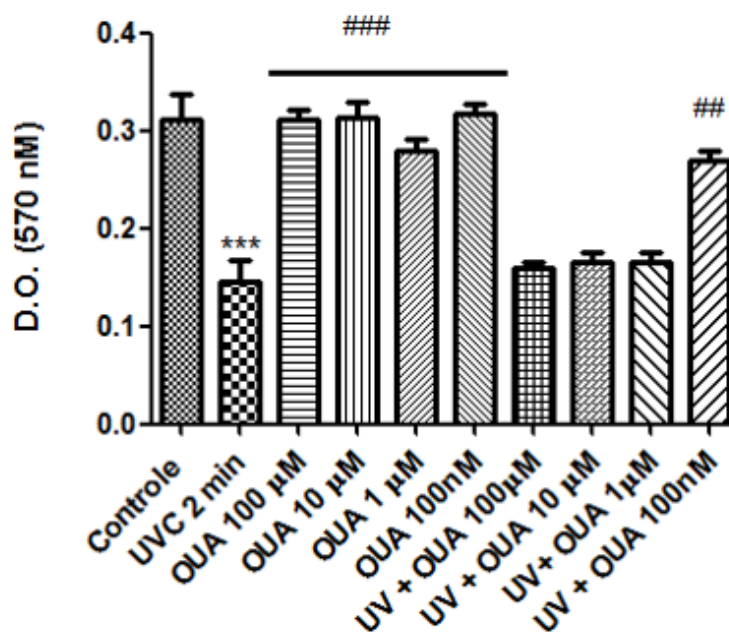
A exposição a lâmpada UVC ocorreu por um tempo de 2 minutos e foi observado seus efeitos após 6h e 24 horas de cultura. Na viabilidade dos timócitos observou-se que o estímulo com a radiação UVC foi capaz de induzir a morte em timócitos após 6 horas (gráfico 1A) e 24h (gráfico 1B). Na presença apenas de ouabaína nas diferentes concentrações, as células permaneceram viáveis, mostrando que a ouabaína não induz morte celular nessas condições. O tratamento *in vitro* foi relevante na concentração de 100 nM após 24 horas, em que a ouabaína foi capaz de reverter parcialmente a morte celular desencadeada por radiação UVC em timócitos (gráfico 1B).

**Gráfico 1:** Viabilidade dos timócitos irradiados por 2 minutos de UVC em 6 h (A) e 24 h (B)

A)



B)



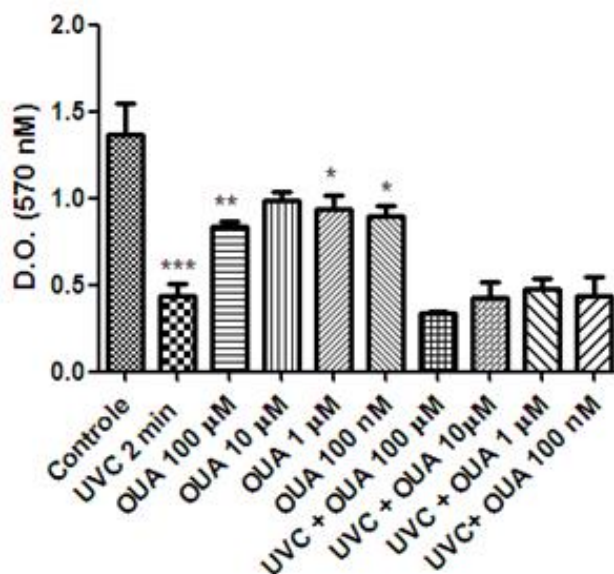
Os timócitos foram tratadas com a ouabaína em diferentes concentrações (100 µM, 10 µM, 1 µM e 100 nM), e expostos a radiação UVC por 2 min e mantidos em cultura por 6h (gráfico 1A) e 24h (gráfico 1B). Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos (n=3) em triplicata,

e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  (grupos comparados com o controle); ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVC)

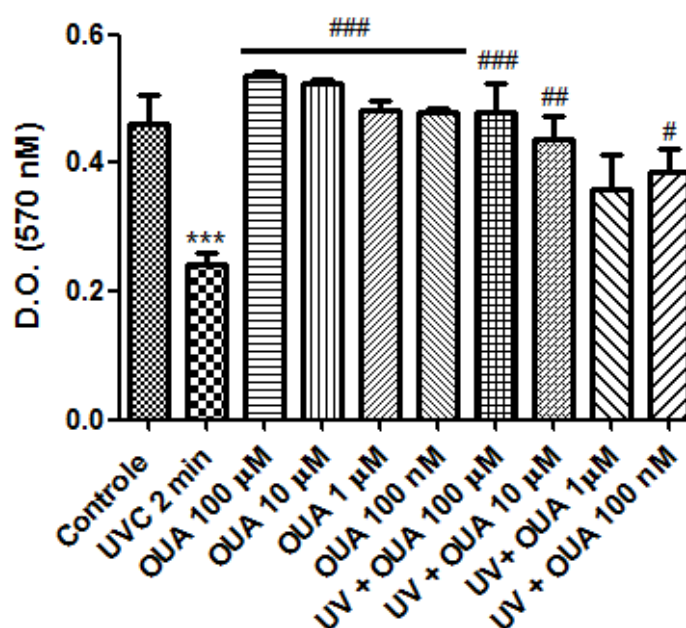
Ao avaliarmos a viabilidade do linfonodo mesentérico (gráfico 2) vimos que a exposição à radiação UVC por 2 minutos foi capaz de induzir a morte celular quando comparada com o grupo controle que não foi exposto a radiação. Assim como foi observado no gráfico 1B para os timócitos, os linfócitos do linfonodo mesentérico apresentaram-se viáveis em 24 horas de cultura na concentração de 100nM, como também em duas outras concentrações maiores 100  $\mu$ M e 10 $\mu$ M. Mais uma vez vimos também que a ouabaína favorece viabilidade desses tipos de células na presença e na ausência da radiação UVC, Diante disso, vimos que as concentrações de 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 100 nM foram capazes de proteger essas células da morte celular em 24 horas de cultura (gráfico 2B).

**Gráfico 2 : Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico irradiados por 2 minutos de UVC e mantidos em cultura por 6 h (A) e 24 h (B).**

A)



B)



Os linfócitos do linfonodo mesentérico foram tratados com a ouabaína em diferentes concentrações (100 µM, 10 µM, 1 µM e 100 nM), na ausência ou presença de radiação UVC por 6 e 24h. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos  $n=3$  em triplicata, e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVC).

Esses resultados demonstram que a ouabaína na concentração de 100 nM e frente ao estímulo de 2 min de radiação UVC em 24 horas (gráfico 2B) de cultura, apresenta ação protetora em timócitos e linfócitos irradiados. Adicionalmente a esses dados, as concentrações de 100 µM e 10 µM, também mantiveram os linfócitos do linfonodo mesentérico viáveis.

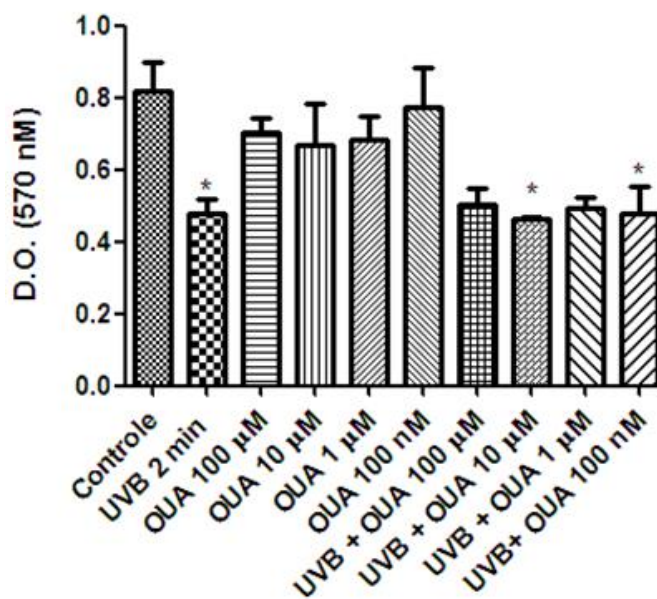
## 7.2 Exposição dos linfócitos à radiação UVB na presença de diferentes concentrações de Ouabaína

Nas mesmas condições experimentais que os dados anteriores, avaliamos a ação da ouabaína em diferentes concentrações na presença de um outro estímulo de radiação, a ultravioleta B. A viabilidade dos linfócitos do timo e do linfonodo mesentérico expostos a radiação UVB foram representados nos gráficos 3 (A e B) e no gráfico 4 (A e B).

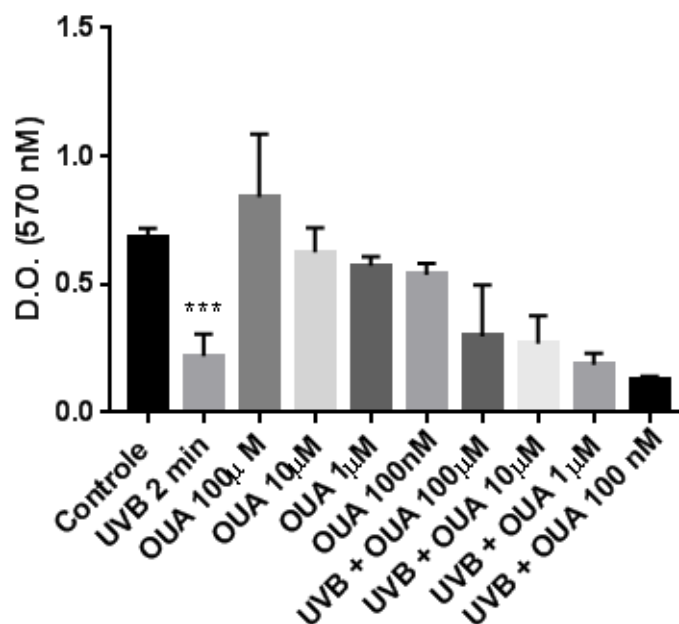
Mediante o estímulo da radiação UVB por dois minutos, observamos que essa radiação proporcionou a morte celular nos timócitos em 6 e em 24 horas de cultura e a ouabaína não foi capaz de reverter esse fenômeno nas concentrações de 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10 nM (gráfico 3A e 3B), respectivamente.

**Gráfico 3 A e B:** Viabilidade dos timócitos irradiados com UVB e mantidos em cultura por 6h (A) e 24 h (B).

E)



F)

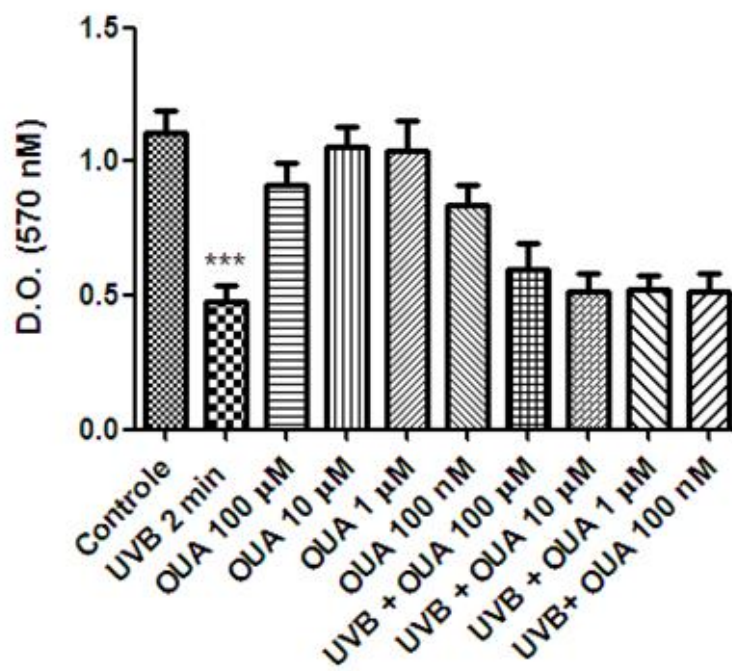


Os timócitos foram tratadas com a ouabaína em diferentes concentrações (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 100 nM), na ausência ou presença de radiação UVB por 6 e 24h. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos  $n=3$  em triplicata e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$  (grupos comparados com o controle).

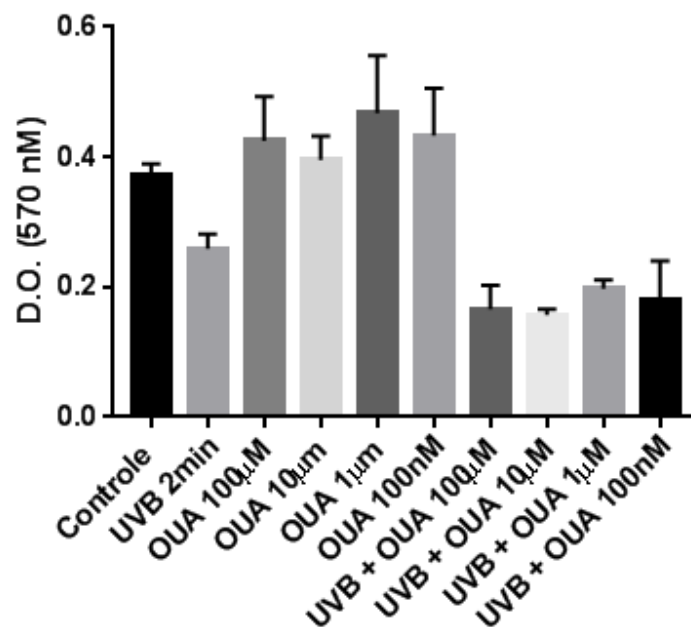
Os linfócitos do linfonodo mesentérico (LM) (gráfico 4) também foram expostos a radiação UVB por dois minutos e durante o mesmo tempo de manutenção da cultura (6h e 24h). Os resultados encontrados foram semelhantes aos dos timócitos para esse estímulo de radiação, em que a ouabaína nas concentrações estudadas nesse trabalho não reverteu a morte celular desencadeada pela radiação UVB, como podemos ver no gráfico 4A e 4B.

**Gráfico 4 A e B.** Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico irradiados com UVB e mantido em 6 (A) e 24 (B) h de cultura.

A)



B)



Os linfócitos do linfonodo mesentérico foram tratados com a ouabaína em diferentes concentrações (100 μM, 10 μM, 1 μM e 100 nM), na ausência ou presença de radiação UVB por 6 e 24h. Os dados numéricos foram apresentados em média ± e.p.m. de três experimentos em duplicata com n=3, e

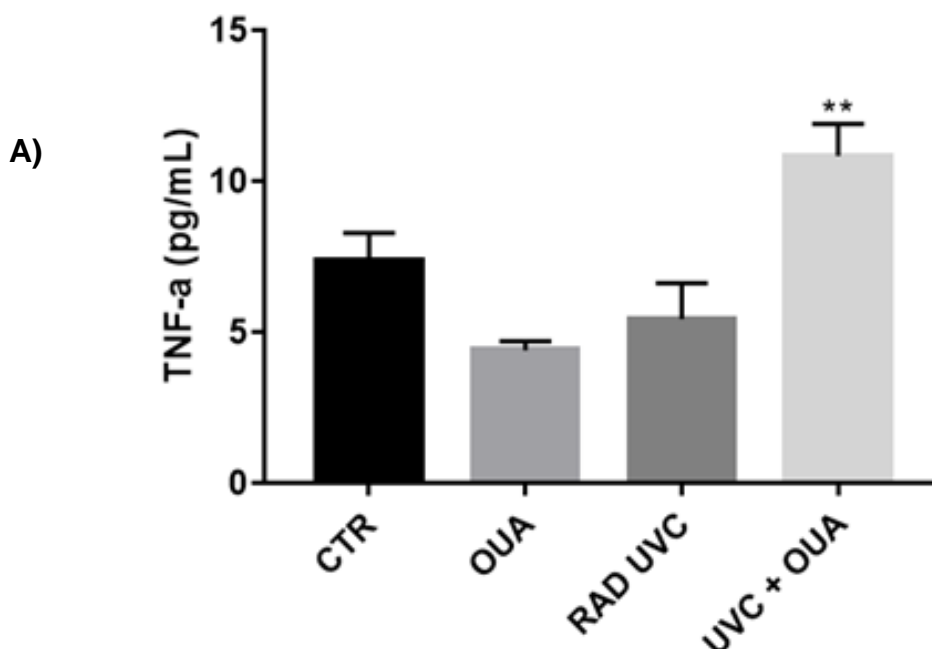
analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  (grupos comparados com o controle).

### 7.3 Avaliação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 em cultura de 24h estimulada por UVC.

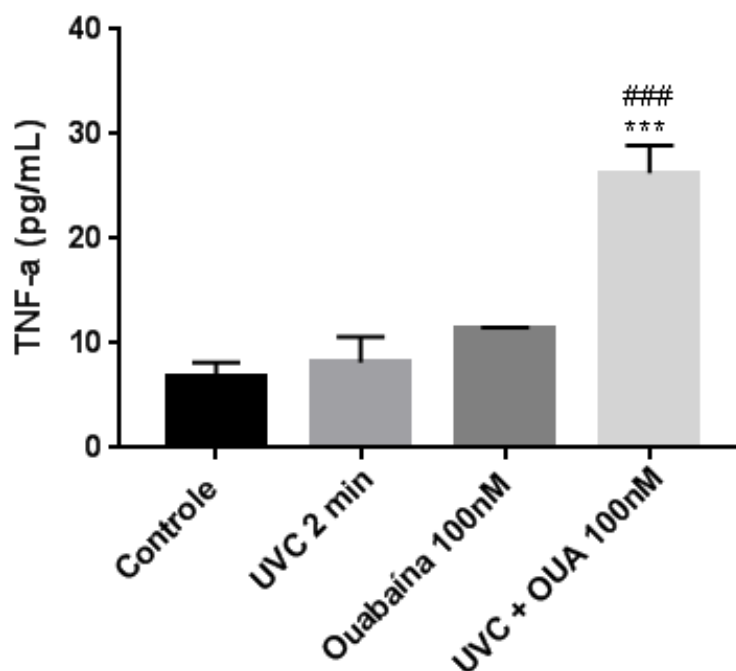
Os resultados encontrados na viabilidade dos timócitos e linfócitos que foram expostos a radiação UVC demonstraram que no grupo tratado com ouabaína na concentração de 100 nM houve um aumento da viabilidade dessas células. Diante disso avaliamos se a ouabaína na concentração de 100 nM mantinha as células viáveis por interferir nos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6.

Os resultados encontrados para o TNF- $\alpha$  mostram o fluxo de radiação dispensado em 2 minutos não foi suficiente para estimular a produção de TNF- $\alpha$  de forma significativa, mas que a associação com a ouabaína 100nM favoreceu a produção de TNF- $\alpha$  em as células.

**Gráfico 5 A e B:** Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de timócitos (A) e de linfócitos do linfonodo mesentérico (B) que foram estimulados por UVC.



B)



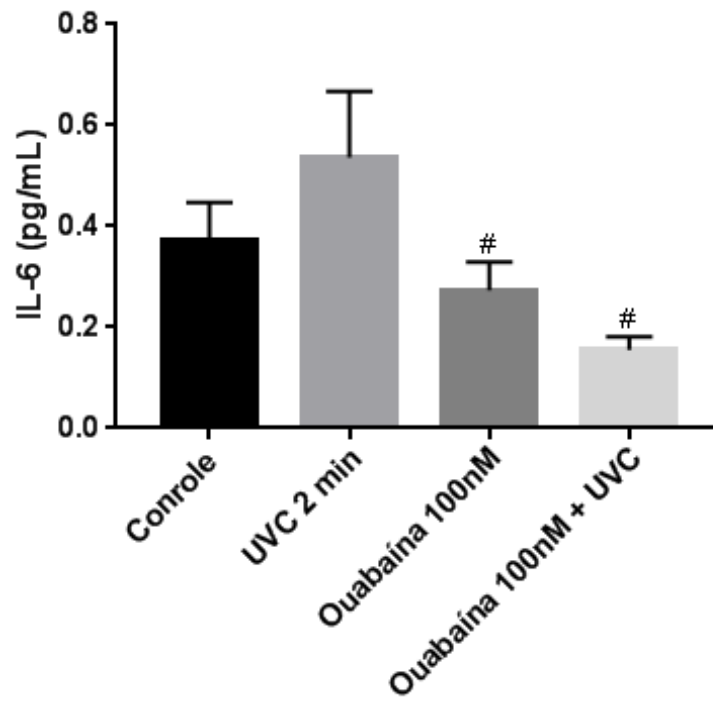
Os níveis de TNF- $\alpha$  foram quantificados a partir do sobrenadante da cultura de 24h referente a concentração de 100 nM. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVC).

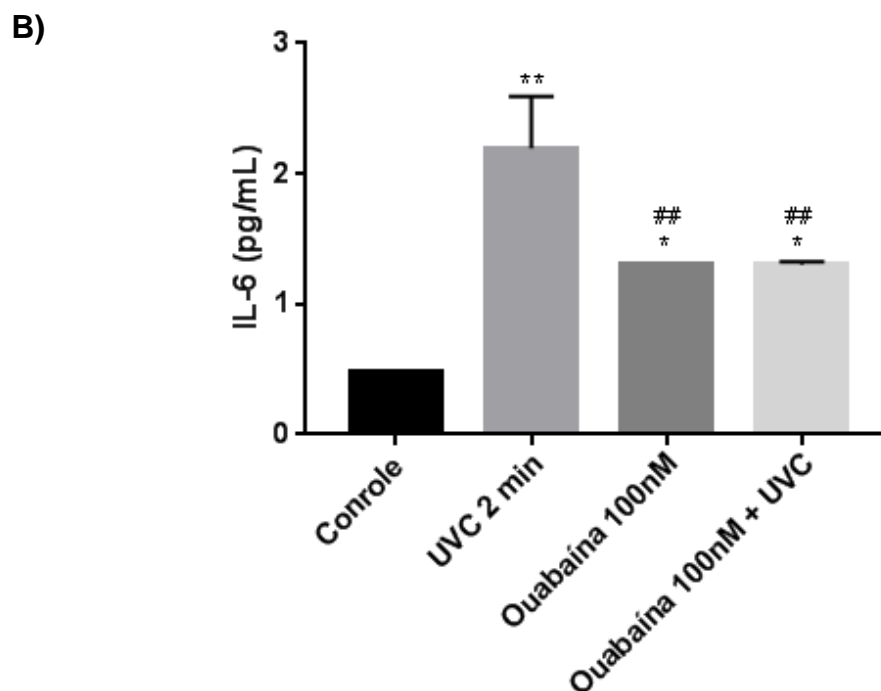
Ao analisarmos os resultados vimos que a radiação UVC nos timócitos tende a aumentar o nível de IL-6 (gráfico 6A) e nos linfócitos do linfonodo mesentérico esse efeito acontece de forma significativa quando comparada o grupo controle, em que os níveis estão basais (gráfico 6B).

Obtivemos como resultado que a associação com ouabaína 100 nM *in vitro* foi capaz de reduzir essa citocina pró-inflamatória no timo (gráfico 6A) quando comparado ao estímulo com UVC na ausência de ouabaína. Esse efeito também foi visto para os linfócitos do linfonodo mesentérico quando associados com a ouabaína 100 nM que foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis dessa citocina pró-inflamatória mediante o estímulo com UVC (gráfico 6B).

**Gráfico 6 A e B:** Determinação dos níveis de IL-6 no sobrenadante da cultura de linfócitos do timo (A) e do linfonodo mesentérico (B) que foram estimulados por UVC.

**A)**





Os níveis de IL-6 foram quantificados a partir do sobrenadante da cultura de 24h referente a concentração de 100 nM. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos com  $n=3$ . Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  (grupos comparados com o UVC).

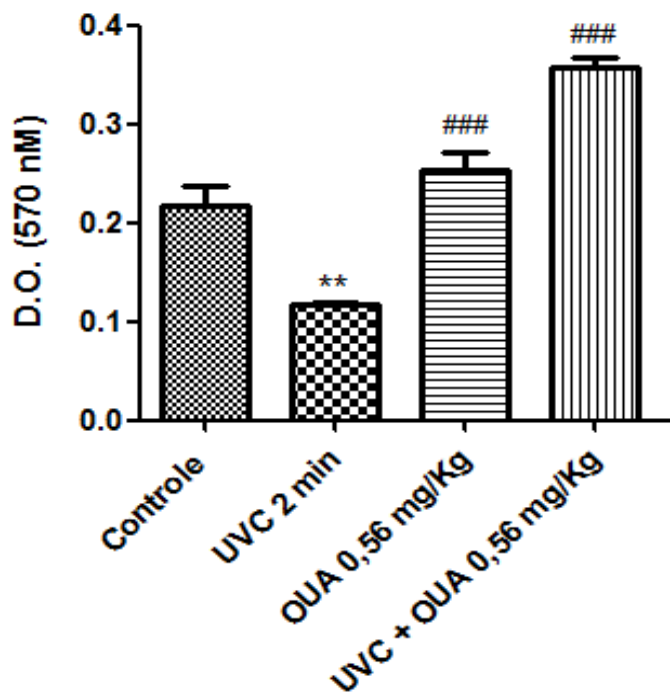
#### **7.4 Análise do pré-tratamento *in vivo* com Ouabaína 0,56 mg/Kg na cultura de linfócitos do Timo e Linfonodo mesentérico**

##### **7.4.1 Viabilidade celular dos linfócitos do timo e linfonodo mesentérico pré-tratados com ouabaína 0,56mg/Kg e expostos a radiação UVC**

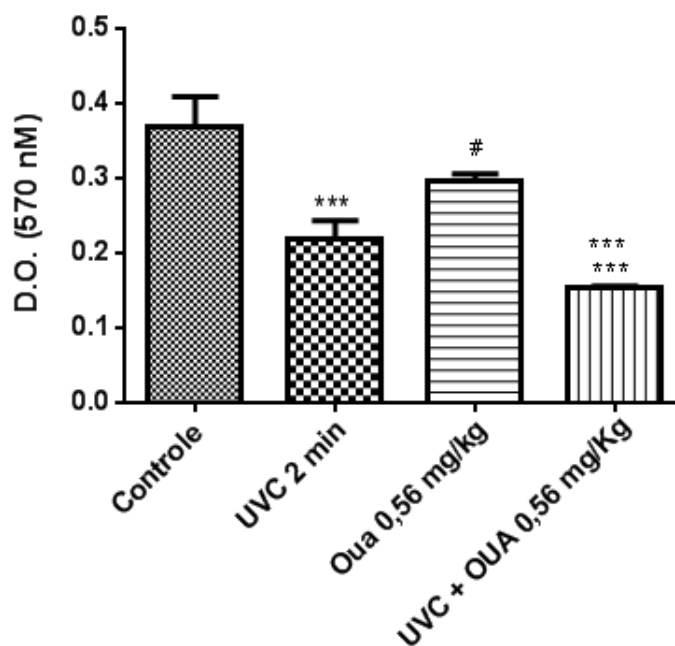
Dados do nosso grupo demonstram a ação da ouabaína em vários modelos onde é realizado o pré-tratamento por três dias consecutivos na dose de 0,56 mg/kg. Diante disso fomos investigar se a Ouabaína interferia na viabilidade dos linfócitos do timo e do linfonodo mesentérico, quando os animais eram pré-tratados por via intraperitoneal (200  $\mu$ L). Avaliamos então a viabilidade celular pelo método do MTT em dois tempos de cultura (6h e 24 h), na presença de um fluxo de radiação UVC emitido em 2 minutos.

**Gráfico 7 A e B:** Viabilidade dos timócitos pré-tratados com ouabaína e expostos a radiação UVC mantidos em cultura de 6h (A) e 24h (B).

A)



B)

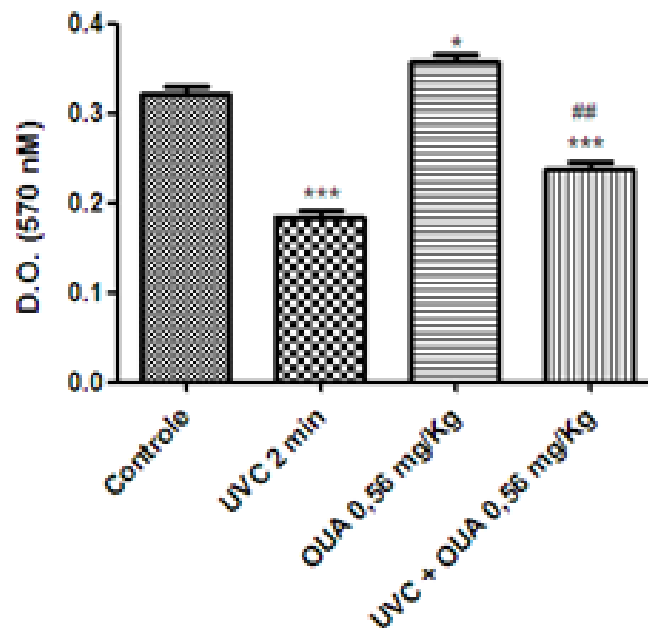


Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de ouabaína (0,56 mg/kg) e PBS estéril. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos em duplicata com  $n=3$ , e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVC).

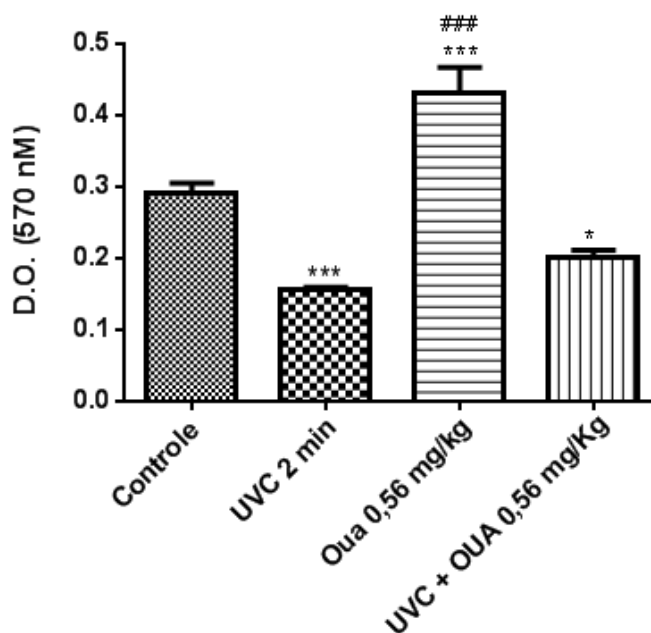
O pré-tratamento com ouabaína 0,56 mg/kg protegeu os timócitos da morte celular desencadeada por UVC em 6 horas de cultura, mas esse efeito não foi observado em 24 horas de cultura. No gráfico da cultura de 24h (7B) a ouabaína 0,56 mg/Kg manteve as células viáveis na ausência da radiação UVC, mas esse efeito não foi observado nessas células irradiada.

**Gráfico 8:** Viabilidade dos linfócitos do linfonodo mesentérico pré-tratados com ouabaína e irradiados com UVC em cultura de 6h (A) e 24h (B).

A)



B)



Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de ouabaína (0,56 mg/kg) e PBS estéril. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos em duplicata com  $n=3$ , e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$  (grupos comparados com o controle); ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVC).

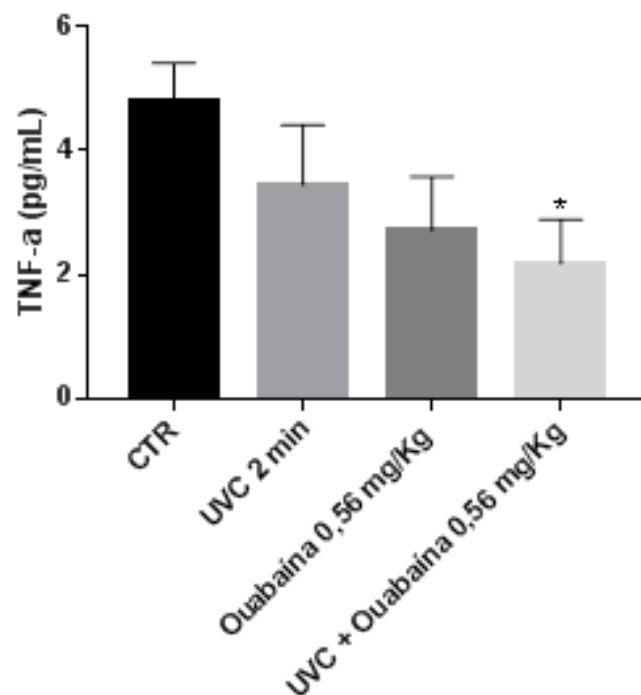
Os resultados obtidos demonstram que a viabilidade dos linfócitos do linfonodo foi mantida de forma significativa em 6 horas de cultura (gráfico 8A), assim como ocorreu para os timócitos mantidos em cultura pelo mesmo tempo. Em 24 h de cultura o pré-tratamento com ouabaína não foi capaz de proteger as células da morte celular causada pela radiação UVC (gráfico 8B).

#### 7.4.2 Avaliação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 da cultura de linfócitos irradiados com UVC.

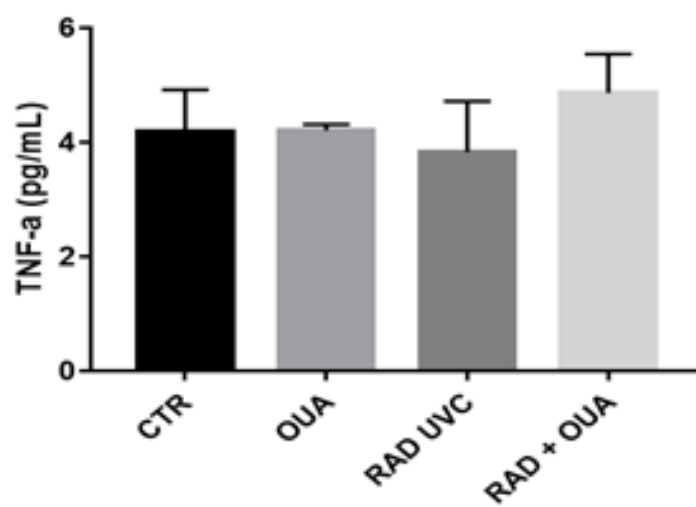
O pré-tratamento com Ouabaína 0,56 mg/Kg associado com a radiação UVC em 6 horas de cultura, não influenciou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (timócitos (A), linfonodo mesentérico (B)), IL-6 (timócitos (C) e linfonodo mesentérico (D)) quando comparado ao grupo que recebeu somente radiação UVC por 2 minutos.

Na avaliação dessas citocinas observamos uma redução do TNF- $\alpha$  nos timócitos (gráfico 9A) quando comparamos com os níveis dessa citocina basal, tal efeito não foi visto nos linfócitos do linfonodo mesentérico. De forma interessante também vimos um aumento significativo na produção de IL-6 pela ouabaina nos linfócitos do linfonodo mesentérico, tal fato não se repetiu para os timócitos.

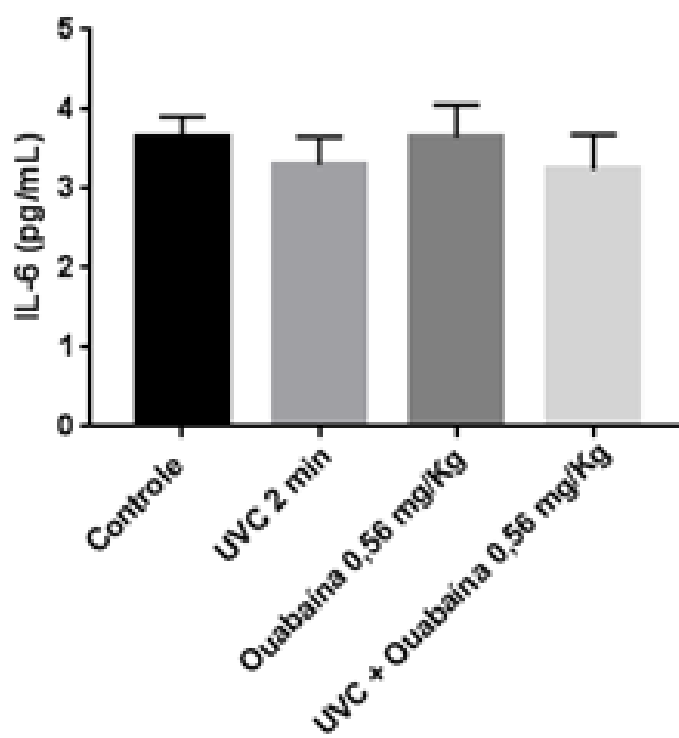
A)



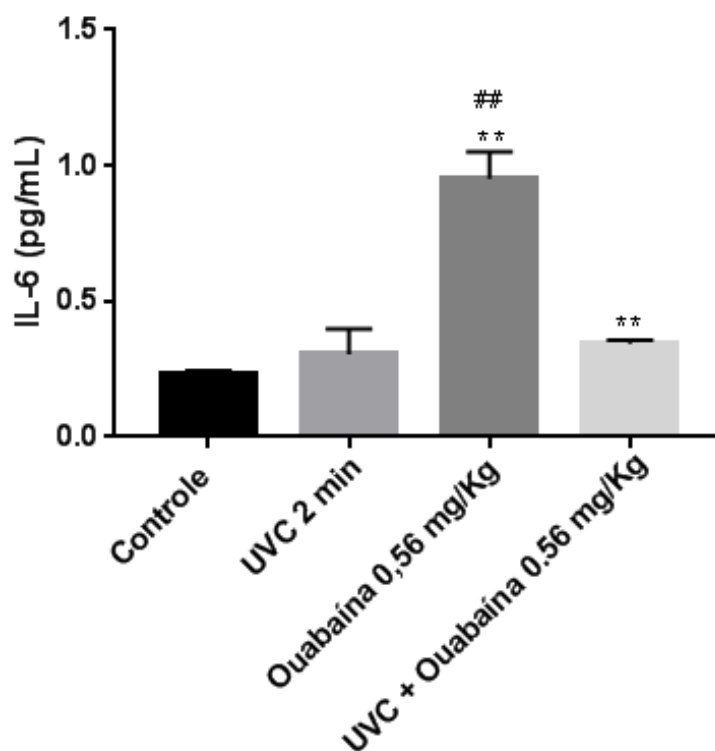
B)



C)



D)



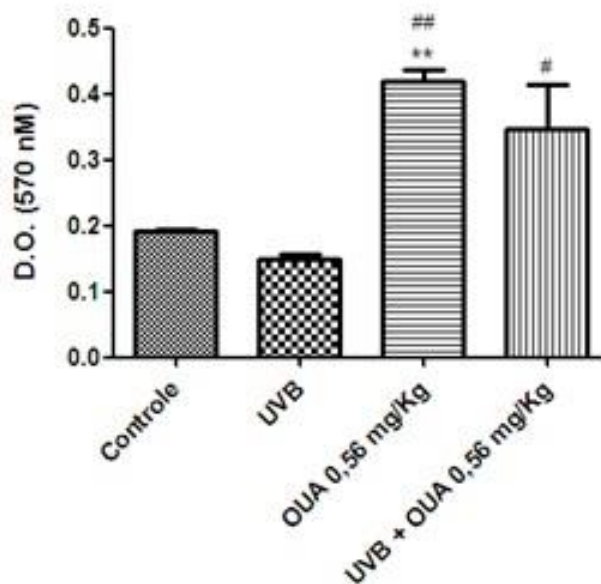
Os níveis de TNF-  $\alpha$  e IL-6 foram quantificados a partir do sobrenadante da cultura de células obtidas do timo e linfonodo mesentérico de camundongos swiss pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/kg estimulados com UVC. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. em um experimento com  $n=3$ . Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); ##  $p < 0,01$  (grupos comparados com o UVC).

#### 7.4.3 Viabilidade celular dos linfócitos do timo e linfonodo mesentérico pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/kg e expostos a radiação UVB

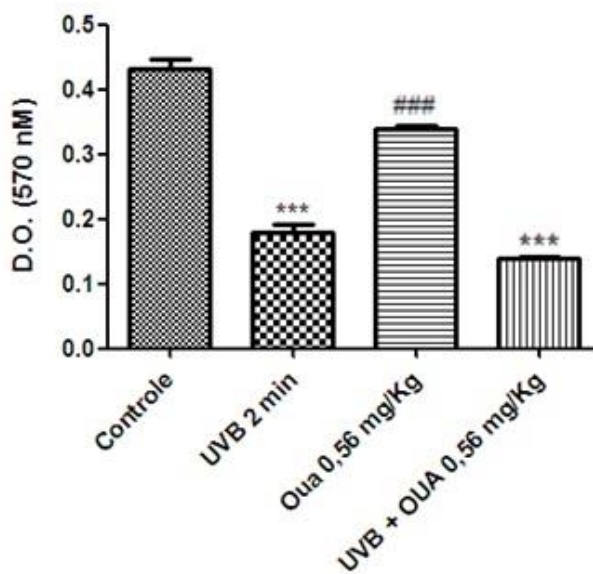
Os timócitos obtidos do timo de animais pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/kg e expostos a UVB permaneceram viáveis, semelhante ao resultado de UVC, nas 6 horas de cultura (gráfico 10 (A e B)). Em 24 horas cultura a ouabaína não protegeu essas células da morte celular. Esses resultados se repetem para o mesmo período de cultura com linfócitos do linfonodo mesentérico (Gráfico 11 (A e B)).

**Gráfico 10 A e B:** Viabilidade celular em cultura de timócitos em 6 e 24 horas, que foram expostos a radiação UVB.

**A)**



**B)**

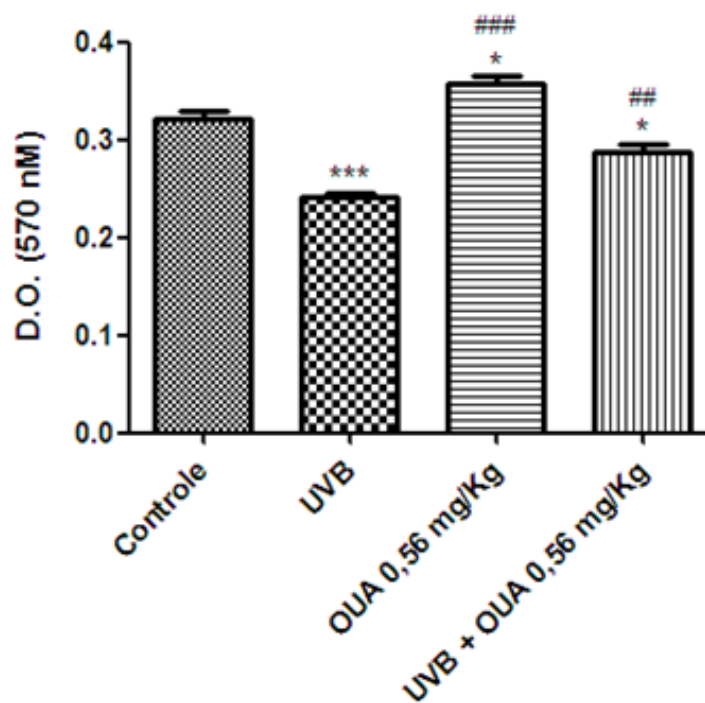


Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de ouabaína (0,56 mg/kg) e PBS estéril. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos em duplicata com  $n=3$ , e analisados pelo teste de análise de

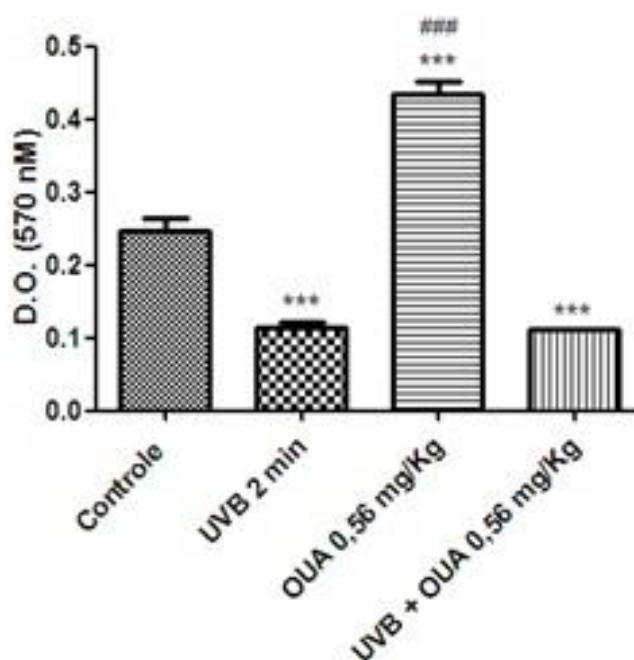
variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVB).

**Gráfico 11 A e B:** Viabilidade celular em cultura de linfócitos do linfonodo mesentérico em 6 e 24 horas, que foram expostos a radiação UVB.

A)



B)



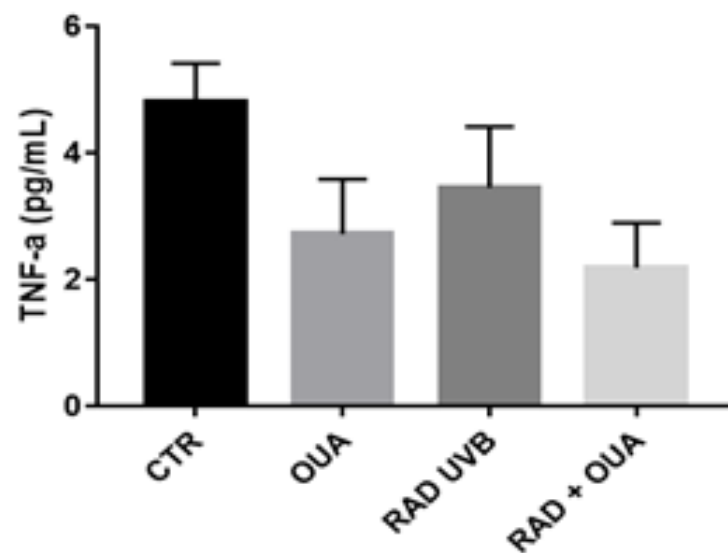
Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de ouabaína (0,56 mg/kg) e PBS estéril. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos em duplicata com  $n=3$ , e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  \* $p < 0,05$  (grupos comparados com o controle); ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  (grupos comparados com o UVB)

#### 7.4.4 Avaliação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 da cultura de linfócitos irradiados com UVB

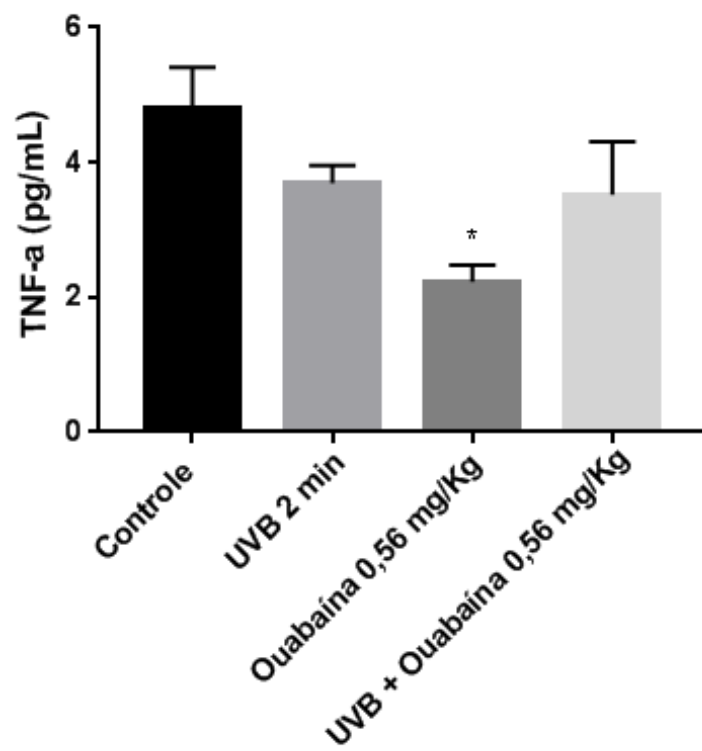
Os resultados obtidos demonstraram que a radiação UVB não estimulou de forma significativa a produção do TNF- $\alpha$  em cultura de timócitos (gráfico 12A) e de linfócitos do linfonodo mesentérico (gráfico 12B) e o pré-tratamento com ouabaína 0,56 mg/kg não interfere de forma significativa nos níveis dessa citocina.

Gráfico 12 A e B: Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de linfócitos do timo (A) e do linfonodo mesentérico (B) que foram pré- tratados com ouabaína e estimulados por UVB.

A)



B)



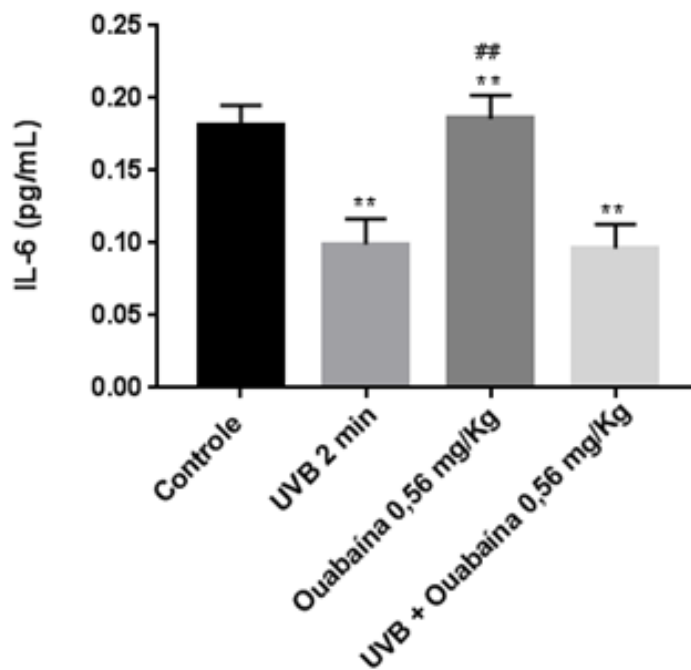
Os níveis de TNF- $\alpha$  foram quantificados a partir do sobrenadante da cultura de células obtidas do timo e linfonodo mesentérico de camundongos swiss pré-tratados com ouabaína 0,56 mg/kg estimulados

com UVB. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos com  $n=3$ . Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  (grupos comparados com o controle).

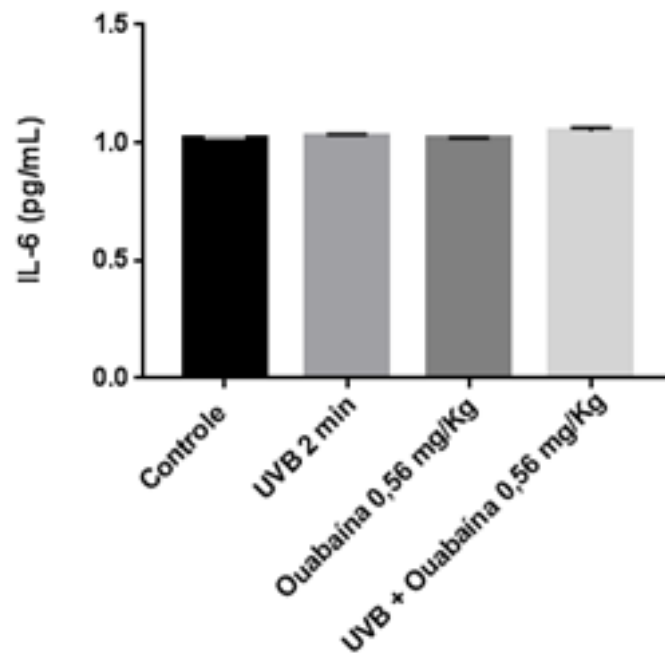
Por fim avaliamos também os níveis de IL-6, e observamos que a radiação UVB desencadeou a morte celular nos timócitos (gráfico 13A), mas esse efeito não aconteceu nos linfócitos do linfonodo mesentérico. O pré-tratamento com ouabaína 0,56 mg/Kg aumentou a produção de IL-6 quando comparada ao grupo basal e ao grupo que recebeu a radiação, mas associação com a ouabaína não interferiu nesse aspecto. Esse efeito não foi visto nos linfócitos do linfonodo mesentérico mantidos em 6 horas de cultura.

Gráfico 13: (A e B): Determinação dos níveis de IL-6 no sobrenadante da cultura de linfócitos do timo (A) e do linfonodo mesentérico (B) que foram pré-tratados com ouabaína e estimulados por UVB.

A)



B)



Os níveis de IL-6 foram quantificados a partir do sobrenadante da cultura de células obtidas do timo e linfonodo mesentérico de camundongos swiss pré-tratados com ouabaina 0,56 mg/kg estimulados com UVB. Os dados numéricos foram apresentados em média  $\pm$  e.p.m. de dois experimentos com  $n=3$ . Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$  (grupos comparados com o controle); ##  $p < 0,01$  (grupos comparados com o UVB).

---

# Discussão

## 8. DISCUSSÃO

Devido a ligação da ouabaína na bomba Na,K-ATPase acontecer com alta afinidade, justificaria que na presença de baixas doses de ouabaína ocorre a ativação de diferentes vias de sinalização, inclusive dentro de um processo inflamatório. A ouabaína vem sendo estudada em vários modelos experimentais desde a sua descoberta como substância endógena, na tentativa de elucidar seu papel fisiológico. A sua função hormonal vem caracterizando-a como uma substância capaz de interferir, sozinha ou em associação com outras substâncias, em vários aspectos fisiológicos e patológicos (HAMLYN et al., 1991; BAGROV; SHAPIRO, 2008).

O modelo clássico de interação dos esteroides cardiotônicos, como a ouabaína, é a sua atuação na bomba de sódio e potássio, que se baseia na propriedade dessa substância em inibir a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase da membrana celular. Como a bomba de sódio é responsável pelo efluxo de 3 íons sódio e influxo de 2 íons potássio, quando a ouabaína se liga e inibe parcialmente essa enzima, ocorre um aumento de sódio intracelular, e com isso, despolarização da membrana. Consequentemente ocorre abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem e aumento de cálcio intracelular (VASSALLE, 1987; MARIN et al., 1988).

O nosso grupo vem demonstrando a capacidade da ouabaína em atuar como uma substância anti-inflamatória em vários modelos experimentais, por reduzir migração de células para o sítio inflamado sob vários estímulos (DE VASCONCELOS et al., 2011,) como zimosan (LEITE et al., 2015) e *Leishmania amazonenses* (JACOB et al., 2013), inibidor de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ; reduzindo a atividade da MAPK p38 e os níveis do fator de transcrição NF-kB (LEITE et al., 2015; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008, 2009, 2014; CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). A ouabaína também é capaz de modular negativamente o processo inflamatório pulmonar, pela redução na migração eosinofílica, citocinas do perfil Th2 e atenuação da produção de muco nos bronquíolos (GALVÃO et al., 2017). No entanto não há relatos da ação da ouabaína sobre linfócitos dos órgãos linfoides timo e linfonodo mesentérico, na inflamação desencadeada mediante a exposição à radiação ultravioleta C e B.

Os linfócitos expressam uma alta diversidade de receptores antigênicos capazes de reconhecer uma ampla variedade de substâncias estranhas. Essa diversidade é gerada durante o desenvolvimento dos linfócitos T e B a partir de células precursoras,

originalmente incapazes de reconhecer ou responder a esses antígenos, uma vez que não expressam os receptores necessários, como os timócitos. Esse processo é reconhecido como maturação de linfócitos e é formado um diversificado repertório de receptores (KUMAR, 2010). O fenômeno de apoptose em linfócitos quiescentes ocorre devido ao dano inicial induzido pela radiação no DNA e o seu desenvolvimento depende do modo pelo qual a resposta fisiológica a estes danos é mobilizada (SMELENOV et al, 2001). Os linfócitos em cultura, quando expostos a radiação ultravioleta tendem a sofrer morte celular por apoptose ou necrose, devido ao acúmulo de danos na célula, já que os mecanismos de reparo de DNA ocorrem de maneira mais lenta (CARLONI et al, 2001). Na literatura há relatos de que a ouabaína também pode estimular ou inibir a apoptose de células do sistema nervoso central dependente de concentração. Esse fenômeno foi visto em estudos sobre regeneração de retina, em que a ouabaína usada em concentrações micromolares induzia a apoptose dessas células ganglionares, enquanto que concentrações nanomolares conferiam proteção a essas células (DE REZENDE CORREA et al., 2005; FIMBEL et al., 2007).

Dentro desse contexto, avaliamos nesse trabalho a morte celular induzida por radiação UVC e UVB durante um fluxo de exposição de 2 minutos, através da investigação da viabilidade dos linfócitos maduros e imaturos pelo método de MTT. Os resultados obtidos, *in vitro*, mostraram que os linfócitos do timo e linfonodo mesentérico tratados com ouabaína 100 nM e mantidos em cultura de 24h permaneceram viáveis mesmo expostas ao estímulo da radiação UVC, esses dados não se repetiram em nenhuma das concentrações vistas na presença da radiação UVB para as células estudadas.

Estudos vêm demonstrando a ação da ouabaína em vários modelos. Um efeito importante observado foi o sinergismo com glicocorticóides na indução de apoptose espontânea em timócitos, levando a uma redução dramática na subpopulação de timócitos CD4+CD8+, embora isoladamente a ouabaína não promova alteração na viabilidade desse tipo celular, também foi visto *in vitro* na concentração de 100 nM que a ouabaína causa aumento do marcador de ativação CD69 em timócitos (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2003). O efeito citoprotetor observado em nossos experimentos corroboram com elucidações que vem sendo estudadas para entender o efeito da Ouabaína, em que é relatado na literatura que baixas concentrações de ouabaína, as quais induzem baixos níveis de Ca<sup>2+</sup>, são capazes de ativar o fator nuclear-κB (NF-κB) e proteger células contra apoptose e também são

capazes de ativar a biossíntese de proteínas através da ativação da proteína cinase C (PKC) e do próprio NF- $\kappa$ B e, finalmente, a ativação de PKC e formação do complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina ativando a transcrição de genes de resposta rápida, como c-jun e c-fos, via AP-1 (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2006; SCHONER e SCHEINER-BOBIS, 2007a).

Estímulos inflamatórios, dentre eles, as radiações ultravioletas são capazes de ativar vias de sinalização intracelulares, como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), envolvida na síntese de citocinas pró-inflamatórias. Essas MAPKs podem ser divididas em quatro grupos, a ERK1/2 e ERK5, JNK e p38. Adicionalmente, a p38 fosforilada contribui para a ativação do NF- $\kappa$ B, que regula a expressão de vários genes inflamatórios. Nosso grupo, demonstrou a capacidade da ouabaína em reduzir a atividade dessa quinase (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008, 2009, 2014). Estudos prévios já mostraram que o efeito tóxico induzido pela ouabaína reside na ativação de vias celulares, especialmente a via das MAPKs, através do aumento dos níveis de resíduos de tirosina fosforilada (PTyr). Embora a via das MAPKs esteja relacionada com indução de crescimento, proliferação e diferenciação celular (KOLCH, 2000), a ativação sustentada dessa via culmina com a indução de morte celular (CONTRERAS et al., 1999; VALENTE et al., 2003).

As citocinas inflamatórias, a exemplo de TNF- $\alpha$  usam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, induzindo a expressão de vários genes inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (TAKADA et al., 2009). Estudos recentes têm evidenciado que alguns glicosídeos cardiotônicos, incluindo digoxina, ouabaína e odorosideo A, são capazes de inibir a via de sinalização do TNF/NF- $\kappa$ B, responsável pela produção de fatores pró-inflamatórios (YANG et al., 2005). Dentro desse contexto, foi verificado em nosso laboratório que ouabaína é capaz de modular etapas moleculares dos eventos que levam a inflamação aguda, ao reduzir IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e o número de células peritoneais que migram para o sítio inflamado. Esses eventos estão relacionados com a capacidade da substância tem de inibir ativação do NF- $\kappa$ B (LEITE et al., 2015).

Mediantes o exposto, em que os nossos experimentos *in vitro* mostraram que os linfócitos do timo e linfonodo mesentérico foram protegidos da morte celular desencadeada por UVC, quando tratados com 100 nM de ouabaína, avaliamos se a ouabaína nessa concentração poderia interferir em citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 nesse modelo. Os resultados desse trabalho sugerem que os linfócitos do timo e linfonodo mesentérico nessas condições de estímulo com radiação UVC e tratados

com ouabaína 100 nM aumentaram a produção do TNF- $\alpha$ , tal fato pode ser explicado pela formação de um inflamossoma, resultando na ativação de citocinas pró-inflamatórias. Dados de literatura reportam que respostas imunes inatas à exposição aos raios UV têm sido estudadas principalmente *in vitro* em culturas de queratinócitos (NASTI; TIMARES, 2012). A resposta inicial de queratinócitos incluem formação de inflamassomas, resultando em ativação de citocinas pró-inflamatórias (FELDMEYER et al., 2007). Citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 são os principais intervenientes na manutenção da homeostase e alteração nos níveis transcricionais destas moléculas é uma característica da resposta imune a queimaduras solares (BRINK et al., 2000; KUPPER et al., 1987). Devido a essa diversidade de classes funcionais, as citocinas atuam em um vasto repertório de processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, respostas específica e não-específica contra infecções, alterações em funções cognitivas e progressão dos processos degenerativos relacionados com o envelhecimento (DINARELLO, 2007).

Com a finalidade de melhor compreender a atividade anti-inflamatória da ouabaína nesse trabalho, avaliamos o perfil da citocina pró-inflamatória IL-6 no sobrenadante da cultura de 24 h de linfócitos tratados *in vitro* com ouabaína 100 nM e que foram expostos a radiação UVC. Nesse aspecto os nossos resultados demonstraram que houve uma redução dos níveis dessa citocina nos timócitos e nos linfócitos do linfonodo mesentérico quando comparamos com o grupo não tratado e exposto a radiação UVC. Na literatura, há estudos envolvendo radiação UV e envelhecimento, em que foi comprovado que a radiação UVB induz a expressão de IL1 e IL6, que associados a outros mediadores inflamatórios gerados pelas espécies reativas de oxigênio, contribuem para o surgimento dos danos cutâneos agudos e crônicos, comuns no envelhecimento (BAI et al., 2015). O modelo de foto envelhecimento com radiação UVB é também utilizado como um modelo para avaliação de câncer na pele (BASTIEN; THERRIEN; DROUIN, 2013). A presença da IL-6 combinada com a exposição à radiação ionizante UVC e UVB é associada com diferentes perfis de sobrevivência celular seja de forma aumentada ou diminuída dependendo da linhagem celular. Em fibroblastos expostos a radiação UVB foi evidenciado um aumento de IL-6, sugerindo o seu papel como um sinalizador molecular em células irradiadas (WIDEL et al., 2014)

A radiação ionizante é um agente potente que danifica o DNA, age interagindo com o DNA celular e induz lesões nas células irradiadas, atua também prevenindo a

proliferação celular e induz a morte celular apoptose ou necrose dependendo da dose de radiação (BANERJEE; LEPTIN, 2014). No entanto, há também efeitos benéficos da radiação (UVA e UVB), como por exemplo a síntese de vitamina D e produção de peptídeos antimicrobianos (HALLIDAY et al., 2008; KRIPKE; FISHER, 2008; GLASER et al., 2009). A radiação ultravioleta também tem sido usada como terapia em várias doenças, como psoríase (SINGH et al., 2010), dermatite atópica e radioterapia do câncer (KOULU, 2014; CADET et al., 2015). Ela oferece também proteção contra esclerose múltipla e seu efeito imunossupressor aumenta tolerância aos aloenxertos (MCMICHAEL; HALL, 1997; ULLRICH, 1986).

No intuito de continuarmos investigando os efeitos fisiológicos da ouabaína na inflamação desencadeada pela radiação UVC e UVB, realizamos o pré-tratamento *in vivo* com ouabaína na concentração de 0,56 mg/Kg. Essa concentração foi utilizada em vários modelos já citados nesse trabalho, em que a ouabaína tem ação antiinflamatória. Sendo assim, prosseguimos os estudos analisando a viabilidade celular dos linfócitos do timo e linfonodo mesentérico obtidos de animais previamente tratados com essa dose de ouabaína por três dias consecutivos.

Os resultados obtidos para a viabilidade dos linfócitos demonstraram que em 6 horas de cultura a ouabaína na dose de 0,56 mg/Kg conseguiu proteger essas células da morte celular desencadeada por UVC e UVB, esses dados não se repetiram na cultura de 24 horas. Tais resultados sugerem que o pré-tratamento com ouabaína garantiu um estado favorável de viabilidade a essas células nas primeiras horas de cultura através de mecanismos que precisam ser elucidados com outros experimentos. Fundamentados nesses achados fomos investigar se nessas condições experimentais houve alteração nos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6. Os resultados obtidos mostram que em 6 horas de cultura não houve modulação significativa no perfil dessas citocinas quando comparadas com o grupo que recebeu o estímulo de radiação UVC e UVB.

Um efeito ocasionado pela radiação UV é a liberação de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  (WOLF et al., 2000; PETIT –FRERE et al., 1998). Relatos da literatura mostram que timócitos expostos a ouabaína estimulados por concanavalina A apresentam uma diminuição nos níveis do fator nuclear de células T ativadas (NFATc), que é um importante fator de transcrição para respostas imunológicas (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008). Visto que a ouabaína é um hormônio esteróide, assim como os glicocorticóides, foi demonstrado que a administração *in*

*vivo* de ouabaína não induz sozinha a morte celular de timócitos duplo-positivos em camundongos, mas sinergiza com os glicocorticoides induzindo a apoptose dessas células (RODRIGUES-MASCARENHAS et al, 2006).

As classes de esteroides cardiotônicos são capazes de ativar várias cascatas de sinalização que desencadeiam oscilações de cálcio, modificam a adesão celular, regulam a expressão de genes, proliferação celular, modulam mediadores inflamatórios e processos apoptóticos. Dentro dessa classe encontra-se a via de sinalização celular da p38 que promove a regulação de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , bem como a expressão de enzimas importantes para o desenvolvimento da inflamação, incluindo COX-2 e iNOS (JINLIAN et al., 2007; TURPEINEN et al., 2010). No modelo experimental de radiação desenvolvido nesse trabalho o pré-tratamento com ouabaína 0,56 mg/Kg associado à radiação UVC e UVB, os níveis de TNF- $\alpha$  não foram modulados no timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico, esses resultados sugerem que a ouabaína não interfere minimizando os efeitos da inflamação causada nessas células irradiadas para esse modelo experimental.

Mediante o exposto, os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para os estudos sobre a ouabaína e demonstraram pela primeira vez a sua ação frente a estímulos de radiação UVC e UVB em timócitos e linfócitos do linfonodo mesentérico. Dessa forma, contribuindo para o melhor entendimento desse esteroide cardiotônico dentro de um processo inflamatório desencadeado por um agente físico, a radiação ultravioleta.

---

# Conclusão

## 9. CONCLUSÃO

*In vitro* – (Tratamento com ouabaína 100 nM)

- Protegeu da morte celular os timócitos e os linfócitos do linfonodo mesentérico mantidos em cultura de 24h que receberam estímulo com radiação UVC. Para o estímulo com radiação UVB esse efeito não foi observado.
- A associação da ouabaína 100 nM com a radiação UVC modulou as citocinas pró-inflamatórias, aumentando os níveis de TNF- $\alpha$  e reduzindo os níveis de IL-6.

*In vivo* – (Pré- tratamento com ouabaína 0,56 mg/Kg)

- Protegeu da morte celular os timócitos e os linfócitos do linfonodo mesentérico mantidos em cultura de 6h que receberam estímulo com radiação UVC e UVB.
- A associação da ouabaína 0,56 mg/Kg com a radiação UVC e UVB não interferiu nas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 em relação ao grupo que recebeu apenas o estímulo da radiação. De forma isolada e significativa a ouabaína 0,56 mg/Kg, no experimento com UVC, reduziu TNF- $\alpha$  quando comparado ao nível basal dessa citocina nos linfócitos do linfonodo mesentérico. No experimento com UVB, a ouabaína estimulou a produção de IL-6 nos timócitos de forma significativa quando compramos com o estímulo UVB e o basal.

---

## **Referências bibliográficas**

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, H. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª edição. Editora Elsevier, 2012.

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv - **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015. 853528320X

ADEFUYE, A.; SALES, K. Regulation of Inflammatory Pathways in Cancer and infectious Disease of the Cervix. *Scientifica*, 2012.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J.I.; SANCHEZ- PATAN, F.; The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v.68,n.1,p.202-209, 2007.

AUBIN, F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *European Journal Dermatology*; 13:515-523, 2003.

BAGROV, A.Y.; SHAPIRO, J. I..Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. **Nat Clin Pract Nephrol.**, 2008; 4(7): 378–392.

Bai B, Liu Y, You Y, Li Y, Ma L. Intraperitoneally administered biliverdin protects against UVB-induced skin photo-damage in hairless mice. **J Photochem Photobiol B.**, pp. 144:35-41, 2015.

BANERJEE, S.; LEPTIN, M.; Systemic response of ultraviolet radiation induces induction of leukocytic IL-1 $\beta$  and inflammation in Zebrafish. **Journal Immunology**, 2014.

BUCKLEY, C. D. et al. Stromal Cells in Chronic Inflammation and Tertiary Lymphoid Organ Formation. **Annu. Rev. Immunol**, v. 33, p. 715–45, 2015.

BLAUSTEIN, M. P..Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**; 264: C1367-C1387,1993.

BLASTIEN, N; THERRIEN J.P.; DROURIN, R.;Cytosine containing dihydropyrimidine sites can be hotspots of cyclobutane pyrimidine dimer formation after UVB exposure. **Photochemistry. Photobiology**,12; 1544- 1554, 2013.

BRINK, N., M. SZAMEL, A. R.; YOUNG, K. P. WITTERN, and J. BERGEMANN. Comparative quantification of IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-10r, TNF $\alpha$  and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. **Inflammation Research**. 49: 290–296,2000

CADET, J. et al. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 5, p. 1048–65, 2012.

CHEN, W.; et al. Depletion of securin induces senescence after irradiation and enhances radiosensitivity in human cancer cells regardless of functional p53 expression. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. v. 77, n. 2, p. 566-574, 2010.

CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V.; Interleukin (IL-6) gene expression in the central nervous system is necessary for response to lipopolysaccharide on IL-1 $\beta$ : a study on IL-6 deficient mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, p. 311-316, 1996.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 10, p. 1–8, 2017

CONTRERAS RG, SHOSHANI L, FLORES-MALDONADO C, LAZARO A, CERREJIDO M. Relationship between Na,K-ATPase and cell attachment. *J. Cell Sci.* 1999;112:4223-4232.

DE ANGELIS, C.; HAUPERT, G. T. JR. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase from midbrain and adrenal. *Am J Physiol.*, 274:182-8, 1998.

DE REZENDE CORREA, G.; ARAUJO DOS SANTOS, A., FREDERICO LEITE FONTES, C.; GIESTAL DE ARAUJO, E.; Ouabain induces an increase of retinal ganglion cell survival in vitro: the involvement of protein kinase C. **Brain Research**.1049(1):89–94, 2005.

DE VASCONCELOS, D.L.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L. T.; PIUVEZAM, M. R.; DE LIMA, M. R. DE MORAIS, L. C.; RUMJANEK, V. M. and RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators Inflammation**: 912925, 2011.

DORMAND, J.; FAVERRO, J.; BONNAFOUS, J. C.; MANI, J. C.; Mechanism whereby ouabain inhibits human T lymphocyte activation: effect on the interleukin 2 pathway. **Immunobiology**. 171(4-5):436-50, 1986.

DUTHIE, M. S.; LIMBER, I.; NORVA, M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Brazilian Journal Dermatology*. 140 (6): 995- 1009, 1999.

EPSTEIN, F. H.; WEISS, S. J. Tissue Destruction by Neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 6, p. 365–376, 1989

ECHEVARRIA-LIMA, J., DE ARAUJO, E. G., DE MEIS, L.; RUMJANEK, V. M. Ca<sup>2+</sup> mobilization induced by ouabain in thymocytes involves intracellular and extracellular Ca<sup>2+</sup> pools. **Hypertension**.41(6): 1386–1392, 2003.

ESTEVES, E. et al., Ouabain exacerbates activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 77, p. 281-292, 2005.

FIMBEL, S. M.; MONTGOMERY, J. E.; BURKEY, C.J.;HYDE, D. R.;Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal infection of ouabain in zebrafish. **The journal of neuroscience**, v. 27; n 7, p 1712-24, 2007.

FELDMEYER, L., M.; KELLER, G. NIKLAUS, D. ;HOHL, S.;.The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. **Current Biology**. 17: 1140–1145, 2007.

FERRANDI, M., MANUNTA, P., BALZAN, S., HAMLIN, J.M., BIANCHI, G. e FERRARI, P. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. **Hypertension** 30, 886-896, 1997.

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100–108, 2016.

FOEY, A. D.; CRAWFORD, A.; HALL, N. D. Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na, K-ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; v.1355, p.43–49.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell and Differentiation**. v.10. p.107-120, 2012.

GLASER, R., F.; NAVID, W.; SCHULLER, C.; JANTSCHITSCH, J.; HARDER, J. M.; SCHRODER, A. SCHAWARZ, and T. SCHWARZ. UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratocytes, 2009.

GRIFFITHS, H. R. et al. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 35, n. 3, p. 189-237, 1998.

GALVÃO, J. G. F. M. et al. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1117–1130, 2017

GOTO, A.; YAMADA, K.; YAGI, N.; HIU, C.; TERANO, V. and SUGIMOTO, T. Ouabain as endogenous digitalis-like factor in animal? **Clinical Chemistry**., 38:161-162, 1992.

GOTO, A., YAMADA, K., NAGOSHI, H., TERANO, Y., Omata M. Stress-induced elevation of ouabainlike compound in rat plasma and adrenal. **Hypertension**.; 26(6 Pt 2):1173–1176, 1995.

GILAD, S., KHOSRAVI, R, SHEHKEDY, D, UZIEL, T, ZIV, Y., SAVITSKY, K., ROTMAN, G., SMITH, S., CHESSA, L., JORGENSON, T. J., HARNIK, R., FRYDMAN, M., SANAL, O., PORTNOI, S., GOLDWICZ, Z., JASPERS, N. G. J., GATTI, R. A., LENOIR, G., LAVIN, M. F; TATSUMI, K., WEGNER, R. D.. Predominance of null mutations in ataxia telangiectasia. **Human Molecular Genetics**, v. 5: 433–439, 1996.

HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings National Academy of Sciences U S A.**; 88(14):6259–6263, 1991.

HALLIDAY, G. M.; NORVAL, S. N.; BYRNE, X.; The effects of sunlight on the skin. **Drug Discovery. Today Dis. Mech.** 5: e201–e209, 2008.

HUANG, B.S., YUAN, B., LEENEN, F. H. Blockade of brain 'ouabain' prevents the impairment of baroreflexes in rats after myocardial infarction. **Circulation Journal.**; 96(5):1654-9, 1997

HUANG, B.S., YUAN, B., LEENEN, F.H. Chronic blockade of brain "ouabain" prevents sympathetic hyper-reactivity and impairment of acute baroreflex resetting in rats with congestive heart failure. **Journal Physiology Pharmacology**, 78(1):45-53, 2000.

ILYENKO, I.; LYASKIVSKA, O.; BAKYCA, D. Analysis of relative telomere length and apoptosis in humans exposed to ionising radiation. **Experimental Oncology.** v. 4, n. 33, p. 235-238, 2011.

ICHIHASHI, M. et al. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 21-39, 2003.

JACOB, P. L. et al. Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania amazonensis* infected Swiss mice. **Parasitology Research**, 2013; v.112, p.1313–132.

KAMINSKA, B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 253-262, 2005.

KRIPKE, M. L., and M. S. FISHER. Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. **Journal National Cancer Institute.** 57: 211–215, 1976.

KOULU, L. UV radiation, tanning and DNA damage. **Duodecim Medical Publications**, 130, 637–641, 2014.

KOLCH W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem. J.** 2000;351:289-305.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO N.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran Patologia: **Bases Patológicas das Doenças.** 8 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUPPER, T. S.; CHUA P.; FLOOD, J.; McGUIRE G.. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. **Journal Clinical. Invest.** 80: 430–436, 1987.

LACY, P.; STOW, J. L.; Cytokine production from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood.** Jan 2011.

LAREDO, J; SHAH, J. R; LU, Z. R; HAMILTON, B.P; HAMLIN, J.M. Angiotensin II stimulates secretions of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension**, 29 (1 pt 2): 401-407,1997.

LAREDO, J.; SHAH, J. R; LU, Z. R; HAMILTON, B.P; HAMLIN, J.M. Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. In Na/K-ATPase and Related ATPases (Taniguchi, K. & Kayas, S., eds), **Elsevier Science**, Amsterdam; pp.6 71–679, 2000.

LATONEM, L. and LAIHO, M. Cellular UV damage responses-Functions of tumor suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta** 1755, 71-89, 2005.

LEE. C.O;. 200 Years of digitalis: the emerging central role of the sodium ion in the control of cardiac force. *Am. Journal Physiology*; 249 (5Pt 1), C367-C378,1985.

LEACH, J. K., VAN T. G., LIN, P. S., Schmidt-Ullrich, R. & Mikkelsen, R. B. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. **Cancer Research**. 61, 3894–901, 2001.

MANN, C.L.; BORTNER, C. D.; JEWELL, C. M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na(+)/K(+)-adenosine triphosphatase. **Endocrinology**. 142(12):5059-68, 2001.

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

MAVERAKIS, E., Y. MIYAMURA, M. P., BOWEN, G., CORREA, Y., ONO and H. Goodarzi. Light, including ultraviolet. **Journal Autoimmunity**. 34: J247–J257,2010.

MATSUMORI, A. et al. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. **Cytokine**; v.12, p.294–297, 2000.

MATSUMORI, A. et al. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. **Circulation**; v.96, p.1501–1506, 1997.

MCMICHAEL, A. J., and HALL, A. J.; Does immunosuppressive ultraviolet radiation explain the latitude gradient for multiple sclerosis? **Epidemiology** 8:642–645,1997.

MESQUITA, J. R.D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATECAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C., Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse da Reumatologia**. São Paulo. p. 66-81, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v.65, n 1-2 ,p. 55-63, 1983.

- NAVARRO-XAVIER, R. A.; NEWSON, J.; SILVEIRA, V. L.; FARROW, S. N.; GILROY, D. W.; BYSTRON, J. A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. **The Journal of immunology**, v.184, n.3, p, 1516-25, 2010.
- NASTI, T. H., and L. TIMARES. Inflammasome activation of IL-1 family mediators in response to cutaneous photodamage. **Photochemistry Photobiology**. 88:1111–1125, 2012.
- NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained immunity: A memory for innate host defense. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 5, p. 355–361, 2011.
- NESHER, M. et al. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**; v.297, p.2026-2034, 2009.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014
- NICHOLS, J. A; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v. 302, n. 2, p. 71–83, mar. 2010.
- NORVAL, M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 108-118, 2006.
- OLEJ, B., DOS SANTOS, N. F., LEAL, L.; RUMJANEK, V. M. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. **Bioscience Reports**.;18 (1):1–7, 1998.
- PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clinical Liver Disease**; 4:295-317, 2000.
- PERKINS JA. Acute and chronic inflammation. In: Perkins JA, Ed. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: **Elsevier Saunders**. p 43–77, 2010.
- PFEIFER, G. P.; YOU, Y. H.; BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light. **Mutation Research**. v. 571, n. 1-2, p. 19-31, 2005.
- QUASTEL, M. R., KAPLAN, J. G.; Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin in vitro. **Nature**.;219(5150):198–200, 1968.
- RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERNANDES DOS SANTOS, N.; RUMJANEK, V. M.; CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca<sup>2+</sup> entry. **Life Sciences**.;73 (8):1037–1051, 2003.
- RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DA SILVA DE OLIVEIRA, A.; AMOEDO, N. D.; AFFONSO-MITIDIERI, O. R.; RUMJANEK, F. D.; RUMJANEK, V. M.;

Modulation of the immune system by ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1153: 153–163, 2009;

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; BLOISE, F. F.; MOSCAT, J.; RUMJANEK, V. M. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biology International**. v-32, n-10, p. 1323-8, 2008.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E. A.; **Fotodermatose e dermatologia**. 1th ed. São Paulo, 629-644, 1998.

SCOTT, A. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 3, p. 248–249, 2004.

SCHORDER, J.M.; REICH, K.; KABASHIMA, K.; LIN, F.T.; ROMANI, N.; MERIZ, M. Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances- lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes? **Dermatology**; 15: 913-920, 2006.

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

SCHRAUFSTATTER I.U., HYSLOP P.A., HINSHAW D.B., SPRAGG R.G., SKLAR L.A., COCHRANE C.G. Hydrogen peroxide induced injury and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A.;83:4908–4912, 1986.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J.; Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v.6, n.12, p.1191-7, 2005.

SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, v. 7, n. 4, p. 291–307, 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, v.18, p. 385-405, 2004.

SINGH, T. P.; M. P. SCHON, K.; WALLBRECHT, K.; MICHAELIS, B.; RINNER, G.; MAYER, U.; SCHMIDBAUER, H.; STROHMAIER, X. J.; WANG, and P. Wolf.. 8-Methoxypsoralen plus ultraviolet A therapy acts via inhibition of the IL-23/Th17 axis and induction of Foxp3+ regulatory T cells involving CTLA4 signaling in a psoriasis-like skin disorder. **Journal Immunology**. 184: 7257–7267, 2010.

SKOU, J.C., ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **The Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 24:249-61, 1992.

SZAMEL, M.; SCHNEIDER, S.; RESCH, K. Functional interrelationship between Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen – stimulated rabbit thymocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.17, p. 9198-204, 1981.

SOWA, G.; PRZEWŁOCKI, R. Ouabain enhances the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by rat peritoneal macrophages. **Immunopharmacology**; v. 36, p. 95–100, 1997.

SZLOSAREK, P.; CHARLES, K. A; BALKWILL, F. R. Tumour necrosis factor $\alpha$  as a tumour promoter. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 745–50, 2006.

TAUB, Rebecca.; **Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway**. *Journal Clinical Investigation*; 112(7):978-980, 2003.

TRAYHUN, P. and WOOD, I.S. (2004) Adipokines: Inflammation and the Pleiotropic Role of White Adipose Tissue. **British Journal of Nutrition**, 92, 347-355.

TOUZA, N.A.; PÔÇAS, E.S.C.; QUINTAS, L.E.M.; CUNHA-FILHO, G.; SANTOS, M.L.; NOEL, F. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotoxic steroids on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activity in human kidney membrane preparation. **Life Sciences**, v.68, p.39-42, 2011.

TURPEINEN, T. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 333, n. 1, p. 310-8, 2010.

ULLEICH, S. E.; Suppression of the immune response to allogeneic histocompatibility antigens by a single exposure to ultraviolet radiation. **Transplantation** 42: 287–291, 1986.

VERMA, A. et al. Calcium ionophore A23187 reveals calcium related cellular stress as “I-Bodies”: An old actor in a new role. **Cell Calcium**. 50, 510–22, 2011.

VALENTE RC, CAPELLA LS, MONTEIRO RQ, RUMJANEK VM, LOPES AG, CAPELLA MAM. Mechanisms of ouabain toxicity. **FASEB Journal**, 17(12):1700-2, 2003.

WANG, G., COLERMAN, C. G., CHAN, J., FARACO, G., MARQUES-LOPES, J., MILNER, T. A., GURUJU, M. R., ANRATHER, J., DAVISSON, R. L., IADECOLA, C., PICKEL, V. M. Angiotensin-II slow-pressor hypertension enhances NMDA currents and Nox2-dependent superoxide production in hypothalamic paraventricular neurons. **American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology**, 2013.

WEBER, C.; FRAEMOHS, L.; DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 467-77, 2007

YAMANDA, K; GOTO, A.; NAGOSHI, H.; TERANO, Y.; OMATA, M.; Elevation of ouabain like compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. **Hypertension**, 30 (Pt 1): 94-98, 1997.

YOON, J. H. et al. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight, **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 4, p. 1019-1020, 2000.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3," **Nature Reviews Cancer**, vol. 9, no. 11, pp. 798–809, 2009.

---

**Anexos**

## 11. ANEXOS

### 11.1 Certidão do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
GABINETE DA VICE-REITORIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito imunomodulador da ouabaina na cultura de linfócitos expostos a radiação ultravioleta" protocolo nº 106/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 14/12/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2018
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss ( <i>Mus musculus</i> )
Número de animais	78 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas / 25 - 30 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB

## 11.2 Premiação CINASAMA



**CINASAMA 2017**  
CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE

SAÚDE E MEIO AMBIENTE: OS DESAFIOS DO MUNDO CONTEMPORÂNEO

## Certificado

Concedemos este certificado de Honra ao Mérito ao trabalho intitulado "EFEITO CITOPROTETOR DA OUABAÍNA EM CULTURA DE LINFÓCITOS IRRADIADOS COM UVC E UVB" dos autores ANNE KALIERY DE ABREU ALVES, ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA, DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO, LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE SILVA, SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS, apresentado de FORMA ORAL durante o CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE no período de 17 a 18 de Novembro de 2017 pelo melhor trabalho apresentado na área.

João Pessoa - PB, 18 de Novembro de 2017

*Helder Neves de Albuquerque*  
Diretor Presidente  
Instituto Bioeducação

*Giselle Medeiros da Costa One*  
Coordenadora do Evento

## 11.3 Participação em publicação de artigo



## Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain

Luiz H. A. Cavalcante-Silva<sup>1</sup>, Éssia de Almeida Lima<sup>2</sup>, Deyse C. M. Carvalho<sup>2</sup>, José M. de Sales-Neto<sup>1</sup>, Anne K. de Abreu Alves<sup>2</sup>, José G. F. M. Galvão<sup>1</sup>, Juliane S. de França da Silva<sup>1</sup> and Sandra Rodrigues-Mascarenhas<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>3</sup> Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Brazil

Since the discovery of ouabain as a cardiotonic steroid hormone present in higher mammals, research about it has progressed rapidly and several of its physiological and pharmacological effects have been described. Ouabain can behave as a stress hormone and adrenal cortex is its main source. Direct effects of ouabain are originated due to the binding to its receptor, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, on target cells. This interaction can promote Na<sup>+</sup> transport blockade or even activation of signaling transduction pathways (e.g., EGFR/Src-Ras-ERK pathway activation). Independent of ion transport. Besides the well-known effect of ouabain on the cardiovascular system and blood pressure control, compelling evidence indicates that ouabain regulates a number of immune functions. Inflammation is a tightly coordinated immunological function that is also affected by ouabain. Indeed, this hormone can modulate many inflammatory events such as cell migration, vascular permeability, and cytokine production. Moreover, ouabain also interferes on neuroinflammation. However, it is not clear how ouabain controls these events. In this brief review, we summarize the updates of ouabain effect on several aspects of peripheral and central inflammation, bringing new insights into ouabain functions on the immune system.

**Keywords:** ouabain, immune system, peripheral inflammation, cell migration, cytokines, neuroinflammation

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Cesar Rosales,  
Universidad Nacional Autónoma de  
México, Mexico

#### Reviewed by:

Bruno Vogt,  
University of Bern, Switzerland  
Timothy J. Moss,  
Fitchie Centre, Australia

#### \*Correspondence:

Sandra Rodrigues-Mascarenhas  
sandra@biotec.ufpb.br

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Integrative Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

Received: 08 September 2017

Accepted: 24 October 2017

Published: 10 November 2017

#### Citation:

Cavalcante-Silva LHA, Lima EA,  
Carvalho DCM, Sales-Neto JM,  
Alves AKA, Galvão JGFM, Silva JSF  
and Rodrigues-Mascarenhas S (2017)  
Much More than a Cardiotonic  
Steroid: Modulation of Inflammation  
by Ouabain. *Front. Physiol.* 8:886.  
doi: 10.3389/fphys.2017.00886

## INTRODUCTION

Although the cardiotonic steroid ouabain was originally identified as a plant secondary metabolite (e.g., from *Strophantus gratus* and *Acokanthera ouabaio*), it was later described as an endogenous mammalian substance (Hamlyn et al., 1991) such as other cardiotonic steroids (e.g., marinobufagenin and digoxin) (Bagrov et al., 2009). Ouabain was found in bovine adrenal gland (Laredo et al., 1994; Schneider et al., 1998), adrenal gland tumors (Blanco and Wallace, 2013), bovine hypothalamus (Tymiak et al., 1993), bovine hypophysis (Schoner, 2002), and human plasma (Hamlyn et al., 1991; Ferrandi et al., 1997). It is noteworthy that ouabain isolated from mammalian tissues and body fluids is structurally, biochemically, and immunologically indistinguishable to ouabain isolated from plants (Schoner, 2002).