



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA MARINOBUFAGINA EM
MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

JOÃO PESSOA – PB

2018

DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA MARINOBUFAGINA EM
MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues
Mascarenhas

Coorientador: Prof. Dr. Luis Eduardo
Menezes Quintas

JOÃO PESSOA – PB

2018

C331a Carvalho, Deyse Cristina Madruga.

Atividade anti-inflamatória da marinobufagina em modelos in vivo e in vitro / Deyse Cristina Madruga Carvalho. - João Pessoa, 2018.

95 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Luis Eduardo Menezes Quintas.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Marinobufagina. 3. Ouabaina. 4. Esteroides cardiotônicos. 5. Inflamação - processos inflamatórios. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Quintas, Luis Eduardo Menezes. III. Título.

UFPB/BC

DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA MARINOBUFAGINA EM MODELOS
IN VIVO E IN VITRO**

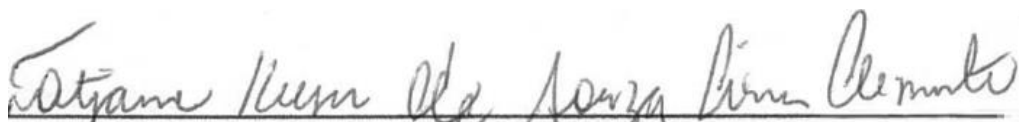
Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**.

Dissertação aprovada em 30/04/2018

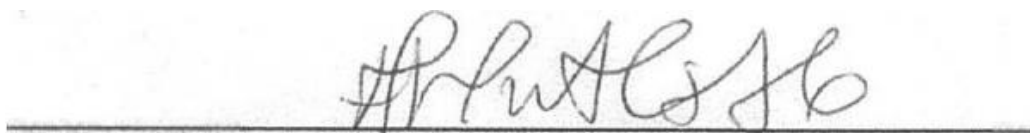
BANCA EXAMINADORA



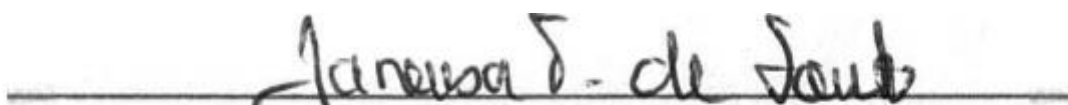
Prof^a. Dr^a. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Avaliadora interna)



Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo
(Departamento de Biologia – USP – Ribeirão Preto. Avaliador da nuceadora)



Prof^a. Dr^a. Janeusa Trindade de Souto
(Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFRN. Avaliadora externa)

*Dedico aos meus pais e ao meu irmão,
por todo amor, apoio e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela dádiva da vida e pela oportunidade de evoluir a cada dia.

Aos meu pais, **Elza e Wivonaldo**, por me ensinarem a ser uma cidadã de bem e por todo esforço que fizeram e fazem para que eu e meu irmão tenhamos sempre o melhor. Vocês são o meu maior exemplo, devo tudo a vocês.

Ao meu irmão, **Aderaldo neto**, por todo companheirismo e amizade durante toda a minha vida e por todo apoio e conversas que tivemos nesses últimos dois anos. Saiba que você foi essencial.

Ao meu namorado, **Erick**, por toda amizade, amor e confiança. Obrigada por sempre estar presente e me incentivar e apoiar em tudo o que faço.

Minha eterna gratidão a **Sandra Rodrigues Mascarenhas**, minha orientadora, por toda contribuição na minha formação acadêmica e por ter sido responsável pela minha paixão por imunologia. Só tenho a agradecer por todos os ensinamentos, incentivos, paciência e dedicação. Saiba que não te admiro apenas pelo lado profissional, mas também pela pessoa que és. Obrigada por ser a melhor orientadora!

A meu coorientador, **Luís Quintas**, por ter nos cedido a substância referente a este trabalho e por todo o conhecimento transmitido.

A todos que fazem parte do laboratório de Imunobiotechnology, em especial a **Luiz Henrique**, por toda ajuda na realização dessa pesquisa e pela paciência em responder todas as minhas dúvidas (hahaha). A minha grande amiga e colega de pesquisa **Éssia**, por toda parceria nos experimentos e amizade de sempre. Agradecimento especial também a **José Guilherme, Anne e Júlia** por toda ajuda nessa pesquisa e por ficarem com a mão doendo de tanto bater placa do ELISA, mas ainda assim, continuarem a bater (hahaha). E a todos os outros colegas do laboratório, por sempre estarem presentes e terem contribuído de alguma forma com esse trabalho. Meu muito obrigado!

À minha grande amiga **Fany**, por todo o companheirismo durante todas as etapas do mestrado e pela amizade desde a graduação.

À minha grande amiga **Eduarda**, que apesar de estarmos longe fisicamente, mas que está sempre presente na minha vida. Saiba que você também contribuiu com esse trabalho.

Aos meus colegas de apartamento, **Raylan, Iago, Kaline e Felipe**, por todo apoio nessa trajetória e por sempre estarem na torcida por mim. Às minhas queridas primas, **Gaby e Flavinha**, por toda amizade e parceria durante essa existência e pelo nosso laço de amor que nos une por longas datas. E aos meus queridos amigos de ensino médio e da vida, por sempre acreditarem no meu potencial, **Lidiane, Ana Lúcia e Mikeas**.

A **todos os professores** do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por todo conhecimento transmitido e pela contribuição na minha formação.

Aos professores membros da Banca Examinadora, **Tatjana Keesen, Janeusa de Souto e Ademilson Panunto-Castelo**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho. Agradeço imensamente.

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.

E a todos que não citei, mas que fizeram parte desse trabalho.

Muito obrigada!

“Believe you can and you’re halfway there”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Os esteroides cardiotônicos são compostos naturais capazes de inibir a Na^+/K^+ -ATPase. Esses esteroides, tais como, a marinobufagina e a ouabaína, foram identificados como substâncias endógenas presentes no plasma de mamíferos. Nosso grupo vem evidenciando o papel modulador da ouabaína na resposta imunológica, pela descrição e caracterização de seu efeito anti-inflamatório. No entanto, ainda não há relatos na literatura sobre a marinobufagina nesse aspecto. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar, *in vivo* e *in vitro*, o papel da marinobufagina na inflamação. Inicialmente, camundongos *Swiss* foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com a marinobufagina na dose 0,56 mg/kg, a mesma utilizada nos experimentos com a ouabaína (LEITE et al., 2015), durante três dias consecutivos. Uma hora após o último dia de tratamento, os animais foram estimulados com zimosan (2 mg/mL) via intraperitoneal, de modo a induzir uma inflamação no peritônio. Após 4 h, o fluído peritoneal foi coletado e utilizado para a contagem das células por microscopia óptica e para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). O zimosan, como esperado, induziu aumento da migração celular e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias no peritônio. Por sua vez, o tratamento com a marinobufagina foi capaz de reduzir o número total de células para a cavidade peritoneal, pela redução na migração das células polimorfonucleares. Além disso, esse esteroide foi capaz de reduzir os níveis das citocinas IL-1 β e IL-6. Esse efeito parece ser independente do TNF- α , visto que os seus níveis não foram alterados. Adicionalmente, foi avaliado o efeito da marinobufagina *in vitro*, pela cultura de macrófagos peritoneais com o estímulo do zimosan (2 mg/mL) ou lipopolissacarídeo (LPS) (1 $\mu\text{g/mL}$). Na cultura de macrófagos com o estímulo do zimosan, observou-se que as diferentes concentrações da marinobufagina (10, 100, 1.000 e 10.000 nM) não interferiram na viabilidade dos macrófagos peritoneais e apenas a menor concentração foi capaz de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Na cultura de macrófagos com o estímulo do LPS, foi observado que todas as concentrações da marinobufagina foram capazes de reduzir a produção do óxido nítrico (NO) nessas células. Dessa forma, a partir da análise dos resultados, pode-se sugerir que há evidências de que a marinobufagina possui papel anti-inflamatório *in vivo* e *in vitro*. Portanto, esse trabalho é pioneiro em caracterizar o papel imunológico do esteroide cardiotônico marinobufagina.

Palavras-chave: Marinobufagina. Esteroides cardiotônicos. Inflamação.

ABSTRACT

Cardiotonic steroids are natural compounds capable of inhibiting the Na⁺/K⁺-ATPase. These steroids, such as marinobufagenin and ouabain, have been identified as endogenous substances present in mammalian plasma. Our group has been demonstrating the role of ouabain in the immune response by describing and characterizing its anti-inflammatory effect. However, there are still no reports in the literature about the marinobufagenin in this regard. Therefore, the aim of this work was to analyze, *in vivo* and *in vitro*, the role of marinobufagenin in inflammation. Initially, Swiss mice were treated intraperitoneally (i.p.) with marinobufagenin at the dose 0,56 mg/kg, the same used in ouabain experiments (LEITE et al., 2015), for three consecutive days. One hour after the last day of treatment, animals were stimulated with zymosan (2 mg/mL) intraperitoneally, in order to induce peritoneum inflammation. After 4 h, peritoneal fluid was collected and used for counting cells by optical microscopy and for quantification of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) by immunoenzymatic assay (ELISA). Zymosan, as expected, induced increased cell migration and proinflammatory cytokine levels in the peritoneum. On the other hand, marinobufagenin treatment was able to reduce the total number of cells into the peritoneal cavity by reducing migration of polymorphonuclear cells. In addition, this steroid was able to reduce IL-1 β and IL-6 levels. This effect appears to be independent of TNF- α , since its levels were not affected. In addition, *in vitro* effect marinobufagenin was evaluated by culture of peritoneal macrophages with zymosan (2 mg/mL) or lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/mL) stimulation. In macrophage culture with zymosan stimulation, it was observed that different concentrations of marinobufagenin (10, 100, 1,000 and 10,000 nM) did not interfere in viability of peritoneal macrophages and only the lowest concentration was able to reduce proinflammatory cytokines IL -1 β , IL-6 and TNF- α levels. In macrophage culture with the LPS stimulation, it was observed that all marinobufagenin concentrations were able to reduce nitric oxide (NO) production in these cells. Thus, from the analysis of the results, it can be suggested that there is evidence that marinobufagenin has an anti-inflammatory role *in vivo* and *in vitro*. Therefore, this work is pioneer in characterizing immunological role of the cardiotonic steroid marinobufagenin.

Keywords: Marinobufagenin. Cardiotonic steroids. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química dos esteroides cardiotônicos.....	18
Figura 2 –	Efeito dos esteroides cardiotônicos sobre a Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	20
Figura 3 –	Estrutura química da marinobufagina e da ouabaína	22
Figura 4 –	Recrutamento de leucócitos.....	28
Quadro 1 –	Distribuição dos grupos.....	40
Figura 5 –	Esquema representativo do protocolo experimental <i>in vivo</i>	41
Figura 6 –	Esquema representativo do protocolo experimental <i>in vitro</i> com zimosan.....	44
Figura 7 –	Esquema representativo do protocolo experimental <i>in vitro</i> com LPS... ..	46
Gráfico 1 –	Efeito da marinobufagina na migração de leucócitos totais e diferenciais para o peritônio	50
Gráfico 2 –	Efeito da marinobufagina sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 and TNF- α do exsudato peritoneal	52
Gráfico 3 –	Efeito da marinobufagina na viabilidade dos macrófagos peritoneais com ou sem o estímulo do zimosan	54
Gráfico 4 –	Níveis de NO na cultura de macrófagos peritoneais com o estímulo do zimosan.....	55

Gráfico 5 – Efeito da marinobufagina sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 and TNF- α na cultura de macrófagos peritoneais.....	56
Gráfico 6 – Efeito da marinobufagina na viabilidade dos macrófagos peritoneais com ou sem o estímulo do LPS.....	58
Gráfico 7 – Efeito da marinobufagina nos níveis de NO em macrófagos peritoneais com o estímulo do LPS.....	59
Figura 8 – Esquema representativo do efeito da marinobufagina e ouabaína no processo inflamatório	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APT	Do inglês “Attached proton test”
<i>Avidin-HRP</i>	Do inglês “avidin horseradish peroxidase”
CD	Do inglês “cluster of differentiation”
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CHO	Células derivadas do ovário de hamster chinês
COSY	Do inglês “correlation spectroscopy”
CNS	Sistema nervoso central
CRs	Receptores do complemento
CTB	Células citotrofoblásticas
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
C3	Carbono 3
C14	Carbono 14
C15	Carbono 15
C17	Carbono 17
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DEPT	Do inglês “distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Esteroides cardiotônicos
ELISA	Do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
e.p.m.	Erro padrão da média
ERK	Do inglês “extracellular signal – <i>regulated kinase</i> ”
Fc	Receptor do tipo Fc (fragmento cristalizado)
HMBC	Do inglês “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	Do inglês “Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation”
IL	Interleucina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial

i.p.	Intraperitoneal
JNK	Do inglês “c-Jun N-terminal kinases”
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MBG	Marinobufagina
n	Número de animais
Na⁺/K⁺ - ATPase	Bomba de sódio e potássio ATPase
Na⁺/Ca²⁺	Trocador de sódio e cálcio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
MBG	Marinobufagina
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
MYD88	Do inglês “Myeloid differentiation primary response 88”
NETs	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
p38	Proteína quinase ativadora de mitógeno p38
PBS	Solução fosfato tamponado
PBST	Solução fosfato tamponado contendo tween
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura do inglês “Roswell Park Memorial”
SFB	Soro fetal bovino
Src	Proteína quinase não receptora Src
TLRs	Receptores do tipo Toll (Toll-like)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
NO	Óxido nítrico
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
ZIM	Zimosan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Esteroides cardiotônicos	17
1.1.2	Marinobufagina e ouabaína.....	21
1.2	Inflamação.....	25
1.2.1	Migração celular e o papel dos neutrófilos no processo inflamatório ..	26
1.2.2	Papel das citocinas e óxido nítrico na inflamação	29
1.3	Efeito dos esteroides cardiotônicos na inflamação.....	31
2	JUSTIFICATIVA.....	34
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Material	39
4.1.1	Animais.....	39
4.1.2	Obtenção e preparação da marinobufagina	39
4.2	Métodos.....	40
4.2.1	Tratamento com a marinobufagina para os testes <i>in vivo</i>	40
4.2.2	Peritonite induzido por zimosan	41
4.2.3	Coleta do lavado peritoneal.....	41
4.2.4	Contagem diferencial de células do lavado peritoneal	42
4.2.5	Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas.....	42
4.2.6	Testes <i>in vitro</i>	43

4.2.6.1	Teste <i>in vitro</i> com o estímulo do zimosan	43
4.2.6.1.1	Cultura de macrófagos	43
4.2.6.1.2	Análise da viabilidade celular	45
4.2.6.1.3	Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	45
4.2.6.1.4	Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas.....	46
4.2.6.2	Testes <i>in vitro</i> com o estímulo do lipopolissacarídeo (LPS).....	46
4.2.7	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Estudo do efeito imunomodulador da marinobufagina <i>in vivo</i>	49
5.1.1	Avaliação da marinobufagina na migração celular peritoneal	49
5.1.2	Avaliação da marinobufagina sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias do exsudato peritoneal	51
5.2	Estudo do efeito imunomodulador da marinobufagina <i>in vitro</i>	53
5.2.1	Avaliação <i>in vitro</i> com o estímulo do zimosan.....	53
5.2.1.1	Citotoxicidade da marinobufagina em macrófagos peritoneais.....	53
5.2.1.2	Produção de óxido nítrico na cultura de macrófagos peritoneais.....	54
5.2.1.3	Níveis de citocinas pró-inflamatórias na cultura de macrófagos.....	55
5.2.2	Avaliação <i>in vitro</i> com o estímulo do lipopolissacarídeo (LPS).....	57
5.2.2.1	Citotoxicidade da marinobufagina em macrófagos peritoneais.....	57
5.2.2.2	Produção de óxido nítrico na cultura de macrófagos peritoneais.....	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	70

REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	92
ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	93
ANEXO B – Artigo em colaboração publicado na revista Inflammation Research.....	94
ANEXO C – Artigo em colaboração publicado na revista Frontiers in Physiology	95

INTRODUÇÃO

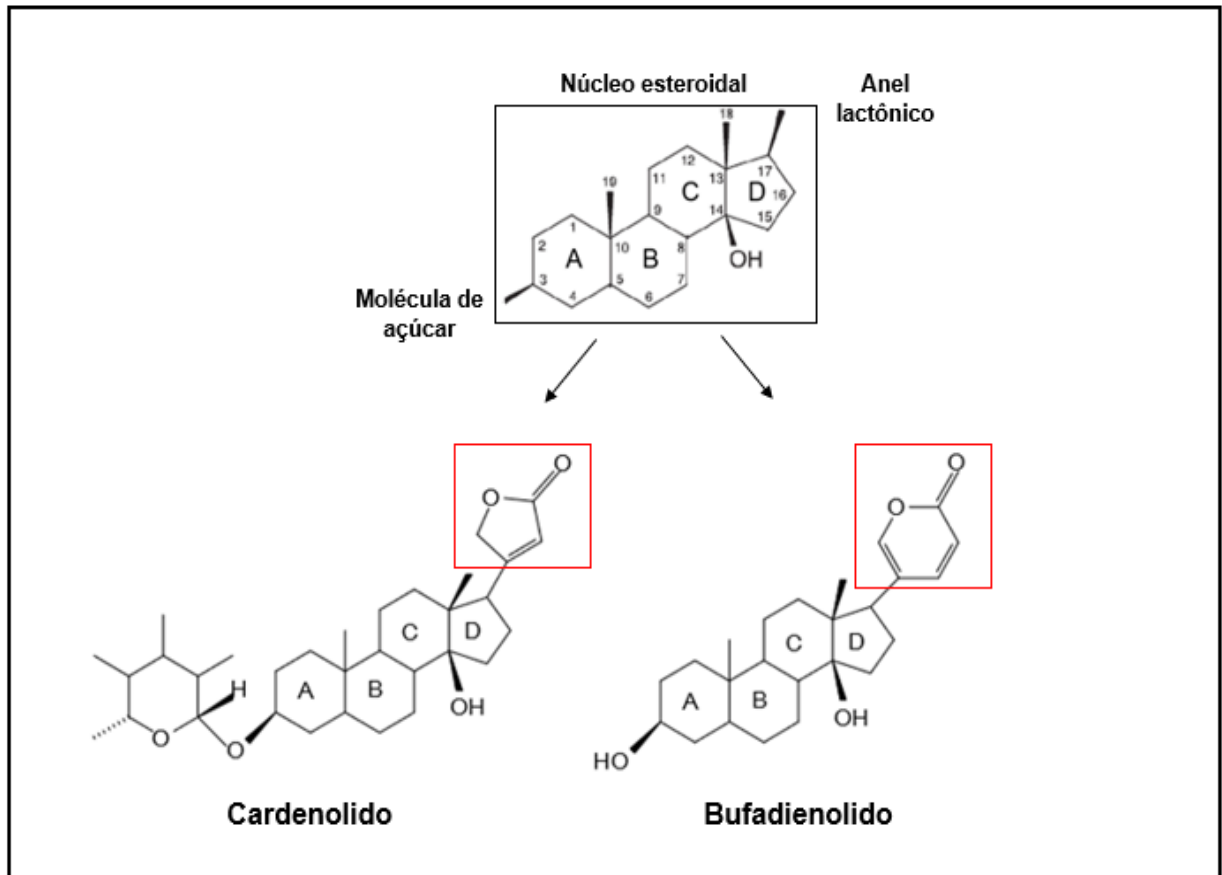
1 INTRODUÇÃO

1.1 Esteroides cardiotônicos

Os esteroides cardiotônicos (comumente conhecidos como digitálicos) constituem uma família de compostos naturais que apresentam uma grande diversidade estrutural, entretanto, todos possuem um núcleo esteroidal em sua estrutura, o qual é considerado o grupo farmacofórico responsável pela atividade desses compostos (SCHONFELD et al., 1985) e um anel lactônico insaturado presente na posição 17 (C17). A natureza do anel lactônico divide o grupo dos esteroides em dois tipos: os cardenolidos, que apresentam uma butirolactona (anel lactônico formado por cinco membros), como exemplo a ouabaína, e os bufadienolidos, que apresentam uma pirona (anel lactônico formado por seis membros), como exemplo a marinobufagina (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Além disso, alguns desses esteroides podem apresentar moléculas de açúcar na posição 3 (C3) e assim são chamados de glicosídeos (Figura 1).

O uso clínico dos esteroides cardiotônicos se iniciou em 1775 quando o médico inglês Willian Withering descobriu que extratos de plantas do gênero *Digitalis* ajudavam pacientes que apresentavam quadros de insuficiência cardíaca e assim, por mais de dois séculos os esteroides cardiotônicos foram utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, apesar do desconhecimento do mecanismo (BLAUSTEIN, 1993; GOTO et al., 1992). Em 1953, foi descoberto que esses compostos eram capazes de se ligar e inibir a Na^+/K^+ -ATPase, uma proteína responsável pelo processo de transporte ativo em grande parte das células animais, na qual leva à saída de três íons sódio (Na^+) e entrada de dois íons potássio (K^+) nas células (SHATZMANN, 1953). Em seguida, no ano de 1960, a descoberta do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no músculo cardíaco de mamíferos levou à conclusão de que, a inibição da bomba de sódio e potássio por digitálicos, favorece o acúmulo de Na^+ dentro da célula, o que leva a reversão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, gerando aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico e assim, resultando no aumento da contratilidade cardíaca (HANSEN, 1984). Portanto, os digitálicos constituem um grupo de esteroides que apresenta capacidade de se ligar e inibir a Na^+/K^+ -ATPase e por esse mecanismo aumentar a contração cardíaca (STEYN, 1998).

Figura 1. Estrutura química dos esteroides cardiotônicos



Fonte: Adaptado de PRASSAS e DIAMANDIS, 2008. De acordo com o número de membros do seu anel lactônico, os esteroides cardíacos são classificados em dois grupos: cardenolidos e bufadienolidos. Alguns deles podem ainda apresentar moléculas de açúcar, como representado no grupo dos cardenolidos.

Os cardenolidos, como a digoxina e ouabaína, foram originalmente isolados de plantas, e os bufadienolidos, como a bufalina e marinobufagina, foram identificados primeiramente na pele e glândula paratiroide de anfíbios (DVELA et al., 2007). Mais tarde, vários compostos semelhantes a esses esteroides foram identificados em tecidos de mamíferos, como no cérebro e glândulas suprarrenais e em fluidos corporais, como no plasma, urina e no líquido cefalorraquidiano (WEIDEMANN, 2005). Os esteroides cardiotônicos identificados endogenamente incluem vários membros da classe dos cardenolidos e dos bufadienolideos, tais como: ouabaína (HAMLYN et al., 1991), digoxina (LICHTSTEIN et al., 1993), marinobufagina (BAGROV et al., 1995), bufalina (NUMAZAWA et al., 1995), telocinobufagina (KOMIYAMA et al., 2005), entre outros. A biossíntese desses compostos tem como precursor o colesterol e ocorre em sua maioria no córtex da glândula adrenal e no hipotálamo, sendo controlada por

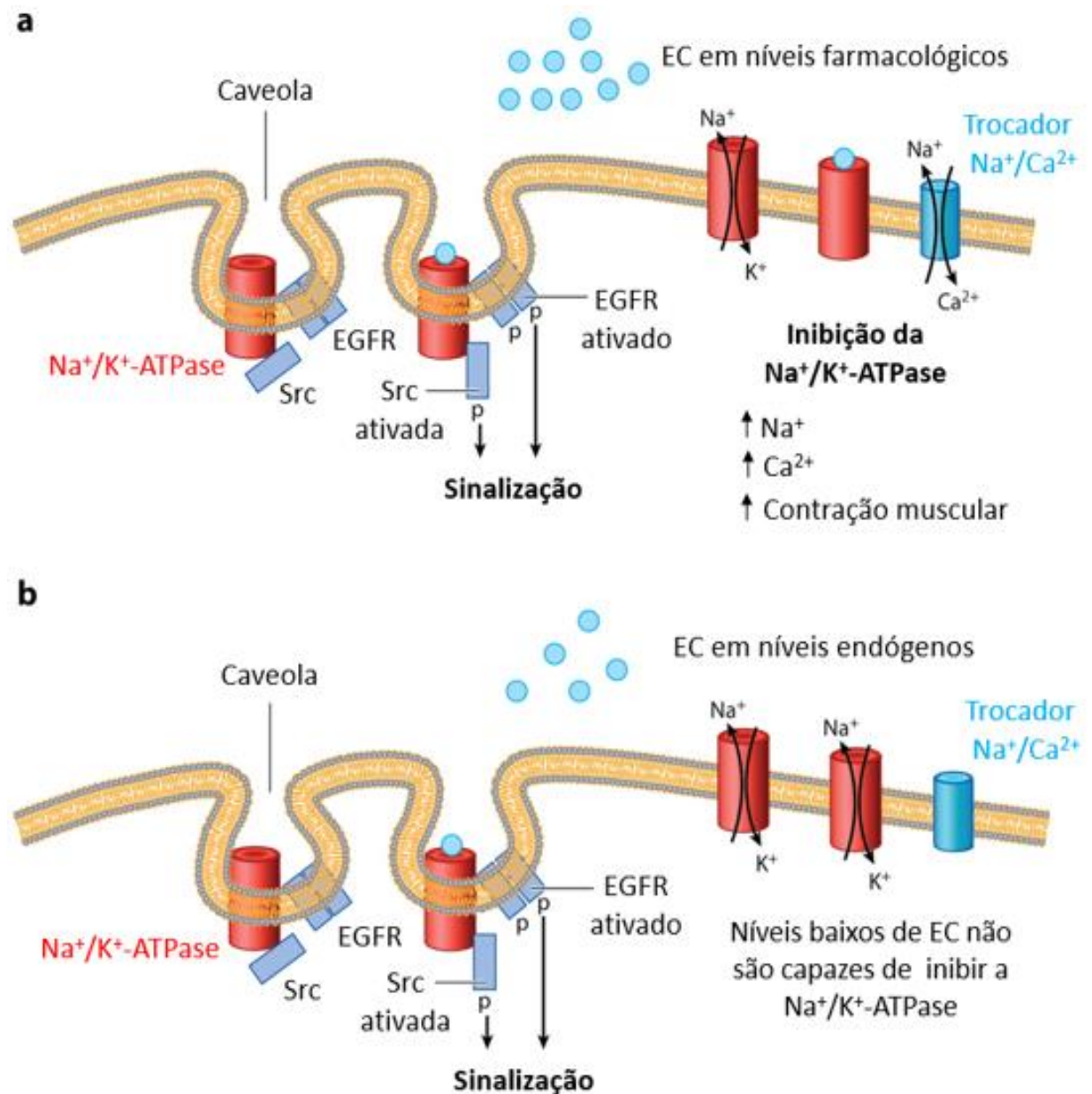
mediadores como angiotensina II, endotelina e adrenalina (GOTO et al., 1990; QAZZAZ et al., 2004).

Assim como os esteroides cardiotônicos exógenos, os compostos endógenos também são capazes de se ligar e inibir a Na^+/K^+ -ATPase. Diversos trabalhos têm demonstrado que essa proteína não atua apenas no equilíbrio iônico celular, mas também como um importante transdutor de sinal (FAN; XIE; TIAN, 2017; LI; XIE, 2009; XIE; ASKARI, 2002). Existe uma população de Na^+/K^+ -ATPases que reside em uma região da membrana celular chamada cavéola e que não desempenha o papel clássico de transporte iônico. Sabe-se que essa Na^+/K^+ -ATPase caveolar está ligada a uma quinase chamada Src, mantendo a bomba inativa (LIANG et al., 2007). Por sua vez, a ligação de um esteroide cardiotônico induziria uma mudança conformacional na Na^+/K^+ -ATPase caveolar e assim, ativaria essa quinase. A Src ativada, levaria a subsequente fosforilação de várias tirosinas, incluindo o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e assim, iniciaria uma cascata de sinalização celular (Figura 2) (TIAN et al., 2006).

Estudos demonstraram que baixas concentrações de ouabaína que são insuficientes para inibir o transporte iônico de sódio e potássio, foram capazes de promover alterações conformacionais na bomba Na^+/K^+ -ATPase. Esse processo, por sua vez, favoreceu a interação da bomba com a proteína quinase Src e dessa forma, resultou na ativação de vias de sinalização que regulam processos como, crescimento, proliferação e motilidade celular (BARWE et al., 2005; LIU et al., 2004); apoptose (WANG et al., 2003) e expressão de vários genes, tais como, c-fos e c-jun (XIE; ASKARI, 2002).

Além dos efeitos cardiovasculares, o uso dos digitálicos vem sendo estudado no tratamento de diversas patologias, como o câncer, doenças neurodegenerativas, alergias, fibroses, entre outros (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Numerosos estudos têm confirmado a ação antiproliferativa e efeitos apoptóticos desses compostos em vários tipos de neoplasias, como câncer de mama (KOMETIANI; LIU; ASKARI, 2005) e pulmão (MIJATOVIC et al., 2006); melanoma (NEWMAN et al., 2006), leucemia (MASUDA et al., 1995) e neuroblastoma (KULIKOV et al., 2007). Dados acumulados nos últimos anos evidenciam que os esteroides cardiotônicos inibem o crescimento tumoral e induzem a morte de células cancerosas por apoptose e autofagia (NEWMAN et al., 2008).

Figura 2. Efeito dos esteroides cardiotônicos sobre a Na^+/K^+ -ATPase



Fonte: LINGREL, 2010. **a.** De maneira clássica, níveis farmacológicos de esteroides cardiotônicos (EC) inibem a Na^+/K^+ -ATPase, aumentando os níveis de Na^+ intracelular que, por sua vez, aumentam o Ca^{2+} intracelular através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, gerando incremento na contração muscular. Essas concentrações também podem ativar vias de sinalização. **b.** Níveis fisiológicos de EC endógenos, tais como ouabaína e marinobufagina, ligam-se a Na^+/K^+ -ATPase caveolar e ativam vias de sinalização celular de maneira Src-dependente, sem interferir no transporte iônico mediado pela Na^+/K^+ -ATPase.

Em relação a doenças neurodegenerativas, vários trabalhos vêm descrevendo o papel dos esteroides cardiotônicos no sistema nervoso central (CNS) (GOLDSTEIN et al., 2006; ORELLANA et al., 2016). Foi visto que a digoxina, digitoxina e ouabaína são moléculas com potentes efeitos neuroprotetores em modelos animais

de acidente vascular cerebral (WANG et al., 2006). Além disso, a inibição da Na^+/K^+ -ATPase pela ouabaína, reverte as anomalias de condução em distúrbios desmielinizantes (KAJI; SUMNER, 1989). Um outro estudo, mostra que a digoxina é capaz de aumentar os níveis de sulfeto de hidrogênio (H_2S) no cérebro, no qual está diminuído na doença de Alzheimer, sugerindo assim que os esteroides cardiotônicos poderiam aliviar os sintomas de pacientes com doenças neurodegenerativas (WILINSKI et al., 2011). Adicionalmente, tem-se observado a relação entre a Na^+/K^+ -ATPase e fibroses. Recentes dados mostram que, os esteroides cardiotônicos são capazes de bloquear a diferenciação de miofibroblastos de maneira tipo celular específica (ORLOV et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que a digitoxina e oleandrina podem atuar na fibrose cística por serem capazes de suprimir a hipersecreção da interleucina 8 (IL-8), a qual está aumentada nessa doença (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006; SRIVASTANA et al., 2004), sugerindo, portanto, que os esteroides cardiotônicos poderiam ser utilizados como alvo terapêutico nessas patologias

1.1.2 Marinobufagina e ouabaína

Preparações contendo bufadienolidos têm sido utilizadas no tratamento de doenças cardíacas e na medicina tradicional do Extremo Oriente desde a antiguidade (KRENN; KOPP, 1998). A identificação desses compostos ocorreu a partir da pele e do veneno de anfíbios como o sapo, *Bufo marinus* (atualmente denominado *Rhinella marina*), do qual foi extraído o esteroide marinobufagina (BAGROV et al., 1995). Já a ouabaína foi conhecida inicialmente como um composto de origem vegetal, encontrado em algumas plantas da família Apocynaceae (BLAUSTEIN, 1993). Ambos compostos, marinobufagina e ouabaína, assim como outros esteroides cardiotônicos foram identificados endogenamente, sendo encontrados em tecidos de mamíferos, como no cérebro e glândulas suprarrenais e em fluidos corporais, como no plasma, urina e no líquido cefalorraquidiano (BAGROV et al., 1998; HAMLYN et al., 1991; WEIDEMANN, 2005; YOSHIKA, KOMIYAMA; TAKAHASHI, 2011).

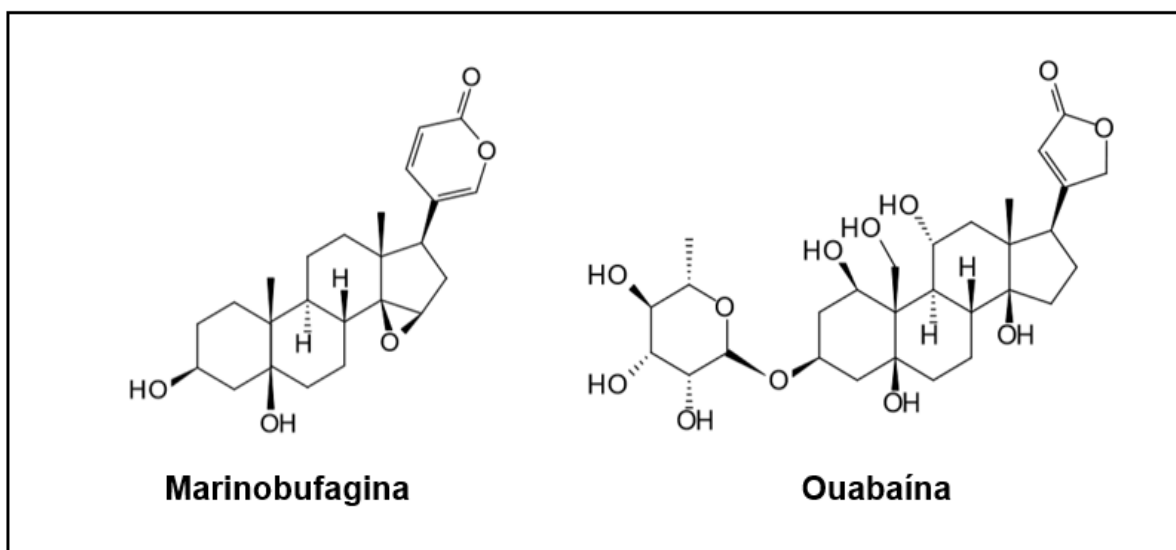
Em relação a estrutura química destes dois esteroides, a marinobufagina apresenta uma menor quantidade de hidroxilas no núcleo esteroidal em comparação com a ouabaína; não possui grupamento açúcar no carbono 3 (C3) e apresenta um grupamento epóxido entre C14 e C15 (éter cíclico com três átomos) em sua estrutura.

Além disso, como comentado anteriormente, o anel lactônico da marinobufagina possui seis membros, diferentemente da ouabaína que apresenta anel lactônico de cinco membros (TOUZA, 2011) (Figura 3).

A ouabaína 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).

No ano de 1993, sabia-se que o veneno do sapo *Bufo marinus* continha um material imunorreativo semelhante a digoxina, capaz de inibir a bomba de sódio e gerar efeitos inotrópicos positivos (BAGROV et al., 1993). Em seguida, no ano de 1995, esta substância foi identificada como marinobufagina, um esteroide descrito anteriormente em sapos (BAGROV et al., 1995). E em 1998, utilizando a espectrometria de massa foi demonstrado que a marinobufagina estava presente no plasma e urina de humanos (BAGROV et al., 1998; KOMIYANA et al., 2005). Mais tarde, esse esteroide, assim como a ouabaina, foi identificado em tecidos cerebrais, como hipotálamo e glândula pituitária, e na adrenal (FEDOROVA et al., 2002).

Figura 3. Estrutura química da marinobufagina e da ouabaína



Fonte: TOUZA, 2011.

Estes esteroides endógenos, marinobufagina e ouabaína, podem ser identificados no plasma humano em concentrações de picomolares a nanomolares e

pelo fato de serem sintetizados pela adrenal e hipotálamo e por estarem envolvidos na fisiologia do organismo, como substâncias natriuréticas e vasoconstrictoras, são consideradas hormônios esteroidais (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; FERRANDI et al., 1997; GOTO et al., 1992; HAMLYN et al., 1991; MACHADO et al., 2018; PAMNANI et al., 1981; SCHONER et al., 2002, 2003). Estudos utilizando precursores radiomarcados demonstram que a biossíntese da ouabaína utiliza colesterol, pregnenolona e progesterona como importantes precursores (LICHTSTEIN et al., 1998; HAMLYN, 2004; QAZZAZ et al., 2004). No entanto, sugere-se que os bufadienolidos apresentem vias biossintéticas diferentes dos cardenolidos, pois estudos com células adrenocorticais Y1 de murino demonstram que a biossíntese da marinobufagina requer colesterol como precursor, mas não envolve a conversão do colesterol em pregnenolona (DMITRIEVA et al., 2000; OLIVEIRA, 2013).

A secreção da marinobufagina e da ouabaína são estimuladas pelo aumento da concentração plasmática de sódio, volume extracelular, angiotensina II, hormônio adrenocorticotrófico, entre outros (BAGROV et al., 1996; BLAUSTEIN, 1993; DE WARDENER et al., 1961; FEDOROVA et al., 2001). Diversas evidências demonstram que as secreções desses dois esteroides podem se alterar de acordo com o estado fisiológico ou patológico em que se encontra o organismo. Estudos revelaram que a marinobufagina e ouabaína têm suas produções aumentadas em pacientes hipertensos, assim como em diferentes modelos de ratos com hipertensão; pacientes com insuficiência cardíaca e em mulheres grávidas (FEDOROVA et al., 2005; GONICK et al., 1998; OLIVEIRA, 2013; PACZULA; WIECEK; PIECHA, 2016; SCHONER, 2000).

Concentrações de marinobufagina próximas às encontradas em níveis plasmáticos promovem vasoconstrição em artérias pulmonares e mesentéricas humanas (BAGROV; FEDOROVA, 1998). Adicionalmente, no modelo de hipertensão induzido por sobrecarga de NaCl em ratos Dahl-S, foi observado que os níveis plasmáticos da marinobufagina estavam aumentados em relação aos ratos normotensos e que a administração *in vivo* de anticorpo específico para esse esteroide, promoveu redução na pressão sanguínea e na excreção de sódio desses ratos. Ainda nesse modelo, foi descrito que o aumento dos níveis da ouabaína no plasma precedeu o aumento da marinobufagina na circulação, pois foi observado que, a sobrecarga de NaCl na dieta estimulou a liberação da ouabaína cerebral e através de uma via de receptor de angiotensina II AT1 e provavelmente por ativação simpática,

estimulou a marinobufagina adrenocortical, na qual foi capaz de aumentar a contratilidade cardíaca, induzir vasoconstrição periférica e natriurese nesse modelo (FEDOROVA et al., 2000, 2002, 2007). Esses resultados, descritos pelo grupo de Bagrov, sugerem que a ouabaína atua como um neurohormônio, estimulando a liberação da marinobufagina adrenocortical, e essa atua como uma potente substância vasoconstrictora e natriurética.

Em um estudo em modelo experimental de isquemia *in vitro*, foi visto que o aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase estava relacionado com a proteção aos neurônios, demonstrando assim, a participação dessa bomba na neuroproteção (TIAN et al., 2008). Sabe-se que esteroides cardiotônicos são potentes moduladores dessa bomba e que altas doses farmacológicas desses esteroides são capazes de inibi-la. No entanto, foi relatado que concentrações fisiológicas desses esteroides aumentam a atividade da Na^+/K^+ -ATPase através de sinalização intracelular (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009). Assim, foi demonstrado que a marinobufagina e a ouabaína em baixas concentrações (fisiológicas) foram capazes de aumentar a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e dessa forma, proteger os neurônios em modelo experimental de isquemia. Sugerindo assim, o efeito neuroprotetor endógeno desses esteroides (OSELKIN; TIAN; BERGOLD, 2010).

Esteroides cardiotônicos são capazes de alterar várias funções celulares, tais como, proliferação e crescimento celular (EHRIG et al., 2014; SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2007). Concentrações farmacológicas de marinobufagina e ouabaína induzem apoptose e redução de proliferação através de inibição da Na^+/K^+ -ATPase em vários tipos de células, tais como, células endoteliais e cardíacas (PENNIYAYNEN et al., 2015). Adicionalmente, esses esteroides também demonstram atividade antiproliferativa e apoptótica em vários tipos de neoplasias, tais como, leucemia e osteosarcoma (CHOU et al., 2018; LIMA, 2016; MACHADO et al., 2018). Fisiologicamente, demonstrou-se que a marinobufagina em baixas concentrações foi capaz de reduzir a proliferação das células CTB (citotrofoblasticas) e CHO (células derivadas de ovário de hamster chinês). Esse efeito foi relacionado a capacidade desse esteroide em atenuar a atividade da MAPK ERK1/2 (UDDIN et al., 2007).

Por fim, estudos sugerem que os esteroides cardiotônicos desempenham atividade imunomoduladora (TAKADA et al., 2009; YANG et al., 2005). A ouabaína é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica por exercer efeitos inibitórios sobre a proliferação linfocitária (OLEJ et al., 1998), aumento do marcador

de ativação CD69 em timócitos (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2003) e por atuar negativamente no processo inflamatório por reduzir 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).

1.2 Inflamação

O sistema imunológico é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas que são capazes de manter ou reestabelecer a homeostasia do organismo (WILSON; TRUMPP, 2006). Esse sistema, entre várias outras funções, desempenha um papel fundamental no reconhecimento rápido e eliminação de microrganismos patogênicos por diferentes processos, como a indução da inflamação (SKELDON; SALEH, 2011). A inflamação é definida como uma resposta fisiológica que pode ser desencadeada, dentre outros estímulos, por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou danos (DAMPs) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008). Além disso, o processo inflamatório pode também ser compreendido como uma resposta de adaptação ao mau funcionamento de tecidos ou desequilíbrio homeostático. Portanto, a inflamação é uma resposta imunológica reconhecida como um processo benéfico, capaz de estabelecer a homeostasia do organismo, no entanto, quando desregulada, pode tornar-se prejudicial, por isso o processo inflamatório está envolvido no desenvolvimento de diversas doenças, tais como, artrite reumatoide, asma, câncer, hipertensão, obesidade, entre outras (NATHAN; DING, 2010).

Didaticamente, a inflamação é dividida em fase aguda e fase crônica. Após o contato com um antígeno, o sistema imunológico desencadeia um processo inflamatório para tentar eliminá-lo do organismo. Observa-se então, um estágio inicial denominado de fase aguda, que é caracterizada por curta duração, perdurando por minutos, horas ou alguns dias (ARSATI et., 1999). Durante esse processo, fenômenos vasculares e celulares levam ao surgimento dos cinco sinais cardinais da inflamação, descritos por Cornelius Celsus: dor, calor, rubor e edema, acompanhados ou não de perda da função do tecido ou órgão afetado (SEDGWICK; LEES, 1986; SERHAN, 2010). Atualmente, está definido que os sinais cardinais da inflamação resultam da

vasodilatação (calor e rubor); da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (dor); do acúmulo de leucócitos e do aumento do fluido intersticial (edema) e da inibição do reflexo muscular e rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (ALLER et al., 2007; SCOTT et al., 2004).

A inflamação aguda, caracterizada principalmente pela vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e migração de células para o local da injúria é fisiologicamente importante tanto na defesa do hospedeiro, como na reparação tecidual, no entanto, se esse processo for persistente, pode evoluir para um processo crônico (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Na fase crônica, ocorrem alterações na composição dos leucócitos infiltrantes, que passam de neutrófilos, para uma mistura de células mononucleares; principalmente linfócitos e macrófagos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Adicionalmente, a inflamação crônica é caracterizada por possuir maior duração (semanas, meses e/ou anos) e está associada à proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese), fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004). Entretanto, essa é apenas uma divisão didática, visto que a evolução da resposta acontece de forma progressiva, combinando elementos presentes nas duas fases mencionadas.

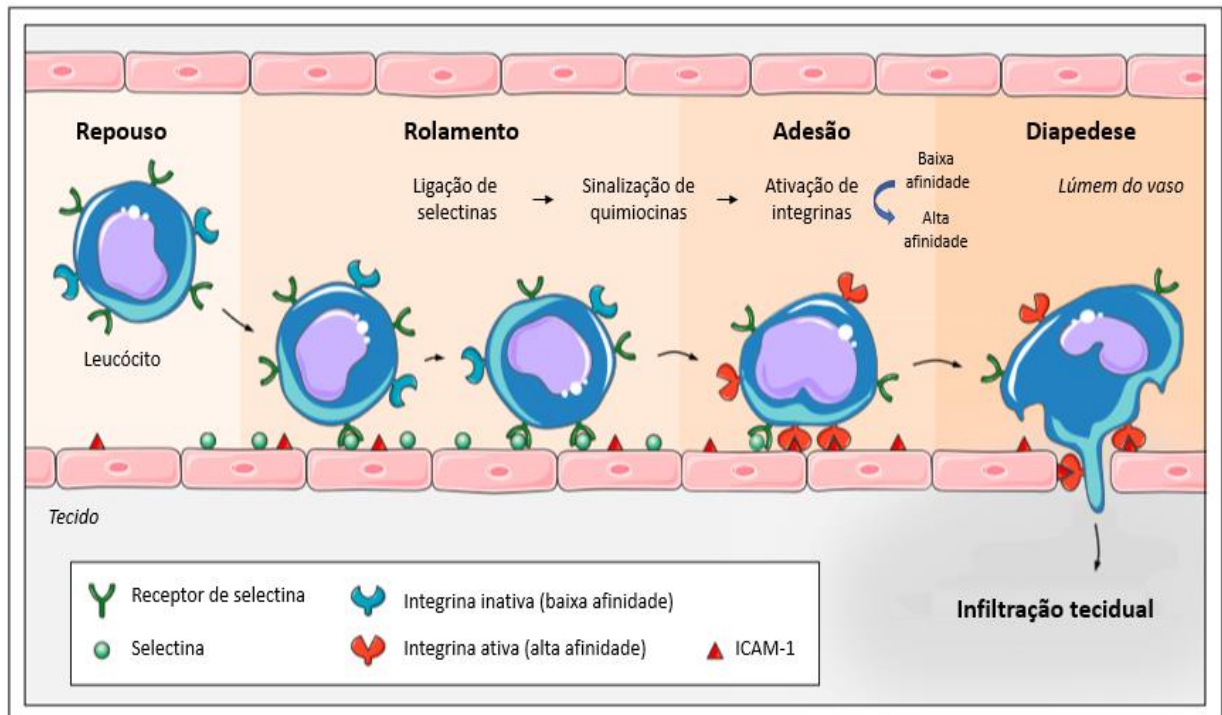
1.2.1 Migração celular e o papel dos neutrófilos no processo inflamatório

A potencialização da resposta imunológica depende da habilidade dos leucócitos se deslocarem da circulação para o tecido. Essa capacidade migratória das células do sistema imunológico é um dos principais eventos que compõe a resposta fisiológica inerente a inflamação, e esse processo é regulado por sinais intracelulares e extracelulares (LANG; RATKE, 2009; VESTWEBER, 2015). O endotélio é a primeira barreira que os leucócitos têm de enfrentar durante o recrutamento para os tecidos inflamados. Durante esse processo, as células endoteliais contribuem ativamente para o extravasamento desses leucócitos pela expressão de moléculas de adesão, liberação de citocinas e quimiocinas. Esses mediadores permitem o rolamento dos leucócitos na superfície apical do endotélio e posteriormente, a transmigração intercelular. A cascata de extravasamento dessas células é um processo complexo de múltiplas etapas que requer a ativação de várias vias de sinalização, tanto nos leucócitos como nas células endoteliais (SCHNOOR, 2015).

A inflamação aguda se inicia após o reconhecimento de sinais (patógenos, por exemplo) por células residentes, tais como, mastócitos e macrófagos. Esse reconhecimento promove a liberação de mediadores, como citocinas e quimiocinas, que induzem as células endoteliais a aumentarem a expressão de proteínas na superfície celular chamadas selectinas. Os dois tipos principais expressos por essas células são as selectinas P e E, enquanto que os leucócitos expressam os ligantes dessas selectinas na superfície celular, ocorrendo assim, uma interação leucócito endotélio. Essa interação é de baixa afinidade e é facilmente rompida pela força de cisalhamento do sangue fluente. Como resultado, os leucócitos ligam-se e desligam-se, rolando toda superfície endotelial e por isso, o nome dessa primeira etapa é chamado rolamento. Além dos ligantes de selectinas, os leucócitos expressam uma família de moléculas de adesão denominadas integrinas, as quais estão em um estado de baixa afinidade, no entanto, essa afinidade é aumentada pela sinalização de quimiocinas, passando, portanto, de um estado de baixa para alta afinidade. Os principais ligantes de integrinas presentes nas células endoteliais são o VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1). Assim, a interação de alta afinidade entre as integrinas e seus ligantes promove uma forte adesão dos leucócitos ao endotélio e assim, posteriormente ocorre a diapedese, ou seja, migração dos leucócitos através dos espaços intercelulares endoteliais para o sítio inflamado (ABBAS; LICHTMAN, 2012; WEBER; FRAEMOHS; DEJANA, 2007) (Figura 4).

Após os leucócitos chegarem ao tecido, essas células reconhecem o antígeno e induzem uma cascata de sinalização intracelular que culmina na liberação de mediadores inflamatórios, tais como, citocinas pró-inflamatórias e possivelmente, a liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio; afim de combater o indutor da resposta imunológica e consequentemente reestabelecer a homeostasia local. Vários tipos celulares participam da resposta imune, como os neutrófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas, mastócitos, basófilos, linfócitos, entre outras. Como principal fagócito circulante, o neutrófilo é o primeiro e o mais abundante leucócito a chegar ao sítio inflamado, sendo considerado um componente integral da imunidade inata e, portanto, é a célula mais estudada no processo inflamatório agudo (EPSTEIN; WEISS, 1989; SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003).

Figura 4. Recrutamento de leucócitos



Fonte: LAGARRIGUE; KIM; GINSBERG, 2016. Durante a resposta inflamatória, os leucócitos sofrem processo de rolamento, adesão e diapedese. Inicialmente, essas células se aderem transitoriamente e rolam ao longo do endotélio por meio da ligação das selectinas. Através da ação das quimiocinas, as integrinas passam de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade, o qual confere forte adesão ao endotélio, seguindo assim, a transmigração dos leucócitos para o endotélio.

Os neutrófilos são células fundamentais a resposta contra patógenos extracelulares, sendo caracterizados pela liberação de enzimas líticas presentes em seus grânulos com grande potencial antimicrobiano e por possuírem a capacidade de atuar como fagócitos. Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos apresentam um tempo de meia vida curto entre 10 a 12 horas, embora sua sobrevivência pode ser controlada pela liberação de citocinas, quimiocinas e produtos microbianos (BORREGAARD, 2010; NATHAN, 2006).

Os receptores de superfície celular nos neutrófilos são essenciais para os processos de fagocitose e ativação dos mecanismos antimicrobianos, tais como, os receptores Fc (FcRs) e receptores do complemento (CRs), os quais desencadeiam a maquinaria fagocítica (VAN KESSE; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014). Esse processo é dado pela fusão de grânulos citosólicos nos vacúolos fagocíticos, convertendo o fagossomo em fagolisossomo, além disso, enzimas presentes nesses grânulos podem ser liberadas no ambiente extracelular, dependendo do estímulo. Ao mesmo tempo, a NADPH oxidase é ativada e assim, capaz de converter o oxigênio

em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esse processo é conhecido como explosão respiratória. Adicionalmente, espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), agem independente e sinergicamente com outras espécies reativas para formar espécies citotóxicas secundárias e assim aumentar a resposta dos neutrófilos (MCGUINNESS; KOBAYASHI; DELEO, 2016).

Além dos receptores Fc (FcRs) e do complemento (CRs), os receptores do tipo Toll (TLR) desempenham papel fundamental na resposta dos neutrófilos. Uma grande variedade de estímulos, tais como, o lipopolissacarídeo (LPS) presente na superfície de membranas de bactérias Gram-negativas e o zimosan, presente na superfície de fungos, são capazes de ativar os TLR 4 e TLR 2, respectivamente. A ativação desses receptores, inicia uma sinalização intracelular que culmina na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e fatores de transcrição, como exemplo, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (TAKEDA; AKIRA, 2005). A ativação desse fator de transcrição induz a expressão gênica de vários mediadores inflamatórios como, citocinas, quimiocinas, proteínas reguladoras da apoptose e moléculas de adesão (TAKADA et al., 2009).

Portanto, o neutrófilo é essencial para defesa efetiva do hospedeiro e já está bem descrito que deficiências na função dessa célula estão relacionadas ao aumento da frequência e gravidade das infecções bacterianas e fúngicas. Por outro lado, a capacidade destrutiva dessa célula leva a injúria do hospedeiro em estados de inflamações desreguladas. Considerando isso, o bloqueio do recrutamento dessa célula parece ser uma maneira crucial de evitar a manutenção da inflamação e é por isso que esse polimorfonuclear é, e vem sendo bastante estudado (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003).

1.2.2 Papel das citocinas e óxido nítrico na inflamação

As citocinas são substâncias pleiotrópicas e fontes solúveis de sinais reguladores, sendo produzidas por células do sistema imunológico e outros tipos celulares. Essas proteínas regulam o início, a manutenção e o término das reações inflamatórias pela modulação das células do sistema imunológico. Dessa forma, são determinantes no processo de migração celular e para os efeitos sistêmicos durante uma inflamação aguda. Entre as citocinas envolvidas em processos inflamatórios,

destacam-se a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (LACY; STOW, 2011).

A interleucina 1 β (IL-1 β) é membro da família da interleucina 1 (IL-1). Essa citocina é produzida em sua forma inativa (pro-IL-1 β) e por ação da proteína caspase-1, é convertida em sua forma ativa e liberada no meio extracelular. A IL-1 β é um importante mediador em respostas inflamatórias e está envolvida em diversas doenças, tais como, diabetes, artrite reumatoide e câncer (EDER et al., 2009; TAN et al., 2016). Adicionalmente, essa citocina ativa a expressão de moléculas de adesão, o que favorece o recrutamento e ativação de leucócitos, além de aumentar a expressão de genes como a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), fosfolipase A2 e a sintase do óxido nítrico (iNOS) (WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

O nível sistêmico da interleucina 6 (IL-6) está relacionado com a gravidade de doenças, tais como, obesidade, diabetes e vários tipos de câncer (DMITRIEVA et al., 2016). Assim, essa citocina está envolvida em vários processos inflamatórios e desenvolve suas ações ao interagir com um receptor presente na membrana (IL-6Ra) que está ligado a via de sinalização JAK-STAT. Essa via de sinalização ativada, por sua vez, regula a expressão de genes responsáveis pela proliferação celular, angiogênese e apoptose (WANG et al., 2013; YU; PARDOLL; JOVE, 2009).

O TNF- α desenvolve importante papel no processo inflamatório, pois está envolvido na indução da expressão endotelial de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1; ativação de neutrófilos e macrófagos, aumento da permeabilidade vascular, além de atuar como um fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Além disso, o TNF- α é capaz de ativar a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), representada pelas vias da ERK1/2, ERK5, JNK e p38. Essas proteínas, por sua vez, são capazes de ativar fatores de transcrição, como exemplo o NF- κ B, que regulam a transcrição de genes inflamatórios (KAMINSKA, 2005).

Além das citocinas participarem da resposta inflamatória, outros mediadores como, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio possuem um papel fundamental nesse processo. O NO é um gás solúvel produzido por diversos tipos celulares, tais como, células do sistema imunológico, células endoteliais e neurais, entre outras (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988; WIESINGER, 2001). Esse gás é sintetizado pela ação da sintase do óxido nítrico (NOS), na qual catalisa a reação de oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina, convertendo-o em L-citrulina e óxido

nítrico. Está descrito na literatura que existem três isoformas da NOS: a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS), e é essa última que está envolvida nas respostas imunológicas (MARLETTA, 1994; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A iNOS foi originalmente descrita em macrófagos peritoneais de camundongos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997) como a principal enzima para síntese de NO na imunidade e inflamação. O gene da iNOS, o qual está sob o controle do fator de transcrição NF- κ B, é induzido por lipopolissacarídeo bacteriano ou citocinas pró-inflamatórias clássicas, tais como a IL-1 β e TNF- α (COLEMAN, 2002). O NO produzido por macrófagos ativados, é liberado em grandes quantidades e desenvolve uma reação inflamatória por levar a um aumento na síntese de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e derivados do ácido araquidônico e por sua capacidade em ativar a enzima ciclo-oxigenase2 (COX-2) (DUDHGAONKAR et al., 2004).

1.3 Efeito dos esteroides cardiotônicos na inflamação

A inflamação, como descrita anteriormente, é uma resposta do sistema imunológico, e esta, pode ser modulada por substâncias ativas, pela capacidade em suprimir ou aumentar essa resposta desencadeada pelo sistema imunológico. Vários trabalhos sugerem que os esteroides cardiotônicos, como a ouabaína, digoxina e oleandrina, possuam atividade imunomoduladora, por serem capazes de interferirem em vários parâmetros inflamatórios, como migração celular, permeabilidade vascular e citocinas pró-inflamatórias (ESPOSITO; POIRIER; CLARK, 1989; LEITE et al., 2015; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2008; TAKADA et al., 2009; YANG et al., 2005).

A inflamação aguda inicia após o reconhecimento de sinais (patógenos, por exemplo) por células residentes, tais como, mastócitos e macrófagos. Esse reconhecimento promove a liberação de mediadores, tais como, histamina e prostaglandina, na qual estimula vasodilatação e extravasamento de fluído no vaso. Um dos primeiros artigos que associou a ouabaína e a inflamação revelou que esse esteroide foi capaz de suprimir a permeabilidade vascular em ovelha, induzida pelo agente irritante trepentina (LANCASTER; VEGAD, 1967). Além disso, dados do nosso grupo demonstraram que a ouabaína administrada 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 (DE VASCONCELOS et al., 2011). Além disso, De Vasconcelos (2011) também demonstrou a capacidade da ouabaína em modular a nocicepção. A administração intraperitoneal de ouabaína foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo em modelo inflamatório de dor (teste de contorção induzido por ácido acético), e isso foi relacionado a inibição de mediadores como prostaglandina e bradicinina.

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio da inflamação. Essas células polimorfonucleares são caracterizadas pela liberação de enzimas líticas presentes em seus grânulos e por possuírem a capacidade de atuar como fagócitos (BORREGAARD, 2010; NATHAN, 2006). Porém, já está bem descrito que essa célula leva a lesão tecidual do hospedeiro em inflamações persistentes, portanto são apontados como um alvo em terapias emergentes. Resultados do nosso grupo evidenciaram a capacidade da ouabaína em reduzir o número de neutrófilos em vários modelos de inflamação como, peritonite e inflamação das vias aéreas (DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; LEITE et al., 2015).

Estímulos inflamatórios também ativam a via das MAPKs, envolvida na síntese de citocinas pró-inflamatórias. MAPKs podem ser separados em quatro grupos, a ERK1/2 e ERK5, JNK e p38. A via de p38 promove a regulação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , 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). Adicionalmente, a p38 fosforilada contribui para a ativação do NF- κ 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).

As citocinas inflamatórias, a exemplo de TNF- α e IL-1 β , ativam o fator de transcrição NF- κ 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- κ 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 β , TNF- α 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-kB (LEITE et al., 2015).

Assim, nosso grupo vem demonstrando a capacidade da ouabaína em atuar como uma substância anti-inflamatória; por reduzir migração de células para o sítio inflamado sob vários estímulos, como zimosan e *Leishmania amazonensis*; inibir citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α ; reduzir a atividade da MAPK p38 e do fator de transcrição NF-kB e modular negativamente o processo inflamatório pulmonar, pela redução na migração eosinofílica, citocinas do perfil Th2 e atenuação da produção de muco nos bronquíolos (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; JACOB et al., 2013; LEITE et al., 2015; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008, 2009, 2014). Enquanto a ouabaína possui vários estudos sobre seu efeito na inflamação, ainda não há relatos na literatura sobre o papel da marinobufagina nesse aspecto. Nesse contexto, esse trabalho é pioneiro em caracterizar o papel imunológico da marinobufagina, tendo como hipótese que essa substância possua ação anti-inflamatória, visto que a ouabaína e outros esteroides cardiotônicos desempenham essa atividade.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Esteroides cardiotônicos constituem uma família de compostos naturais que apresentam uma gama de atividades biológicas, mas que possuem em comum a capacidade de inibir a Na^+/K^+ -ATPase, uma proteína que estabelece o gradiente eletroquímico desses íons através da membrana (SHATZMANN, 1953). Mais recentemente, várias dessas substâncias foram encontradas no plasma de mamíferos, como a marinobufagina (BAGROV et al., 1998) e a ouabaína (HAMLYN et al., 1991).

Diversas evidências demonstram que a secreção de marinobufagina e ouabaína podem se alterar de acordo com o estado fisiológico em que se encontra o organismo. Existem vários eventos, tanto fisiológicos como patológicos que podem modificar os níveis endógenos desses compostos, pois foram encontrados níveis elevados destes dois esteroides em pacientes hipertensos, pacientes com insuficiência renal e em mulheres grávidas (PACZULA; WIECEK; PIECHA, 2016; SCHONER, 2000).

A marinobufagina e a ouabaína têm sido bastante estudadas por sua capacidade de interferir em vários mecanismos reguladores da homeostasia do corpo (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009). Entretanto, pouco se sabe ainda sobre o papel dessas substâncias no nosso organismo. Nosso grupo vem evidenciando o papel modulador da ouabaína na resposta imunológica, pela descrição e caracterização de seu efeito anti-inflamatório. (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; LEITE et al., 2015; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008, 2014). Porém, o papel da marinobufagina em processos inflamatórios ainda não foi explorado. Portanto, este trabalho buscou analisar o efeito da marinobufagina no processo inflamatório e realizar uma comparação entre esses dois esteroides.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da marinobufagina no processo inflamatório agudo em modelo experimental murino *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- *In vivo*, após a indução de peritonite com zimosan:

- Verificar o efeito da marinobufagina na migração de leucócitos encontrados no lavado peritoneal, avaliando o número de células e as subpopulações.
- Estudar os efeitos da administração da marinobufagina na produção de citocinas pró-inflamatórias encontradas no peritônio.

- *In vitro*, em macrófagos murinos peritoneais:

✓ **Estimulados com zimosan:**

- Avaliar o efeito da marinobufagina na citotoxicidade em cultura celular.
- Analisar o efeito da marinobufagina na produção de NO (óxido nítrico).
- Verificar o efeito da marinobufagina na produção das citocinas pró-inflamatórias.

✓ **Estimulados com lipopolissacarídeo:**

- Avaliar o efeito da marinobufagina na citotoxicidade em cultura celular.
- Analisar o efeito da marinobufagina na produção de NO.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Para a realização deste trabalho, os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB) com o registro número 125/2016 (ANEXO A). Na realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss albino* fêmeas com peso corporal entre 25 e 35g. Os animais foram fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e mantidos com livre acesso a água e a uma dieta controlada a base de ração do tipo *pellets* em uma sala com temperatura entre 21 ± 1 °C e ciclos claro/escuro de 12 horas.

4.1.2 Obtenção e preparação da marinobufagina

A marinobufagina foi purificada a partir do veneno dos sapos *Rhinella schneideri* no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo pós-doutorando Geraldino Cunha Filho. O extrato bruto foi obtido de 360 espécimes (sapo cururu) capturados em Brasília, Distrito Federal, e Bacabal, Maranhão (licença IBAMA/RAN nº. 097/06 - Processo 02010.000832/04-74).

O veneno foi obtido por pressão manual e coletado em placas de Petri. Após desidratado em dissecador sob vácuo, o veneno seco (95,10 g) foi pulverizado, extraído com acetato de etila por três vezes (300 mL), com intervalos de uma semana, e concentrado em rota-evaporador sob vácuo fornecendo um resíduo marrom e amorfo (9,0 g). Alíquotas com cerca de 1,2 g do extrato foram fracionadas por cromatografia em coluna *dry-flash* e o composto isolado (marinobufagina) foi submetido as análises por infravermelho e ressonância magnética nuclear (AMARAL, 2011).

Na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 5 mg/mL e armazenada no freezer (-20 °C). Para os experimentos *in vitro* a concentração máxima de DMSO utilizada foi

0,016 % e nos experimentos *in vivo* a porcentagem máxima utilizada foi de 0,6 %. Ambas concentrações, *in vitro* e *in vivo*, não induzem efeitos tóxicos (DA SILVA, 2016).

4.2 Métodos

4.2.1 Tratamento com a marinobufagina para os testes *in vivo*

A fim de compararmos o efeito da ouabaína descrito na literatura com a nossa droga experimental (marinobufagina), foi utilizado como base o trabalho do nosso grupo: Leite et al. (2015). Dessa forma, foi utilizado a mesma dose (0,56 mg/kg) e o mesmo protocolo experimental testado (pré-tratamento durante três dias consecutivos).

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: Salina; DMSO; MBG (marinobufagina); Zimosan; MBG (marinobufagina) + Zimosan. Cada grupo foi constituído por cinco animais (n=5), totalizando vinte e cinco animais por experimento. A partir da separação, os camundongos dos grupos MBG e MBG + Zimosan, foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais (i.p.) contendo 500 µL de marinobufagina na dose de 0,56 mg/kg. O grupo controle foi tratado apenas com salina, a fim de sofrerem o mesmo estresse ocasionado pela injeção dos grupos tratados com marinobufagina. E os animais do grupo DMSO, foram tratados com a mesma porcentagem de DMSO utilizada no grupo MBG.

Quadro 1. Distribuição dos grupos

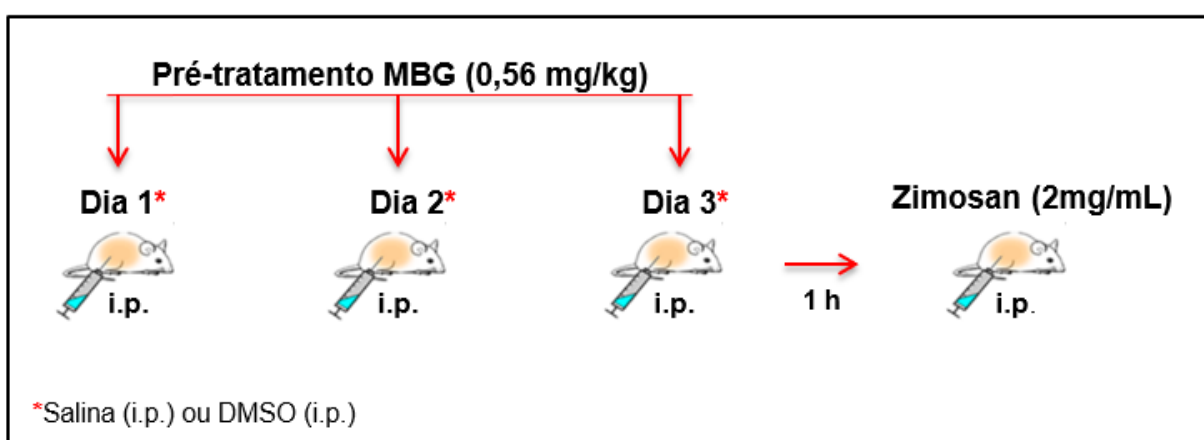
GRUPOS	TRATAMENTO (3 dias)	DESAFIO
Salina	Salina (i.p.)	-
DMSO	DMSO (i.p.)	-
MBG	MBG (i.p.)	-
Zimosan	-	Zimosan (i.p.)
MBG + Zimosan	MBG (i.p.)	Zimosan (i.p.)

Fonte: AUTOR, 2018. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais. Todos os grupos, exceto o grupo zimosan, receberam pré-tratamento por três dias consecutivos contendo 500 µL de marinobufagina ou salina ou DMSO. Os grupos zimosan e MBG + zimosan, foram desafiados com 500 µL de zimosan uma hora depois do último dia de pré-tratamento.

4.2.2 Peritonite induzida por zimosan

Com a finalidade de observar o efeito imunomodulador da marinobufagina no processo inflamatório agudo foi realizado o modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan (*Sigma-Aldrich*) (DOHERTY et al., 1985). Após uma hora do último dia de pré-tratamento com marinobufagina, os camundongos foram desafiados com 500 µL de zimosan na concentração 2 mg/mL, preparada em salina (0,9 %) estéril.

Figura 5. Esquema representativo do protocolo experimental *in vivo*



Fonte: AUTOR, 2018. Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de marinobufagina (0,56 mg/kg), salina ou DMSO. Uma hora após o último dia de pré-tratamento, os animais foram estimulados com zimosan (i.p.) na concentração de 2 mg/mL.

4.2.3 Coleta do lavado peritoneal

A coleta do lavado peritoneal foi realizada 4 horas após o desafio com zimosan. Os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical, e em seguida foi realizado o lavado, introduzido 3 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado por 30 segundos e em seguida, realizado a punção do exsudato peritoneal. O exsudato coletado foi transferido para tubos tipo eppendorf e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após o período de centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C para posterior dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

As células presentes nos *pellets* foram diluídas em azul de Turk (0,01% de cristal violeta em 3% de ácido acético) na proporção de 1:10 e contadas com auxílio da câmara de Neubauer para a determinação dos leucócitos totais. A leitura foi feita no microscópio óptico em objetiva de 40X (BX40, OLYMPUS).

4.2.4 Contagem diferencial de células do lavado peritoneal

Para contagem diferencial das células, 50 µL da suspensão de células do lavado peritoneal foram centrifugados na citocentrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400) a 1500 rpm por 10 minutos. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método de panótico. A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X). Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células. Mononucleares e polimorfonucleares foram identificados segundo coloração e características morfológicas.

4.2.5 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

Para quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi utilizado o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Esse é um dos métodos imunológicos mais utilizados para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentar grande sensibilidade e especificidade. Existem diversos tipos de ELISA, e nesse trabalho foi utilizado o ELISA sanduíche. Nesse método, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura é, inicialmente, adsorvido no poço da placa de 96 poços. Após isso, a amostra com o antígeno (lavado peritoneal) é adicionada e se liga a esse anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno, chamado anticorpo de detecção e em seguida, é adicionada a enzima, que irá reagir com o substrato adicionado, gerando cor. A intensidade da reação (cor mais fraca ou mais forte) é proporcional à quantidade de antígeno presente (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α presentes no exsudato peritoneal foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Para tal, as placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-IL-1 β , anti- IL-6 e anti- TNF- α , diluído em tampão fosfato pH 6.5 e incubadas por 18 hr (overnight) a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e adicionada tanto

às amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações da citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α para a realização das curvas. As placas foram novamente incubadas por 18 hrs (overnight) a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o anticorpo de detecção referente a cada citocina foi adicionado e em seguida incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionado. As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com a solução de parada (ácido fosfórico 1M) e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm.

4.2.6 Testes *in vitro*

Para a realização dos experimentos *in vitro*, utilizou-se dois estímulos: o zimosan e o lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli*), ambos obtidos na *Sigma Aldrich*. Em relação a marinobufagina, foram utilizadas as seguintes concentrações: 10 nM, 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM, as mesmas utilizadas nos experimentos com ouabaína *in vitro* (LEITE, 2012). Para tanto, foi preparada uma solução mãe na concentração de 1 mM em meio RPMI estéril, posteriormente, foram realizadas as diluições até chegar nas concentrações utilizadas.

4.2.6.1 Testes *in vitro* com o estímulo do zimosan

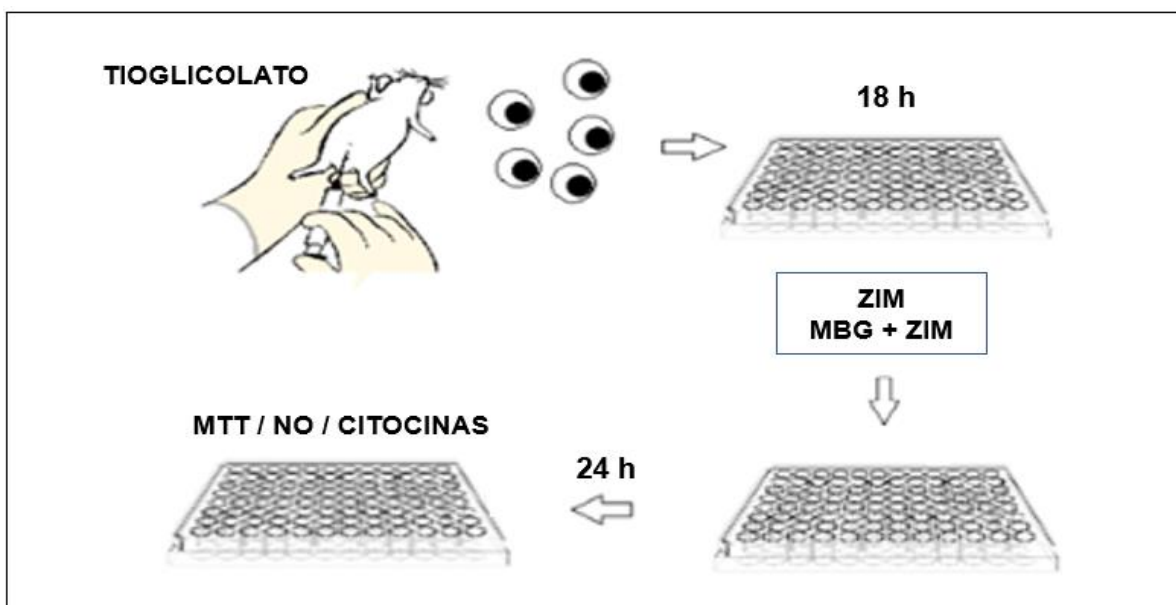
4.2.6.1.1 Cultura de macrófagos

Para realização dos experimentos *in vitro* foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos Swiss albino. Para isso, os animais foram estimulados previamente com uma injeção intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato (Sigma-Aldrich) a 4%. Quatro dias após o procedimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de meio PBS (salina tamponada com fosfato) gelado. A suspensão de células obtida a partir da lavagem peritoneal foi, em seguida, centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante, posteriormente, rejeitado e o pellet ressuspense em 2 mL de meio

RPMI-1640 completo (Gibco) (estreptomicina: 10 mg/mL, penicilina: 6 mg/ml, e canamicina: 2 mg/mL), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) (Gibco). A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante Azul de Tripan com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

As células peritoneais foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 4×10^5 células/poço em um volume final de 200 μ L e incubados overnight (18 h) com meio de cultura suplementado com SFB em estufa de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C). Em seguida, as células não aderentes foram removidas por aspiração e as células remanescentes foram estimuladas com zimosan na concentração de 0,2 mg/mL e tratadas com diferentes concentrações da marinobufagina (10 nM, 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM). Após 24 horas de cultura, as células foram utilizadas para o teste de viabilidade celular e o sobrenadante foi recolhido para quantificação dos níveis de NO e citocinas (Figura 6).

Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental *in vitro* com zimosan



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2014. Camundongos Swiss fêmeas foram estimulados com tioglicolato (4%). Após quatro dias, os macrófagos peritoneais foram cultivados em placa por um período de 18 h. Em seguida, realizou-se o estímulo com o zimosan (0,2 mg/mL) e os tratamentos nas diferentes concentrações com a marinobufagina. Após 24 h, as células foram utilizadas para realização do MTT e o sobrenadante para dosagem do óxido nítrico (NO) e das citocinas. MBG = Marinobufagina; ZIM=Zimosan;

4.2.6.1.2 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do método de MTT (brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-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). 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, foi adicionado à placa 90 µL de meio RPMI e 10 µL de MTT a 5 mg/mL e a mesma foi incubada por 4 h em estufa de CO₂. Após isso, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados. A viabilidade celular foi quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de placas.

4.2.6.1.3 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

A detecção do NO em amostras biológicas representa um desafio, em função da ínfima concentração e da meia-vida extremamente curta deste composto, cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos. Diversos métodos utilizando as mais avançadas tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente, através de ensaios que reflitam a sua presença (ARCHERS, 1993).

Neste trabalho, a produção de NO foi quantificada, *in vitro*, pela dosagem do seu produto de degradação mais estável, o nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como Reação de Griess (GREEN et al., 1982). O reagente de Griess é constituído por 0,1% naftiletilenodiamino e 1% sulfonamina p-aminobenzeno em ácido orto-fosfórico 5%. Para esse ensaio foram adicionados 50 µL de reagente de Griess a 50 µL dos sobrenadantes obtidos da cultura com macrófagos peritoneais murinos deixando reagir durante 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância de 540 nm foi determinada utilizando um leitor de placas. Os resultados em µmoles foram

determinados por comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 μM).

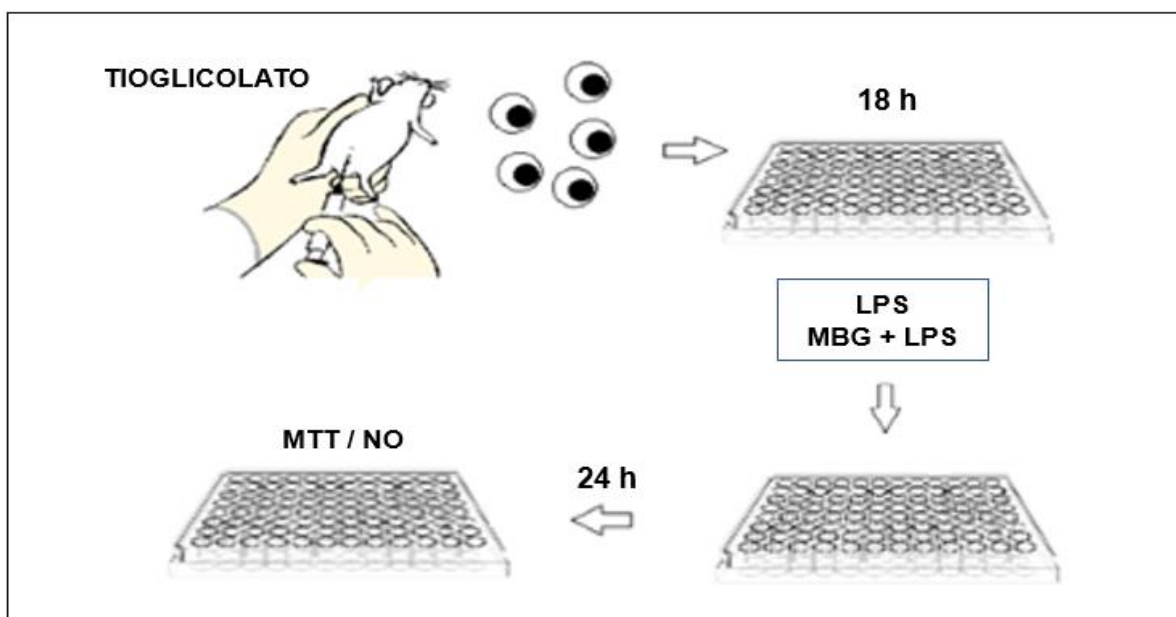
4.2.6.1.4 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

Esse ensaio foi realizado da mesma forma em que foi dosado o lavado peritoneal do experimento *in vivo*. As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.2.6.2 Testes *in vitro* com o estímulo do lipopolissacarídeo (LPS)

Para a realização dos testes *in vitro* com o estímulo do LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), foi utilizado o mesmo protocolo de cultura descrito anteriormente. Dessa forma, foi utilizado a cultura de macrófagos peritoneais e analisados a viabilidade celular e os níveis do óxido nítrico (Figura 7).

Figura 7. Esquema representativo do protocolo *in vitro* com LPS



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2014. Camundongos Swiss fêmeas foram estimulados com tioglicolato (4%). Após quatro dias, os macrófagos peritoneais foram cultivados em placa por um período de 18 h. Em seguida, realizou-se o estímulo com o LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e os tratamentos nas diferentes concentrações com a marinobufagina. Após 24 h, as células foram utilizadas para realização do MTT e o sobrenadante para dosagem do óxido nítrico (NO). MBG = Marinobufagina; LPS = Lipopolissacarídeo;

4.2.7 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e inicialmente, analisados empregando-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Após os dados passarem no teste de normalidade, foram avaliados pelo teste da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudo do efeito imunomodulador da marinobufagina *in vivo*

5.1.1 Avaliação da marinobufagina na migração celular peritoneal

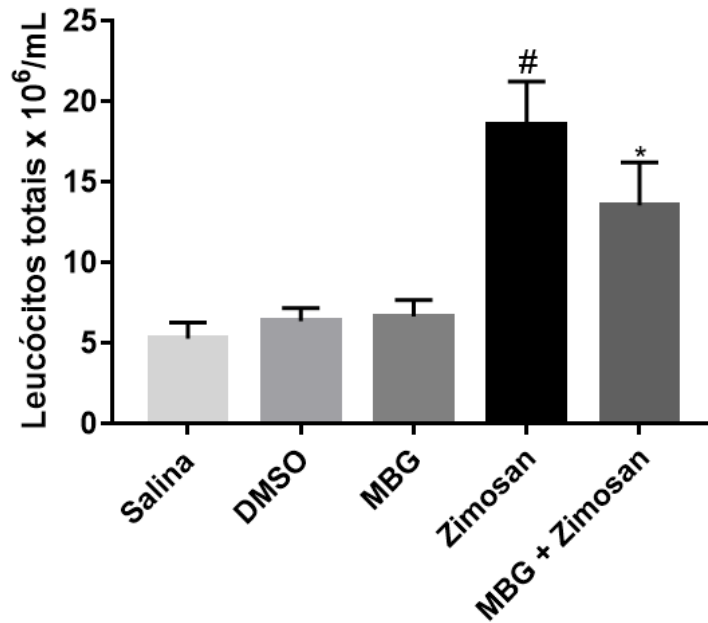
Os animais do grupo zimosan apresentaram aumento significativo na migração de leucócitos para o peritônio em relação ao grupo que recebeu apenas o veículo (grupo salina), demonstrando assim, a funcionalidade desse modelo. O pré-tratamento com a marinobufagina nos animais estimulados, foi capaz de reduzir em 27 % a migração dessas células para o peritônio comparado ao grupo zimosan. Além disso, os animais que foram pré-tratados apenas com o solvente (DMSO) e a substância (marinobufagina), não apresentaram diferenças no número de leucócitos totais em comparação ao grupo salina (Gráfico 1a).

Na análise das células diferenciais foi estudado os leucócitos polimorfonucleares e mononucleares. Quatro horas após o estímulo inflamatório (zimosan), os polimorfonucleares foram as células predominantes com 99 % no exsudato peritoneal em relação ao grupo salina. O pré-tratamento com a marinobufagina foi capaz de reduzir em 42 % a migração dessa população celular para o peritônio em comparação ao grupo zimosan (Gráfico 1b).

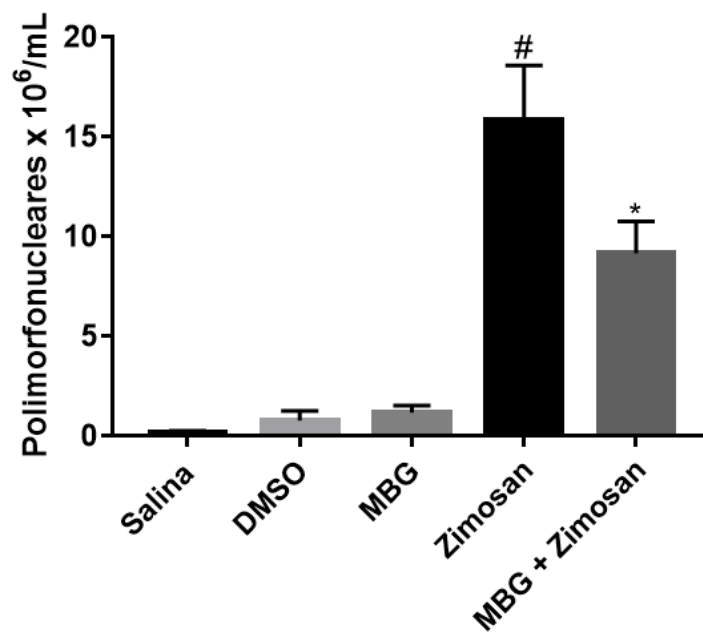
Em relação as células mononucleares, foi possível observar que os animais estimulados com zimosan apresentaram uma redução de 41 % no número dessas células em comparação com o grupo salina. O pré-tratamento com a marinobufagina nos animais estimulados, não interferiu no número dessas células mononucleares em comparação ao grupo zimosan (Gráfico 1c). Adicionalmente, os animais que foram pré-tratados apenas com o solvente (DMSO) e a substância (marinobufagina), não apresentaram diferenças no número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares em comparação ao grupo salina (Gráfico 1b e 1c).

Gráfico 1 – Efeito da marinobufagina na migração de leucócitos totais e diferenciais para o peritônio.

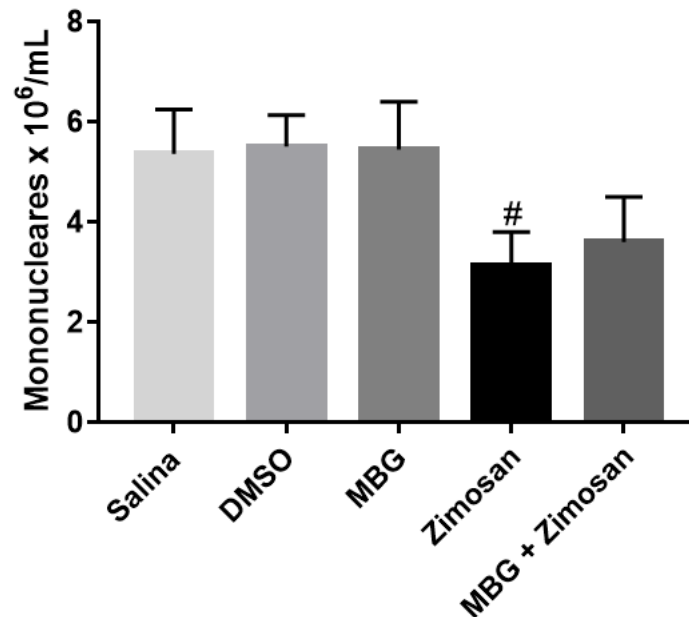
a.



b.



c.



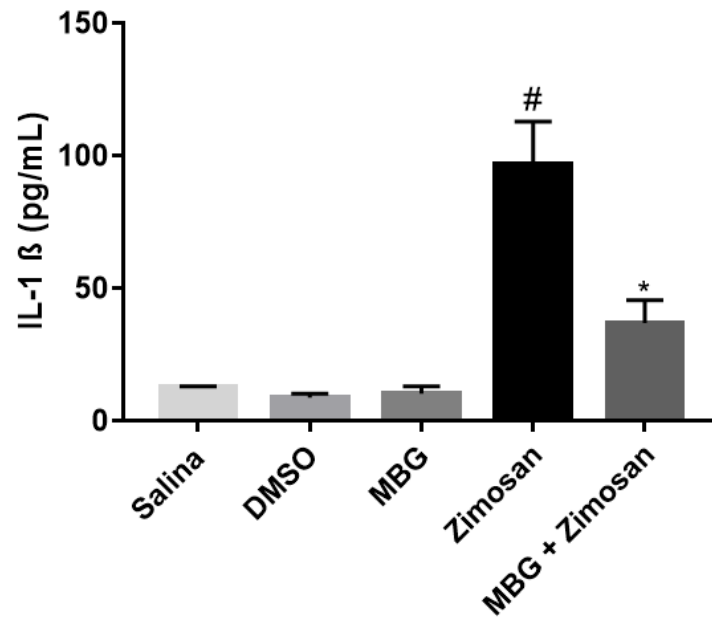
Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de marinobufagina (0,56 mg/kg), salina ou DMSO. Uma hora após o último dia de pré-tratamento, os animais foram estimulados com zimosan (i.p.) na concentração de 2 mg/mL. Quatro horas após o desafio com zimosan, o exsudato peritoneal foi coletado e o número de leucócitos totais e diferenciais foi avaliado. **a.** Número de leucócitos totais. **b.** Número de leucócitos polimorfonucleares. **c.** Número de leucócitos mononucleares. Os dados numéricos foram apresentados em média ± e.p.m de dois experimentos com n=5, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os resultados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p<0,05$) significativo em relação ao grupo salina. *($p<0,05$) significativo em relação ao grupo zimosan. DMSO= Dimetilsulfóxido; MBG= Marinobufagina.

5.1.2 Avaliação da marinobufagina sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias do exsudato peritoneal

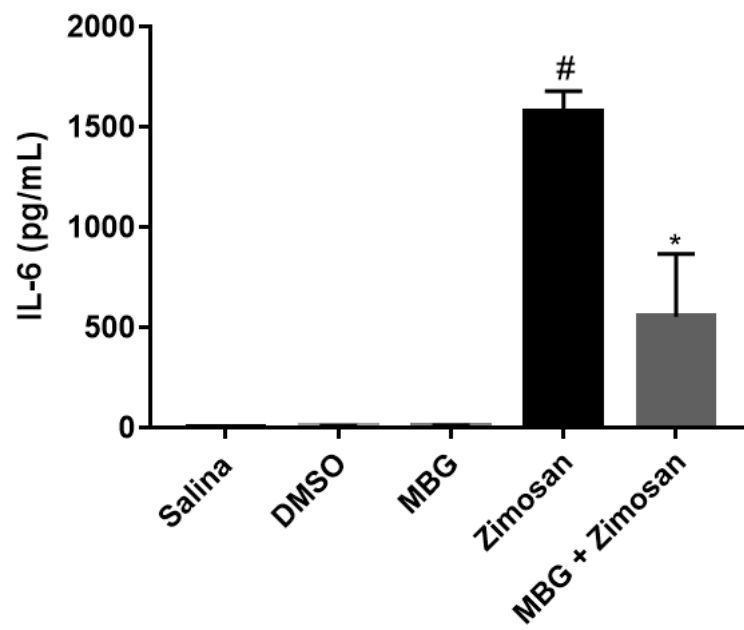
Os animais estimulados com zimosan apresentaram aumento significativo das três citocinas pró-inflamatórias analisadas, em comparação com o grupo controle (salina), de acordo com os dados encontrados na literatura (LEITE et al., 2015). O pré-tratamento com a marinobufagina nos animais desafiados com zimosan apresentaram redução nos níveis de IL-1 β (62 %) e IL-6 (64 %), mas não interferiu nos níveis da citocina TNF- α , em comparação ao grupo zimosan, como mostrado no gráfico 2 (a, b, c).

Gráfico 2 – Efeito da marinobufagina sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α do exsudato peritoneal

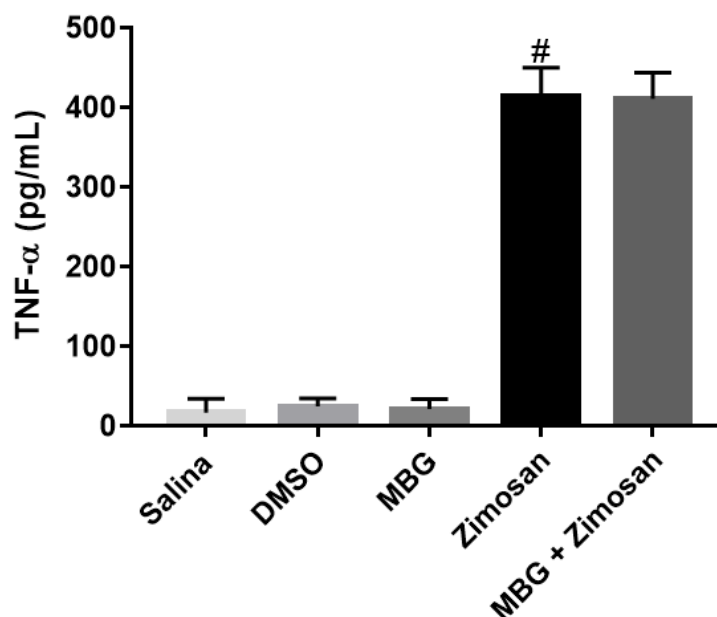
a.



b.



c.



Camundongos Swiss foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de marinobufagina (0,56 mg/kg), salina ou DMSO. Uma hora após o último dia de pré-tratamento, os animais foram estimulados com zimosan (i.p.) na concentração de 2 mg/mL. Quatro horas após o desafio com zimosan, o exsudato peritoneal foi coletado e centrifugado. Os níveis das citocinas foram quantificados a partir do sobrenadante do exsudato pelo ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche). **a.** IL-1 β . **b.** IL-6. **c.** TNF- α . Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de dois experimentos com $n=3$, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os resultados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feita a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. [#]($p<0,05$) significativo em relação ao grupo salina. ^{*}($p<0,05$) significativo em relação ao grupo zimosan. DMSO= Dimetilsulfóxido; MBG= Marinobufagina.

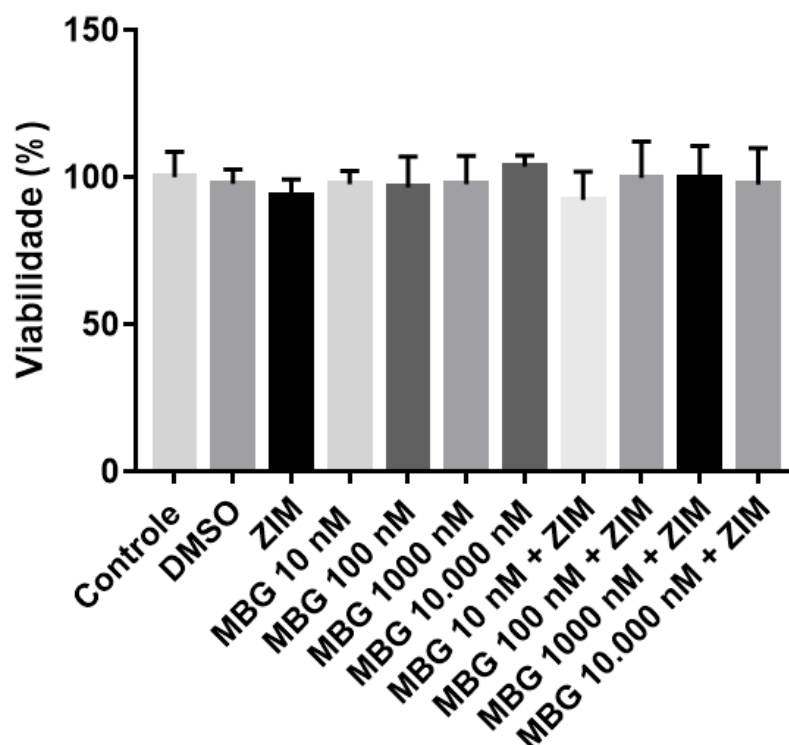
5.2 Estudo do efeito imunomodulador da marinobufagina *in vitro*

5.2.1 Avaliação *in vitro* com o estímulo do zimosan:

5.2.1.1 Citotoxicidade da marinobufagina em macrófagos peritoneais

Como mostrado no gráfico 3, os macrófagos peritoneais tratados com a marinobufagina, na ausência ou presença de zimosan, não demonstraram alteração da viabilidade celular nas diferentes concentrações da substância (10 nM, 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), quando em comparação ao grupo controle (meio de cultura).

Gráfico 3 – Efeito da marinobufagina na viabilidade de macrófagos peritoneais com ou sem o estímulo do zimosan

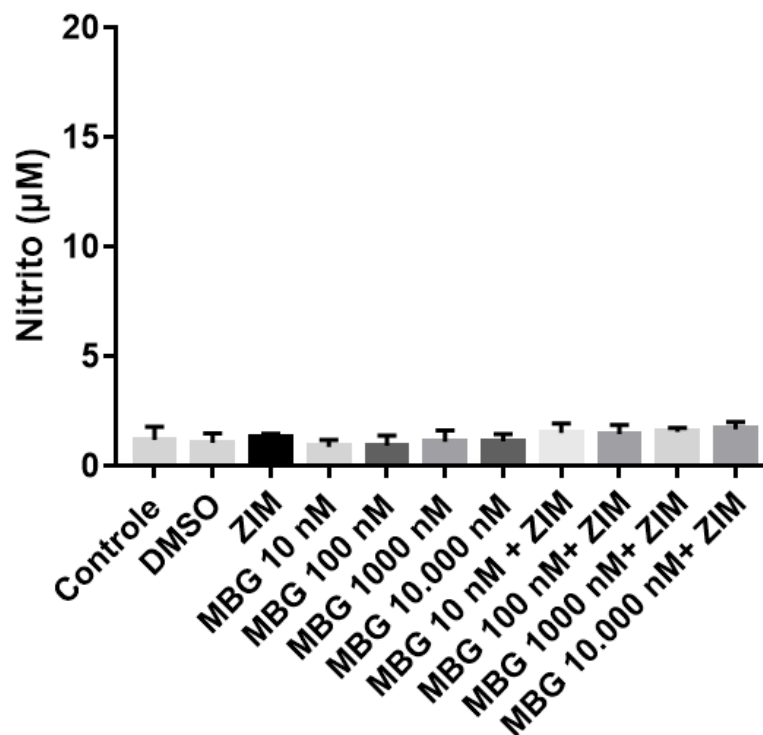


As células foram tratadas com a marinobufagina em diferentes concentrações (10 nM, 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 µL de MTT. Após 4h, foi utilizado o DMSO para solubilizar os cristais de formazan. O gráfico representa a densidade óptica de absorbância do formazan de acordo com os diferentes grupos de tratamento. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de dois experimentos em triplicata com $n=3$, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os dados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. DMSO= Dimetilsulfóxido; ZIM=Zimosan; MBG= Marinobufagina.

5.2.1.2 Produção de óxido nítrico na cultura de macrófagos peritoneais

De acordo com os nossos dados, foi observado que o zimosan não foi capaz de estimular os macrófagos peritoneais a produzir o óxido nítrico. Dessa forma, todos os grupos apresentaram níveis basais da produção do NO, em comparação com o grupo controle (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Níveis de NO na cultura de macrófagos peritoneais com o estímulo do zimosan



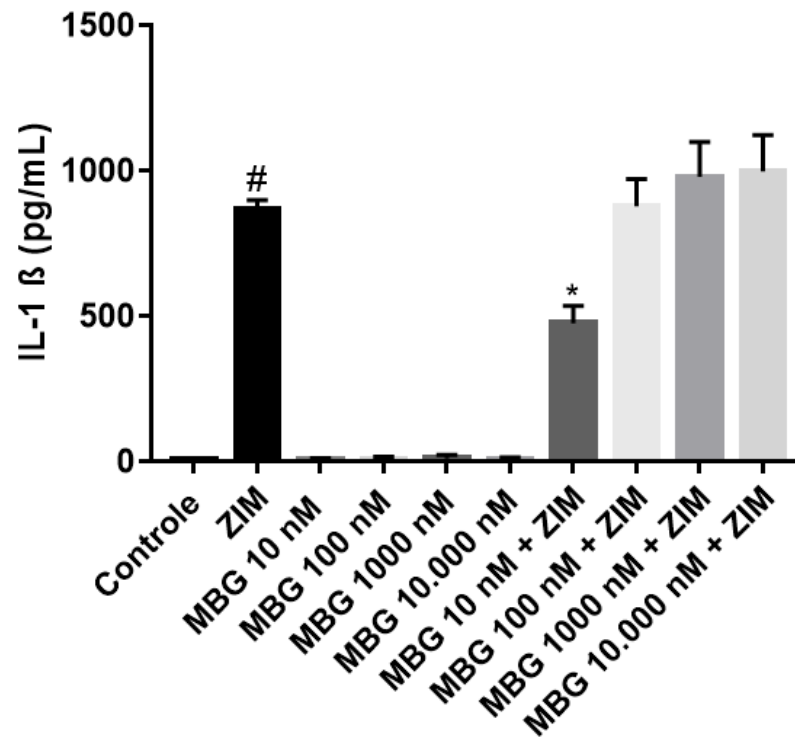
As células foram tratadas com a marinobufagina em diferentes concentrações (10 nM, 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado para análise da produção do NO pelo método de Griess. O gráfico representa as concentrações de nitrito de acordo com os grupos de tratamento. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de dois experimentos em triplicata com $n=3$, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os dados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. DMSO= Dimetilsulfóxido; ZIM= Zimosan; MBG= Marinobufagina.

5.2.1.3 Níveis de citocinas pró-inflamatórias na cultura de macrófagos

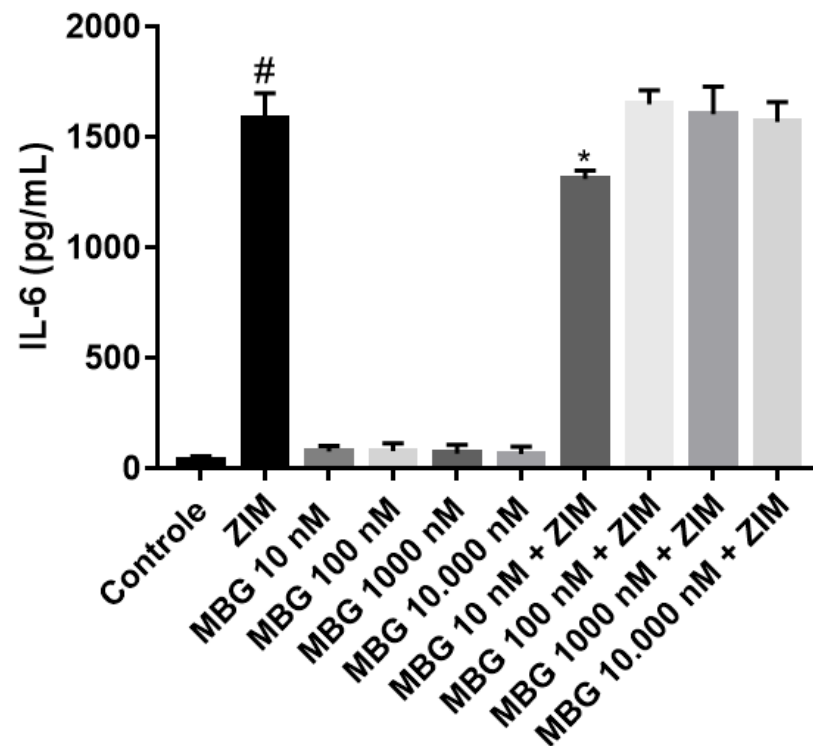
Os animais estimulados com zimosan apresentaram aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , em comparação com o grupo controle. O tratamento com a marinobufagina apenas na menor concentração (10 nM) foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β (45 %), IL-6 (17 %) e TNF- α (20 %), em relação ao grupo zimosan. As demais concentrações não alteraram os níveis dessas citocinas em comparação ao grupo zimosan, como mostrado no gráfico 5 (a, b, c).

Gráfico 5 – Efeito da marinobufagina sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na cultura de macrófagos peritoneais

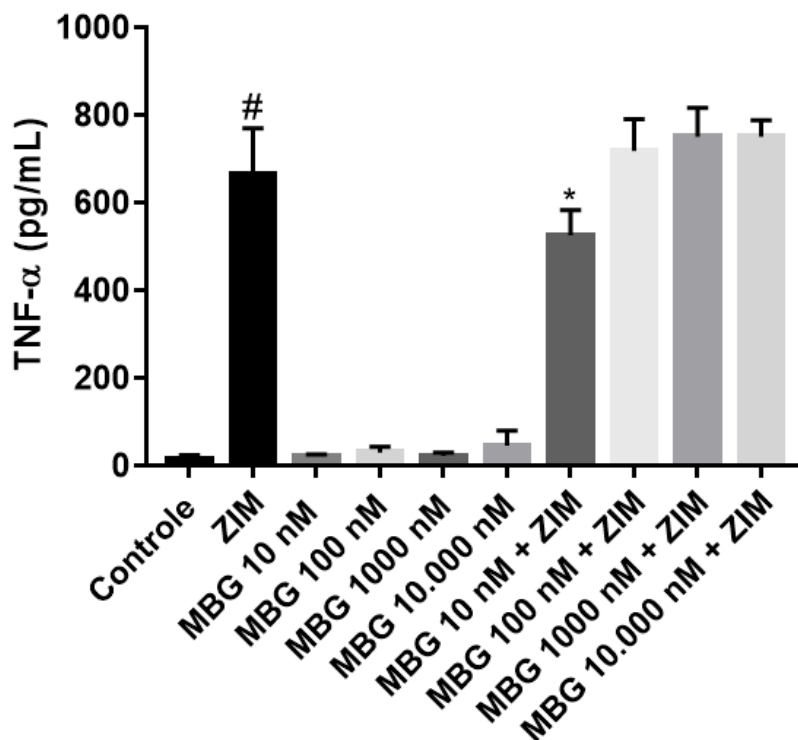
a.



b.



c.



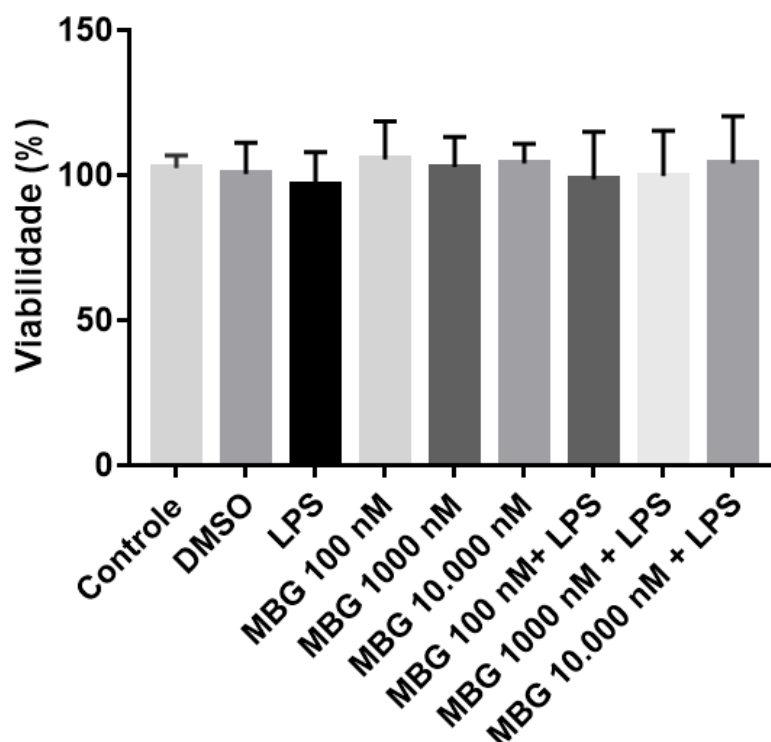
As células foram tratadas com a marinobufagina em diferentes concentrações (10 nM, 100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e os níveis das citocinas foram quantificados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche). **a.** IL-1 β . **b.** IL-6. **c.** TNF- α . Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de dois experimentos com $n=3$, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os resultados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p<0,05$) significativo em relação ao grupo controle. *($p<0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. ZIM= Zimosan; MBG= Marinobufagina.

5.2.2 Avaliação *in vitro* com o estímulo do lipopolissacarídeo (LPS):

5.2.2.1 Citotoxicidade da marinobufagina em macrófagos peritoneais

Como mostrado no gráfico 6, os macrófagos peritoneais tratados com a marinobufagina, na ausência ou presença de LPS, não demonstraram alteração da viabilidade celular nas diferentes concentrações da substância (100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), quando em comparação ao grupo controle (meio de cultura).

Gráfico 6 – Efeito da marinobufagina na viabilidade de macrófagos peritoneais com ou sem o estímulo do LPS

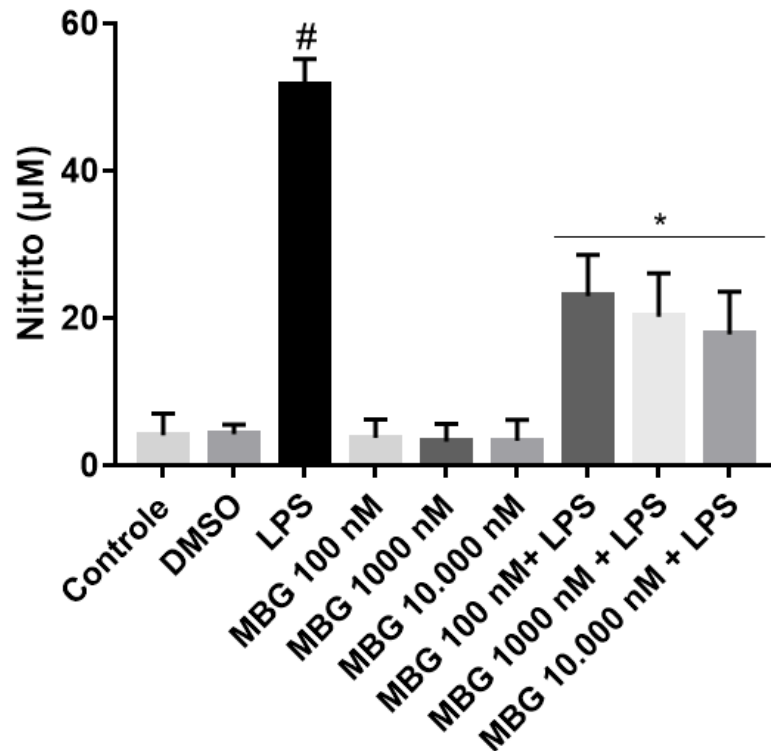


As células foram tratadas com a marinobufagina em diferentes concentrações (100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), na ausência ou presença de LPS por 24h. Após incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 µL de MTT. Após 4h, foi utilizado o DMSO para solubilizar os cristais de formazan. O gráfico representa a densidade óptica de absorbância do formazan de acordo com os diferentes grupos de tratamento. Os dados numéricos foram apresentados em média ± e.p.m. de quatro experimentos em triplicata com n=2, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os dados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feita a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. DMSO= Dimetilsulfóxido; LPS=Lipopolissacarídeo; MBG= Marinobufagina.

5.2.2.2 Produção de óxido nítrico na cultura de macrófagos peritoneais

De acordo com os nossos dados, foi observado que os macrófagos peritoneais estimulados com o LPS (1 µg/mL) foram ativados, pois aumentaram a produção de NO em comparação com o grupo controle, demonstrando a funcionalidade do modelo. O tratamento com a marinobufagina nas concentrações de 100 nM, 1000 nM e 10.000 nM foram capazes de reduzir 55 %, 61 %, 70 % os níveis desse mediador em relação ao grupo LPS, respectivamente. Além disso, o tratamento apenas com a substância, na ausência do LPS, e o grupo DMSO, não alteraram os níveis da produção basal do NO, em comparação ao grupo controle (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Efeito da marinobufagina nos níveis de NO em macrófagos peritoneais com o estímulo do LPS



As células foram tratadas com a marinobufagina em diferentes concentrações (100 nM, 1.000 nM e 10.000 nM), na ausência ou presença de LPS por 24h. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado para análise da produção do NO pelo método de Griess. O gráfico representa as concentrações de nitrito de acordo com os grupos de tratamento. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de três experimentos em triplicata com $n=2$, e analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Todos os dados passaram nesse teste de normalidade e após isso, foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p<0,05$) significativo em relação ao grupo controle. *($p<0,05$) significativo em relação ao grupo LPS. DMSO= Dimetilsulfóxido; LPS=Lipopolissacarídeo; MBG= Marinobufagina.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou pela primeira vez o papel do esteroide cardiotônico marinobufagina no processo inflamatório agudo *in vivo* e *in vitro*. Demonstrou-se que, essa substância possui atividade imunomoduladora, pois foi capaz de modular negativamente alguns parâmetros da resposta inflamatória, incluindo migração celular, citocinas pró-inflamatórias e o mediador óxido nítrico (NO).

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foi utilizado como base o trabalho do nosso grupo: Leite et al. (2015), onde se analisou o papel da ouabaína na inflamação aguda. Dessa forma, para realizar uma comparação entre os efeitos desse esteroide e da marinobufagina, foi utilizada a mesma dose e o mesmo protocolo de peritonite.

A peritonite induzida por zimosan foi primeiramente descrita por Doherty (1985), como um modelo de inflamação aguda caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular e produção de mediadores que levam ao acúmulo de leucócitos no peritônio. Desde então, muitos aspectos dessa inflamação têm sido descritos em detalhes, confirmando a utilidade e eficácia desse modelo (KOLACZKOWSKA et al., 2008). Dessa forma, vários trabalhos vêm utilizando a peritonite com a finalidade de identificar novos mediadores e vias envolvidas na inflamação, como também, é utilizado para testar compostos anti-inflamatórios e entender seus respectivos mecanismos de ação (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

O zimosan é um componente polissacarídeo encontrado na parede celular de fungos *Saccharomyces cerevisiae* e é composto por repetidas unidades de glicose conectadas por ligações β -1,3 glicosílicas (SATO et al., 2003). As células do sistema imunológico reconhecem esse composto via receptor do tipo Toll 2 (TLR 2) e detectina-1. A ativação desses receptores induz uma cascata de sinalização celular que promove o desencadeamento de uma resposta inflamatória, pela síntese de vários mediadores como, quimiocinas, citocinas, prostaglandinas e leucotrienos (REID; GOW; BROWN, 2009). Dessa forma, a injeção de zimosan na cavidade peritoneal permite a análise de uma grande quantidade de mediadores (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

Neste modelo, nossos resultados demonstraram que a injeção de zimosan induziu intensa migração celular para a cavidade peritoneal e, por sua vez, o pré-

tratamento da marinobufagina foi capaz de reduzir a migração desses leucócitos para o peritônio inflamado (Gráfico 1a). Esse dado corrobora o trabalho do nosso grupo, no qual foi evidenciado a redução da migração celular pela ouabaína (LEITE et al., 2015).

Uma vez observado que a marinobufagina foi capaz de reduzir o número total de leucócitos, avaliamos quais subpopulações celulares estavam presentes no exsudato peritoneal. Já é bem descrito na literatura que a administração de zimosan (i.p.) produz extravasamento de leucócitos para o peritônio, seguindo o perfil típico de uma resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a cavidade peritoneal e a partir de duas horas após o estímulo, começam a ser detectados no peritônio com um pico em quatro horas. Por esse motivo, o exsudato peritoneal foi coletado quatro horas após a injeção de zimosan (CASH; WHITE; GREAVES, 2009; KOLACZKOWSKA et al., 2008).

Nossos resultados evidenciaram que as células predominantes nesse modelo foram os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e que o pré-tratamento por três dias consecutivos com a marinobufagina, foi capaz de reduzir a migração desse tipo celular para a cavidade peritoneal (Gráfico 1b). Esse dado corrobora vários trabalhos do nosso grupo em relação a ouabaína. No modelo de peritonite induzido por concanavalina – A (DE VASCONCENLOS et al., 2011), *Leishmania amazonensis* (JACOB et al., 2013) e zimosan (LEITE et al., 2015), o pré-tratamento com ouabaína foi capaz de reduzir a migração dessas células polimorfonucleares. Além disso, foi constatado também redução da migração dessas células para o lavado broncoalveolar, no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS (SILVA, 2016) e no modelo de asma alérgica induzido por ovalbumina (OVA) (GALVÃO et al., 2017).

Em estudo com células CTB (citotrofoblásticas) e CHO (células derivadas do ovário de hamster chinês), demonstrou-se que a marinobufagina em baixas concentrações foi capaz de reduzir a migração dessas células no ensaio *in vitro* de transwell. Esse efeito foi relacionado a capacidade desse esteroide em atenuar a atividade da MAPK ERK1/2 (UDDIN et al., 2007). Sabe-se que a via da ERK 1/2 está envolvida na proliferação e motilidade celular (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1997). Dessa forma, sugere-se que a ação da marinobufagina na migração de neutrófilos possa estar envolvido na capacidade desse esteroide em interferir na atividade dessa quinase. Além disso, a marinobufagina demonstra ação vasoconstrictora em artérias pulmonares e mesentéricas humanas (BAGROV; FEDOROVA, 1998). Assim, sugere-

se que essa substância reduziu a permeabilidade vascular e contribuiu na atenuação da migração dos neutrófilos para o peritônio.

Os neutrófilos são células capazes de eliminar patógenos por múltiplos mecanismos como, fagocitose, degranulação e através das NETs (armadilhas extracelulares dos neutrófilos). A ativação desregulada dessa célula resulta em dano tecidual no hospedeiro, contribuindo para inflamações persistentes como, obesidade (KORDONOWY et al., 2012) e diabetes (VANDANMASGAR et al., 2011). Portanto, a redução da migração desse tipo celular para o sítio inflamado, parece ser uma estratégia crucial para evitar a conservação da inflamação (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2012; SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003).

Além dos neutrófilos, as células residentes no peritônio determinam papel crucial no processo inflamatório. As principais células residentes na cavidade peritoneal são os macrófagos. A ativação dessas células, resulta no aumento da permeabilidade vascular, através da liberação de prostaglandinas e leucotrienos (LEITE et al., 2007). Além disso, liberam citocinas e quimiocinas essenciais para o extravasamento de células, como também, produzem outros mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório (KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001).

De acordo com Ajuebor (1998), a injeção com zimosan causa uma redução inicial no número de macrófagos peritoneais. Esse fenômeno é descrito como reação de desaparecimento dos macrófagos, e é devido possivelmente a ativação dessas células e consequente aumento de sua aderência nas camadas internas do peritônio. Esse evento foi observado em nosso resultado, no qual os animais estimulados com o zimosan apresentaram redução no número de células mononucleares presentes no exsudato peritoneal. O pré-tratamento com a marinobufagina nos animais estimulados não foi capaz de interferir nesse processo (Gráfico 1c). Esse dado demonstra que a marinobufagina não interferiu na ativação dos macrófagos residentes estimulados por zimosan, e corrobora o dado encontrado pelo nosso grupo, no qual a ouabaína também não alterou esse processo (LEITE et al., 2015).

Já é bem descrito que no modelo de peritonite induzida por zimosan, o recrutamento de leucócitos e a manutenção da inflamação envolve citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001; KOLACZKOWSKA et al., 2010; LEITE et al., 2015). Nossos dados demonstraram que a injeção com zimosan estimulou a produção dessas três citocinas

pró-inflamatórias. Por sua vez, o tratamento com a marinobufagina foi capaz de reduzir os níveis da IL-1 β e IL-6 presentes no exsudato peritoneal (Gráfico 2a e b). Porém, não interferiu nos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Gráfico 2c). Nesse mesmo modelo, Leite et al. (2015), descreveu que a ouabaína também foi capaz de reduzir a IL-1 β . No entanto, esse esteroide apresentou redução sobre os níveis de TNF- α , sem interferir nos níveis da IL-6. Portanto, em relação ao TNF- α e a IL-6, a marinobufagina demonstrou efeito contrário ao da ouabaína.

Essa distinção na modulação de citocinas entre a marinobufagina e ouabaína, possivelmente não está relacionada à diferença de classe entre esses esteroides, pois estudos com a ouabaína (cardenolido) e a bufalina (bufadienolido) demonstraram uma modulação de forma semelhante das mesmas citocinas. No modelo de lesão pulmonar aguda induzido por LPS e em modelo *in vitro*, a ouabaína foi capaz de reduzir as três citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) (SILVA, 2016; SHAH et al., 2011). Em relação a marinobufagina, não há estudos sobre o seu papel na inflamação. No entanto, no modelo de edema de pata induzido por carragenina utilizando a bufalina, foi observado que esse bufadienolido apresentou a mesma capacidade que a ouabaína em reduzir as mesmas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α (WEN et al., 2014). Portanto, de acordo com esses estudos, a diferença de classe entre cardenolidos e bufadienolidos, não interferiu no perfil de modulação dessas citocinas por esses esteroides. Dessa forma, os resultados encontrados entre a marinobufagina e a ouabaína nesse trabalho, pode estar relacionado a outras diferenças estruturais.

A marinobufagina possui número menor de hidroxilas quando comparada com a ouabaína, além disso, não possui grupamento açúcar no carbono 3 (C3) e apresenta um grupamento epóxido entre C14 e C15 (éter cíclico com três átomos) em sua estrutura (TOUZA, 2011). Diante disso, sugere-se que essa distinção estrutural entre a marinobufagina e a ouabaína, possa ter acarretado uma sinalização celular através de vias diferentes e gerado essa mudança no perfil de modulação dessas citocinas. Além disso, é importante notar que a marinobufagina é em torno de 10 vezes menos potente que a ouabaína quanto à inibição da Na⁺/K⁺-ATPase. Em roedores, foi demonstrado que para todas as isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase presentes em órgãos do sistema imunológico (α 1, α 2 e α 3), o IC₅₀ para as isoformas α 2 e α 3 é em torno de 120 nM para a ouabaína e 890 nM para a marinobufagina, e para a isoforma mais abundante, α 1, é de 90 μ M para a ouabaína enquanto que não foi possível estimar a

da marinobufagina, já que na concentração máxima possível para o experimento de inibição enzimática, 100 μ M, praticamente não houve inibição (TOUZA, 2011). Portanto, propõe-se que tais diferenças de potência/afinidade sejam importantes para os diferentes efeitos *in vivo* observados neste estudo, seja via inibição quanto sinalização mediada pela Na^+/K^+ -ATPase.

A ativação do receptor Toll 2 (TLR2) induz uma cascata de sinalização celular que envolve a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e fatores de transcrição, como o NF- κ B. Esses fatores, através da transcrição gênica, induzem a expressão de vários mediadores, incluindo citocinas pró-inflamatórias (PAN et al., 2017). Sabe-se que a ativação da via ERK1/2 é capaz de estimular a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α (CHEN et al., 2018; TANG et al., 2018) e que a marinobufagina demonstrou habilidade em atenuar a atividade dessa quinase, em células citotrofoblasticas (UDDIN et al., 2007). Dessa forma, sugere-se que a redução das citocinas IL-1 β e IL-6 pela ação da marinobufagina demonstrada nesse trabalho, possa estar relacionado a atenuação na atividade da MAPK ERK 1/2.

Durante a fase aguda da inflamação, as células residentes reconhecem o antígeno e liberam mediadores, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o TNF- α . Essas citocinas, por sua vez, ativam as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, tais como, ICAM-1 e VCAM-1, e também estimulam a produção da IL-6; levando ao recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado (ABBAS; LICHTMAN, 2012; SCHELLER et al., 2011). Dessa forma, a diminuição nos níveis da IL-1 β e IL-6 pela marinobufagina, possivelmente está relacionada com a capacidade desse esteroide em reduzir a migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal, observada nesse trabalho.

A peritonite induzida por zimosan representa um modelo de inflamação aguda, pela qual desencadeia uma sequência de eventos inflamatórios. A ativação de macrófagos residentes, promove a liberação de mediadores que culminam no aumento da permeabilidade vascular e da migração leucocitária, principalmente neutrofílica. Essas células no sítio inflamado, são capazes de sintetizar diversos mediadores envolvidos na inflamação, como as citocinas pró-inflamatórias. Diante disso, nossos resultados demonstraram que a marinobufagina foi capaz de atenuar a migração celular, pela redução neutrofílica e além disso, diminuir os níveis das interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6). Portanto, esses dados evidenciam um papel anti-inflamatório da marinobufagina *in vivo*.

Após a avaliação do efeito da marinobufagina no modelo de peritonite, esse esteroide foi analisado em modelo *in vitro*. Para isso, utilizou-se como base o trabalho do nosso grupo: Leite (2012), onde se analisou o papel da ouabaína em cultura de macrófagos peritoneais. Adicionalmente, o presente trabalho utilizou as mesmas concentrações nanomolares testadas com a ouabaína, a fim de realizar uma comparação entre esses esteroides.

Na cavidade peritoneal, os macrófagos residentes são divididos em duas subpopulações: macrófagos peritoneais grandes (CD11b⁺ F4/80⁺) e macrófagos peritoneais pequenos (CD11b⁻ F4/80⁻ MHC-II⁺). A subpopulação de macrófagos grandes é predominante em condições de homeostasia e desaparecem rapidamente após estímulos. A segunda subpopulação, referente aos macrófagos peritoneais pequenos, predomina após estimulação. Essas células são derivadas de monócitos sanguíneos, nos quais entram na cavidade peritoneal a partir de um estímulo e se maturam no peritônio de dois a quatro dias. Por isso, em nossa metodologia, o lavado peritoneal é coletado quatro dias depois do estímulo com tioglicolato. Os macrófagos peritoneais pequenos controlam infecções, enquanto os macrófagos grandes mantêm a fisiologia da cavidade peritoneal (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI, 2015).

Inicialmente, os macrófagos peritoneais foram utilizados para a análise da citotoxicidade da marinobufagina. Nosso resultado demonstrou que o tratamento desse esteroide com o estímulo do zimosan ou não, foi capaz de manter as células viáveis em todas as concentrações testadas (Gráfico 3). Esse resultado corrobora nossos dados com a ouabaína, no qual esse esteroide também não alterou a viabilidade dos macrófagos (LEITE, 2012). Vários estudos demonstram que esteroides cardiotônicos em altas concentrações são capazes de induzir apoptose via inibição da Na⁺/K⁺-ATPase. No entanto, em concentrações nanomolares, esses esteroides induzem proteção contra a apoptose (DE REZENDE CORREA et al., 2005; FONTANA et al., 2013; LI et al., 2006). Dessa forma, neste trabalho os efeitos da marinobufagina parecem ser independentes de morte celular.

Após a análise da viabilidade, realizou-se a quantificação dos níveis do óxido nítrico e observou-se que o zimosan não foi capaz de estimular a produção desse mediador (Gráfico 4). De acordo com a literatura, no modelo de peritonite, esse estímulo induz a produção do óxido nítrico pelo aumento da expressão da iNOS (CUZZOCREA et al., 1997; TSUDA; HORIO; OSAWA, 2002). No entanto, em estudos com cultura de macrófagos foi observado que o zimosan sozinho, não é capaz de

estimular os níveis desse mediador. Porém, se o zimosan for adicionado com o IFN- γ , essas células são capazes de liberar o NO, via aumento da expressão da iNOS (ASSREUY et al., 1994; CORREA et al., 2016; WU et al., 2017). Dessa forma, no presente trabalho, não foi possível analisar o efeito da marinobufagina nos níveis do NO em cultura de macrófagos peritoneais estimuladas apenas com o zimosan.

O zimosan é reconhecido via receptor toll 2 (TLR2) e detectina-1. Esse reconhecimento resulta na ativação de MAPKs, tais como, ERK 1/2 e ativação de fatores de transcrição, os quais estimulam a expressão gênica de vários mediadores, incluindo as citocinas pró-inflamatórias (PAN et al., 2017). Nossos resultados demonstraram que a estimulação com o zimosan foi capaz de aumentar os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , *in vitro*. E por sua vez, o tratamento da marinobufagina apenas na menor concentração (10 nM) demonstrou habilidade em reduzir as três citocinas estimuladas pelo zimosan (Gráfico 5). Dessa forma, esse resultado demonstra que a marinobufagina é capaz de modular as citocinas pró-inflamatórias *in vitro*. Esse efeito pode estar relacionado com a capacidade desse esteroide em atenuar a atividade da MAPK ERK 1/2, descrita em células citotrofoblasticas (UDDIN et al., 2007).

O zimosan, nesse modelo *in vitro*, não foi capaz de estimular os macrófagos a produzirem o óxido nítrico. Dessa forma, realizou-se a cultura de macrófagos estimulada por lipopolissacarídeo, com a finalidade de analisar o efeito da marinobufagina nos níveis do NO. Na literatura é descrito que o LPS é capaz de aumentar a produção desse mediador em cultura de macrófagos (XIAOLONG et al., 2014).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina liberada por bactérias Gram-negativas. Esse componente está presente na parede celular dessas bactérias e é reconhecido pelo receptor do tipo toll 4 (TLR4) na superfície celular dos macrófagos. Esta interação LPS-TLR4, resulta na ativação de uma sinalização intracelular através principalmente da proteína MyD88 (ADEREM; ULEVITCH, 2000; TAKEDA; AKIRA, 2005). Essa, por sua vez, leva a ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e translocação de fatores de transcrição, os quais induzem a expressão de vários mediadores como, o NO (XIAOLONG et al., 2014). O NO e as demais espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, possuem papel fisiológico importante para o hospedeiro. Esses mediadores estão associados à capacidade antimicrobiana dos leucócitos e participam diretamente do processo inflamatório pois,

estão envolvidos em dano celular/tecidual e ativação de diversas vias inflamatórias (FARO et al., 2014; HENSLEY; FLOYD, 2002).

Nossos resultados evidenciaram que o estímulo do LPS aumentou a liberação de NO em macrófagos peritoneais. Por sua vez, o tratamento com a marinobufagina em todas as concentrações, foi capaz de reduzir a produção desse mediador nos macrófagos estimulados por LPS (Gráfico 7). Esse resultado, demonstra que a marinobufagina possui capacidade em modular NO *in vitro*. Dessa forma, sugere-se que esse efeito pode estar relacionado à redução na atividade da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS). No mesmo modelo, Leite (2012) demonstrou que a ouabaína não foi capaz de alterar a produção desse mediador. Assim, é sugerido que essa diferença na modulação do NO pela marinobufagina e ouabaína, possivelmente está relacionada à diferença estrutural existente entre esses dois esteroides.

Assim como no estímulo do zimosan, nossos resultados evidenciaram que o tratamento da marinobufagina com o estímulo do LPS, foi capaz de manter as células viáveis em todas as concentrações testadas (Gráfico 6). Esses dados demonstram, mais uma vez, que os efeitos da marinobufagina parecem ser independentes de morte celular.

Diante desses dados, em modelo *in vitro* a marinobufagina evidenciou potencial anti-inflamatório, por modular negativamente o óxido nítrico e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Adicionalmente, nesse modelo foi demonstrado que esse esteroide não apresenta atividade citotóxica.

Como discutido acima, a marinobufagina apresenta potência inibitória sobre a Na⁺/K⁺-ATPase menor do que a ouabaína. Em geral, os cardenolidos sem a porção osídica (agliconas) são menos potentes que aqueles com a porção açúcar (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Entretanto, para os bufadienolidos, que não contém porção osídica, há uma gama de potências que vão desde, por exemplo, a bufalina, que apresenta potência inibitória comparável à ouabaína, até outros, como a marinobufagina, com potência bem menor (TOUZA et al., 2010; TOUZA, 2011; PERERA-CORDOVA et al., 2016). Apesar disso, sugere-se que essa potência inibitória não tenha influenciado o efeito global, pois a marinobufagina demonstrou potencial anti-inflamatório similar ao da ouabaína. Entretanto, as sutis diferenças observadas devem ser mais bem investigadas quanto ao seu mecanismo de ação, mas parece claro que, pelas concentrações utilizadas neste trabalho, a inibição da Na⁺/K⁺-ATPase seja menos relevante que a indução de cascatas de sinalização

intracelular (HAAS; ASKARI; XIE, 2000; HAAS et al., 2002). Assim, a nossa hipótese é que esses esteroides se ligam na bomba e induzam uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação ou atenuação de vias envolvidas no processo inflamatório.

Portanto, este trabalho demonstrou pela primeira vez o papel do esteroide cardiotônico marinobufagina no sistema imunológico, evidenciando a sua ação na inflamação aguda em modelo *in vivo* e *in vitro*. Dessa forma, este estudo contribui para o melhor entendimento da função dos esteroides cardiotônicos na fisiologia do corpo humano.

CONCLUSÃO

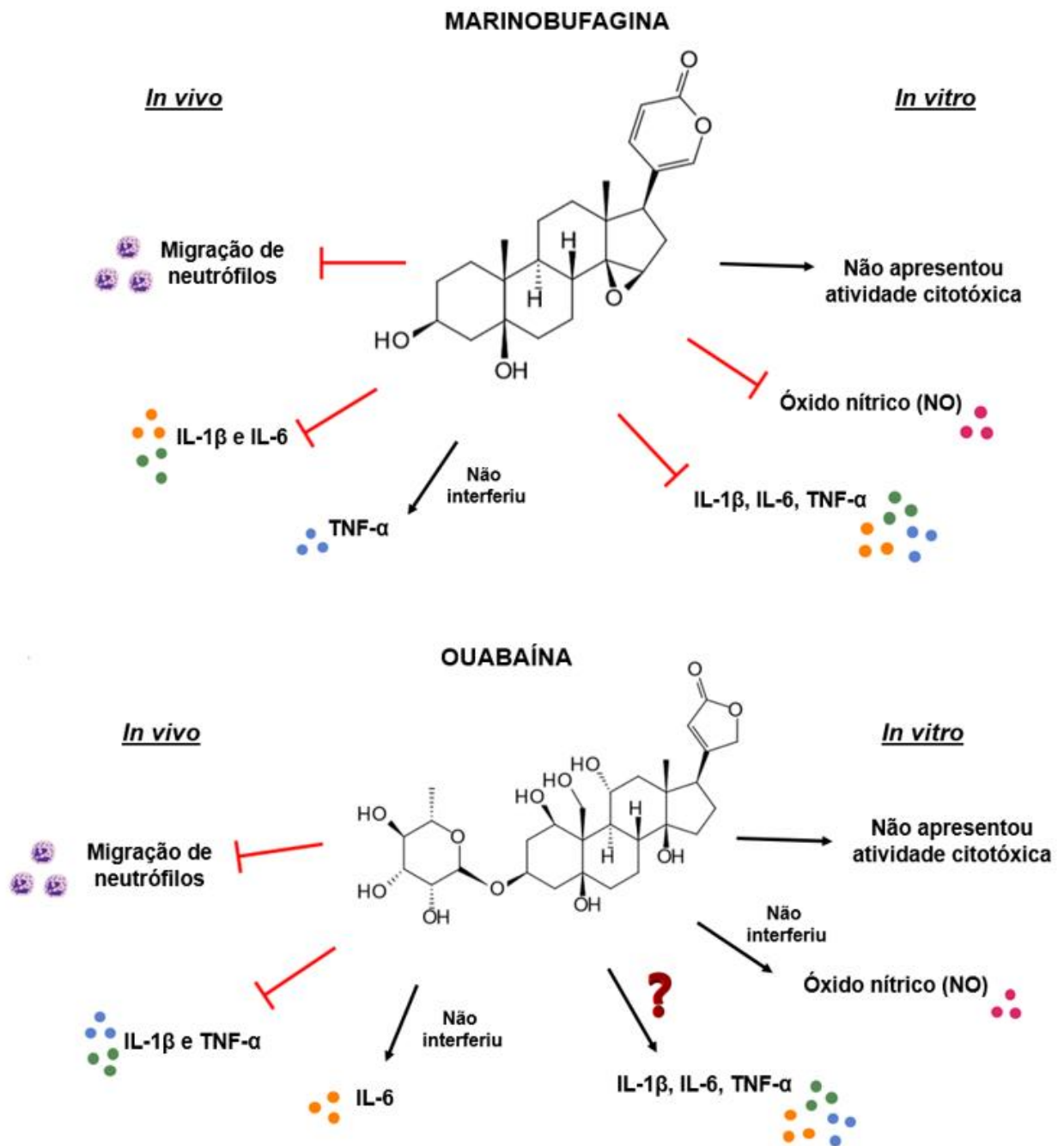
7 CONCLUSÃO

Diante da análise dos resultados, pode-se sugerir que a marinobufagina apresenta potencial anti-inflamatório *in vivo* e *in vitro*, pois:

- No modelo de peritonite induzida por zimosan, a marinobufagina reduziu a migração de polimorfonucleares para o sítio inflamado e atenuou a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6;
- Em cultura de macrófagos peritoneais com o estímulo do zimosan, a marinobufagina não apresentou atividade citotóxica e na menor concentração, essa substância atenuou os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α ;
- Em cultura de macrófagos peritoneais estimulados pelo LPS, em todas as concentrações estudadas, a marinobufagina reduziu a produção do óxido nítrico.

Dessa forma, é possível concluir que a marinobufagina possui um papel modulador da resposta inflamatória, assim como a ouabaína. E a diferença observada em alguns resultados entre os efeitos da marinobufagina e ouabaína, possivelmente esteja relacionado a diferença estrutural encontrada entre esses esteroides.

Figura 8. Esquema representativo do efeito da marinobufagina e da ouabaína no processo inflamatório.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–7, 2000.

AJUEBOR, M. N. et al. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. **Journal of leukocyte biology**, v. 63, n. 1, p. 108–116, 1998.

ALLER, M. A. *et al.* The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202–209, 2007.

AMARALI, L. S. **Avaliação do efeito de bufadienolídeos em novas vias de sinalização intracelular mediadas pela Na⁺/K⁺-ATPase**. 2011. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, UFRJ, 2011.

ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 2, p. 349–360, 1993.

ARSATI, F. **Efeito do meloxicam sobre o extravasamento plasmático inuzido pelo óleo de mostarda na ATM de ratos**. 1999. 77 f. Tese apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

ASSREUY, J. et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 3, p. 672–676, 1994.

BAGROV, A. Y. et al. Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of *Bufo marinus* toad. **European Journal of Pharmacology**, v. 234, n. 2–3, p. 165–172, 1993.

BAGROV, A. Y. et al. Effects of two endogenous Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. **European Journal of**

Pharmacology, v. 274, n. 1–3, p. 151–158, 1995.

BAGROV, A. Y. et al. Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity during saline volume expansion in anesthetized dogs. **Cardiovascular Research**, v. 31, n. 2, p. 296–305, 1996.

BAGROV, A. Y. et al. Characterization of a urinary bufadienolide Na^+ , K^+ -ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **Hypertension**, v. 31, n. 5, p. 1097–1103, 1998a.

BAGROV, A.Y.; FEDOROVA, O.V. Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the Na^+ , K^+ -pump in human mesenteric arteries. **Journal of Hypertension**, v.16, n.12, p. 1953–1958, 1998b.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological reviews**, v. 61, n. 1, p. 9–38, 2009.

BARWE, S. P. et al. Novel role for Na , K -ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 3, p. 1082–94, 2005.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{++} stores and cell responsiveness. **The American Journal of Physiology**, v. 264, n. 6, p. C1367–1387, 1993.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

CASH, J. L.; WHITE, G. E.; GREAVES, D. R. Chapter 17 Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the Study of Inflammation. **Methods in Enzymology**, v. 461, n. B, p. 379–396, 2009.

CASSADO, A. A.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 5, p. 1–9, 2015.

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.

CHEN, X. et al. Nepetin inhibits IL-1 β induced inflammation via NF- κ B and MAPKs signaling pathways in ARPE-19 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. February, p. 87–93, 2018.

CHOU, W. H. et al. Ouabain Induces Apoptotic Cell Death Through Caspase- and Mitochondria-dependent Pathways in Human Osteosarcoma U-2 OS Cells. **Anticancer Research**, v.38, n. 1, p.169-178.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, n. 1, p. 4-10, 2002.

CORREA, L. B. et al. Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1554–1566, 2016.

CUZZOCREA, S. et al. Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. **Shock**, v. 8, n. 4, p. 268–275, 1997.

DA SILVA, B. C. **Avaliação da toxicidade de quatro solventes e um surfactante, e dos fenilpropanoideseugenol e (E)-cinamaldeído sobre larvas e pupas de Musca domestica LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)**. 2016. 73 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2016. il.

DE PAIVA, L. S. et al. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, n. 9, p. 1038-1043, 2011.

DE REZENDE CORREA, G. et al. Ouabain induces na increase of retinal ganglion cell survival in vitro: the involvement of protein kinase C. **Brain Research**, v. 1049, n. 1, p. 89-94, 2005.

DE VASCONCELOS, D. I. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

DE WARDENER, H. et al. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. **Clinical Science**, v. 21, p. 249–258, 1961.

DMITRIEVA, R.I. et al. Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. **Journal of Hypertension**, v. 36, n. 3, p. 442– 448, 2000.

DMITRIEVA, O. S. et al. Interleukins 1 and 6 as Main Mediators of Inflammation and Cancer. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 81, n. 2, p. 80–90, 2016.

DOHERTY, N. S. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769–789, 1985.

DUDHGAONKAR, S. P. et al. Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2-3, p.117-122, 2004.

DVELA, M. et al. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. **Pathophysiology**, v. 14, n. 3-4, p.159-166, 2007.

EDER, C. Mechanisms of interleukin-1beta release. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 543-53, 2009.

EHRIG, J. C. et al. Cardiotonic steroids induce anti-angiogenic and anti-proliferative profiles in first trimester extravillous cytotrophoblast cells. **Placenta**, v. 35, n. 11, p. 932-936, 2014.

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

ESPOSITO, A. L.; POIRIER, W. J.; CLARCK, C. A. et al. The cardiac glycoside digoxin disrupts host defense in experimental pneumococcal pneumonia by impairing neutrophil mobilization. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 140, n. 6, p. 1590-1594, 1989.

FAN, X.; XIE, J.; TIAN, J. Reducing Cardiac Fibrosis: Na/K-ATPase Signaling Complex as a Novel Target. **Cardiovascular pharmacology: open access**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2017.

FARO, M. L. et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation Nitric Oxide, **Biology and Chemistry**, v. 41, p. 38-47, 2014.

FEDOROVA, O.V.; LAKATTA, E.G.; BAGROV, A.Y. Differential effects of acute NaCl loading on endogenous ouabain-like and marinobufagenin-like ligands of the sodium pump in Dahl hypertensive rats. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3009–3014, 2000.

FEDOROVA, O. V et al. Marinobufagenin, an Endogenous α -1 Sodium Pump Ligand, in Hypertensive Dahl Salt-Sensitive Rats. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 462–466, 2001.

FEDOROVA, O. V. et al. Endogenous ligand of α 1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride-dependent hypertension. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1122–1127, 2002.

FEDOROVA, O. V et al. Brain ouabain stimulates peripheral marinobufagenin via angiotensin II signalling in NaCl-loaded Dahl-S rats. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 8, p. 1515–23, 2005.

FEDOROVA O.V. et al. Intrahippocampal microinjection of an exquisitely low dose of ouabain mimics NaCl loading and stimulates a bufadienolide Na/K-ATPase inhibitor. **Journal of hypertension**, v.25, n 9, p. 1834-1844, 2007.

FEDOROVA, O. V. et al. Interaction of Digibind with endogenous cardiotonic steroids from preeclamptic placentae. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 2, p. 361–366, 2010.

FERRANDI, M. et al. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasm: comparison of two independent assays. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 886-96, 1997.

FONTANA, J. M. et al. Calcium oscillations triggered by cardiotonic steroids. **The Federation of European Biochemical Societies**, v. 280, n. 21, n. 5450-5455, 2013.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets - Inflammation and allergy**. v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

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

GHOSN, E. E. B. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2568–2573, 2010.

GOLDSBY R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE B. A. **Kuby Immunology**, 4 ed. W. H. Freeman and Company. 2000.

GOLDSTEIN, I. et al. Involvement of Na(+), K(+)-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. **Biology psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 491-499, 2006.

GONICK, H.C. et al. Simultaneous measurement of marinobufagenin, ouabain, and hypertension- associated protein in various disease states. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 20 n. 5–6, p. 617–627, 1998.

GOTO, A. et al. Digitalis-like activity in human plasma: relation to blood pressure and sodium balance. **American Journal of Medicine**, v. 89, n. 4, p. 420-426, 1990.

GOTO, A. et al. Physiology and pharmacology of Endogenous Digitalis-like Factors. **Pharmacology Reviews**, v. 44, n. 3, p. 377 – 399, 1992.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

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

HAAS, M. et al. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na /K -ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. **The Journal Biological Chemistry**, v. 277, p. 18694–18702, 2002.

HAMLYN, J. M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 88, n.14, p. 6259-6263, 1991.

HAMLYN, J.M. Biosynthesis of endogenous cardiac glycosides by mammalian adrenocortical cells: three steps forward. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 469–470, 2004.

HANSEN, O. Interaction of cardiac glycosides with (Na + K⁺)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. **Pharmacological Reviews**, v. 36, n. 3, p.143-63, 1984.

HENSLEY, K.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2002.

ISHKARAEVA-YAKOVIEVA, V. V. et al. DigiFab interacts with endogenous cardiotonic steroids and reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition. **Reproductive sciences**, v. 19, n. 12, p. 1260-1267, 2012.

JACOB, P. L. et al. Immunomodulatory activity of ouabain in Leishmania leishmania amazonensis-infected Swiss mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1313-1321, 2012.

JINLIAN, L.; YINGBIN, Z.; CHUNBO, W. p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. **Journal of Biomedical Science**, v. 14, p. 303-12, 2007.

KAJI, R.; SUMNER, A. J. Ouabain reverses conduction disturbances in single demyelinated nerve fibers. **Neurology**, v. 39, n. 10, p. 1364-8, 1989.

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.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 1, p. 33–42, 2001.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Role of lymphocytes in the course of murine zymosan-induced peritonitis. **Inflammation Research**, v. 57, n. 6, p. 272–278, 2008.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492-504, 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Angiogenic neutrophils: A novel subpopulation paradigm. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4455-4457, 2012.

KOMETIANI, P.; LIU, L.; ASKARI, A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 929–936, 2005.

KOMIYAMA, Y. et al. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells. **Journal of Hypertension**, v. 19, n. 2, p. 229–236, 2001.

KOMIYAMA, Y. et al. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 36–45, 2005.

KORDONOWY, L. L. et al. Obesity is associated with neutrophil dysfunction and attenuation of murine acute lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 120–127, 2012.

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

KULIKOV, A. et al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1691–1702, 2007.

LACY, P.; STOW, J. L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 9-18, 2011.

LAGARRIGUE, F.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. **Blood**, v. 128, n. 4, p. 479–488, 2017.

LANCASTER, M. C.; VEGAD, J. L. Suppression of the early inflammatory response in the sheep by strophanthin G. **Nature**, v. 213, p. 840–884, 1967.

LANG, K.; RATKE, J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. **Cell Communication and Signaling**, v. 7, n.1, p. 27, 2009.

LEITE, D. F. et al. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 630–637, 2007.

LEITE, J. A. **Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo inflamatório agudo**. 2012. 131 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012. il.

LEITE, J. A. et al. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

LI, J. et al. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB. **Journal of the American society of Neuphrology**, v. 17, n. 7, p. 1848-1857, 2006.

LI, Z.; XIE, Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, 2009.

LIANG, M. et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **The Journal Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10585–10593, 2007.

LICHTSTEIN, D. et al. Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses. **European Journal Biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 261–268, 1993.

LICHTSTEIN, D. et al. Biosynthesis of digitalis-compound in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as a precursor. **Life Sciences**, v. 62, n. 23, p. 2109–2126, 1998.

LIMA, D. J. B. **Estudo da atividade anticâncer da marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído de anfíbios da espécie *Rhinella marina***. 2016. 92 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

LINGREL, J. B. The Physiological Significance of the Cardiotonic Steroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 1, p. 395–412, 2010.

LIU, L. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 5, p. H2173–H2182, 2004.

LOPATIN, D.A. et al. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. **Journal Hypertension**, v. 17, n. 8, p. 1179–1187, 1999.

MACHADO, K.D.C. et al. Marinobufagin, a molecule from poisonous frogs, causes biochemical, morphological and cell cycle changes in human neoplasms and vegetal cells. **Toxicology letters**, v.15, n. 285, p. 121-131, 2018.

MACMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MANNA, S. K.; SREENIVASAN, Y.; SARKAR, A. Cardiac glycoside inhibits IL-8-induced biological responses by downregulating IL-8 receptors through altering membrane fluidity. **Journal Cell Physiology**, v. 207, n. 1, p. 195–207, 2006.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-930, 1994.

MASUDA, Y. et al. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 19, p. 549–556, 1995.

MCGUINNESS, W.; KOBAYASHI, S.; DELEO, F. Evasion of Neutrophil Killing by *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 32, 2016.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MIJATOVIC T. et al. The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor κ B-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 391–399, 2006.

MONCADA S.; PALMER R. M.; HIGGS E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

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.

MURRELL, J. R. et al. Endogenous ouabain: Upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. **Circulation**, v. 112, n. 9, p. 1301–1308, 2005.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-82, 2006.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-82, 2010.

NAVARRO-XAVIER, R. A. et al. A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1516-1525, 2010.

NEWMAN, R. A. et al. Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 5, n. 3, p. 167–181, 2006.

NEWMAN, R. A. et al. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Molecular interventions**, v. 8, n. 1, p. 36-49, 2008.

NUMAZAWA, S. et al. A cardiotonic steroid bufalin-like factor in human plasma induces leukemia cell differentiation. **Leukemia research**, v.19, n.12, p. 945-953.

OLEJ, B. et al. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. **Bioscience Reports**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1998.

OLIVEIRA, B. M. I. **Reatividade vascular para cardiotônicos esteroides em segmentos vasculares de diferentes espécies: papel da via NKA-SRC e PKC**. 2013. 105 f. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2013. il.

OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, um alcalóide do tipo tetraidroisoquinílico**. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014., il.

ORELLANA, A. M. et al. Cardiotonic steroids as modulators of neuroinflammation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. 10, 2016.

ORLOV, S. N. et al. Na⁺,K⁺-ATPase as a target for treatment of tissue fibrosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 6, 2017.

OSELKIN, M.; TIAN, D.; BERGOLD, P. J. Low-dose cardiotonic steroids increase sodium-potassium ATPase activity that protects hippocampal slice cultures from experimental ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 473, n. 2, p. 67–71, 2010.

PACZULA, A.; WIĘCEK, A.; PIECHA, G. The role of endogenous cardiotonic steroids in pathogenesis of cardiovascular and renal complications of arterial hypertension. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 70, p. 243–250, 2016.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

PAMNANI, M. B. et al. Studies on the role of humoral sodium-transport inhibitor and the anteroventral third ventricle (AV3V) in experimental low-renin hypertension. **Clinical science**, v. 61, n. 57, p. 57s-60s, 1981.

PAN, Q. et al. Protective effect of a novel antibody against TLR2 on zymosan-induced acute peritonitis in NF- κ B transgenic mice. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 2, p. 692–699, 2017.

PENNIYAYNEN, V. A. et al. The effect of marinobufagenin on the growth and proliferation of cells in the organotypic culture. **Dokl Biol Sci**, v. 462, n. 4, p. 164–166, 2015.

PERERA-CÓRDOVA, W. H. et al. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na(+)/K(+)-ATPase activity. **Toxicon**, v. 110, p. 27-34, 2016.

PRASSAS, L.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926-935, 2008.

PUSCHETT, J. B.; KUMAR, B.; ABBAS, M. M. Differing effects of resibufagenin on cinobufatalin- versus marinobufagenin-induced preeclampsia in a rodent model. **American Journal of Perinatology**, v. 32, n. 8, p. 803-808, 2015.

QAZZAZ, H.M. et al. De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612–620, 2004.

REID, D. M.; GOW, N. A.; BROWN, G. D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n.1, p. 30-37, 2009.

RODRIGUES MASCARENHAS, S. et al. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sciences**, v. 73, n. 8, p. 1037-51, 2003.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biology International**, v. 32, n. 10, p. 1323-1328, 2008.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. Modulation of the immune system by ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n.1, p. 153-163, 2009.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. Effect of ouabain on NFkB and p-38 activation in macrophages: a new biotechnological application. **BMC Proceedings**, v. 8, n. 4, p. 1-2, 2014.

SATO, M. et al. Direct Binding of Toll-Like Receptor 2 to Zymosan, and Zymosan-Induced NF- κ B Activation and TNF- α Secretion Are Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 417–425, 2003.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SCHNEIDER, R. et al. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 784–792, 1998.

SCHONER, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 108, n. 7, p. 449-54, 2000.

SCHONER, W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. European **Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 10, p. 2440–2448, 2002.

SCHONER, W. et al. Ouabain as a mammalian hormone. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 986, n.1, p. 678-84, 2003.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous cardiac glycosides: Hormones using the sodium pump as signal transducer. **Seminars in Nephrology**, v. 25, n. 5, p. 343–351, 2005.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **American Journal of Cardiovascular**

Drugs, v. 7, n. 3, p. 173-189, 2007.

SCHNOOR, M. Endothelial Actin-Binding Proteins and Actin Dynamics in Leukocyte Transendothelial Migration. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3535–3541, 2015.

SCHONFELD, W. et al. The lead structure in cardiac glycosides is 5 beta, 14 beta-androstane-3 beta 14-diol. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 329, n. 4, p. 414-26, 1985.

SCHULZE-OSTHOFF, K. et al. Regulation of NF- κ B Activation by MAP Kinase Cascades. **Immunobiology**, v. 198, n. 1–3, p. 35–49, 1997.

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

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Action**, v. 18, n. 3-4, p. 439-46, 1986.

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.

SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **Annual Review of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 1576-91, 2010.

SHAH, V. O. et al. Cardiac glycosides inhibit LPS-induced activation of pro-inflammatory cytokines in whole blood through an NF- κ B-dependent mechanism. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 11–19, 2011.

SHATZMANN, H. J. Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. **Helvetica Physica Acta**, v.11, n. 4, p. 346-360, 1953.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, J. S. F. **Efeito anti-inflamatório da ouabaína em modelo murinho de lesão pulmonar aguda induzida por LPS**. 2016. 103 f. Dissertação apresentada ao

Programa de Pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos.
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SKELDON, A.; SALEH, M. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v.2, p. 15, 2011.

SRIVASTANA, M. et al. Digitoxin mimics gene therapy with CFTR and suppresses hypersecretion of IL-8 from cystic fibrosis lung epithelial cells. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7693–7698, 2004.

STEYN, P. S.; HEERDEN, F. R. Bufanolides of plant and animal origin. **Natural Products Reports**, v. 15, n. 4, p. 397-413, 1998.

TAKADA, Y. et al. Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NF kappaB inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1157-66, 2009.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TAN, Q. et al. The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration. **Biomed Research International**, v. 2016, n.1, p. 1-6, 2016.

TANG, Y. M. et al. Inhibition of p38 and ERK1/2 pathways by Sparstolonin B suppresses inflammation-induced melanoma metastasis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, n. September 2017, p. 382–389, 2018.

TIAN, J. et al. Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 1, p. 317–326, 2006.

TIAN, D. et al. Protein kinase M zeta regulation of Na/K ATPase: a persistent neuroprotective mechanism of ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. **Brain Research**, v. 1213, p. 127-139, 2008.

TOUZA, N. A. et al. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on Na⁺/K⁺-ATPase activity in human kidney membrane preparation. **Life Sciences**, v. 88, n. 1-2, p. 39-42, 2010.

TOUZA, A. N. **Caracterização da inibição da Na⁺,K⁺-ATPase por bufadienolidos endógenos e semi-sintéticos**. 2011. 95 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 48, n. 4, p. 305–10, 2002.

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.

TYMIAK, A A et al. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 8189–93, 1993.

UDDIN, M. N. et al. Marinobufagenin inhibits proliferation and migration of cytotrophoblast and CHO cells. **Placenta**, v. 29, n. 3, p. 266-273, 2008.

UDDIN, M. N. et al. Pathogenesis of pre-eclampsia: Marinobufagenin and angiogenic imbalance as biomarkers of the syndrome. **Translational Research**, v. 160, n. 2, p. 99–113, 2012.

VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 179–189, 2011

VAN KESSE, K. P. M.; BESTEBROER, J.; VAN STRIJP, J. A. G. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–12, 2014.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 11, p. 692–704, 2015.

XIAOLONG, X. et al. Punicalagin inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPKs and NF-κB activation. **Inflammation**, v. 37, n. 3, p. 956–965, 2014.

XIE, Z; ASKARI, A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. **European Journal of**

Biochemistry, v. 269, p. 2434-2439, 2002.

WANG, J. K. et al. Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: discovery by a brain slice-based compound screening platform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10461–10466, 2006.

WANG, X. Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. **Journal of cell science**, v. 116, n. 10, p. 2099-2110, 2003.

WANG, Y. et al. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 42, p. 16975–16980, 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.

WEIDEMANN, H. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development – a hypothesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 2165-76, 2005.

WEN, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of bufalin in rodents. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 365-391, 2001.

WILINSKI, B. et al. Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 5, p. 1243–7, 2011.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93-106, 2006.

WITKAMP, R., MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **Veterinary quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2000.

WU, B. C.; LEE, A. H.-Y.; HANCOCK, R. E. W. Mechanisms of the Innate Defense Regulator Peptide-1002 Anti-Inflammatory Activity in a Sterile Inflammation Mouse Model. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 10, p. 3592–3603, 2017.

YANG Q. et al. Cardiac glycoside inhibit TNF- α /NF- κ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9631–9636, 2005.

YOSHIKA, M.; KOMIYAMA, Y.; TAKAHASHI, H. Isolation of marinobufotoxin from the supernatant of cultured PC12 cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 5, p. 334–337, 2011.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. **Nature Reviews Cancer**, 2009.

ZEINO, M. et al. Cytotoxicity of cardiotonic steroids in sensitive and multidrug-resistant leukemia cells and the link with Na⁺/K⁺-ATPase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, p. 97-111, 2015.

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da atividade anti-inflamatória da marinobufagina, um bufadienolido endógeno em mamíferos", protocolo nº 125/2016 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 03 de fevereiro de 2017.

Vigência do Projeto	2017 a 2018
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss
Número de animais	135 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas (25 a 35 g)
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB

ANEXO B – Artigo em colaboração publicado na revista Inflammation Research (Fator de Impacto: 2,659)

Inflamm. Res. (2017) 66:1117–1130
DOI 10.1007/s00011-017-1092-9

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER



Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation

José Guilherme F. M. Galvão¹ · Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva¹ ·
Deyse Cristina M. Carvalho¹ · Laércia Karla D. P. Ferreira² ·
Talissa Mozzini Monteiro¹ · Adriano Francisco Alves² ·
Larissa Adilis M. P. Ferreira² · Francisco Allysson A. F. Gadelha² ·
Marcia Regina Pivezani² · Sandra Rodrigues-Mascarenhas¹

Received: 8 May 2017 / Revised: 8 September 2017 / Accepted: 11 September 2017 / Published online: 13 September 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract

Purpose Ouabain, an Na^+/K^+ -ATPase inhibitor hormone, presents immunomodulatory actions, including anti-inflammatory effect on acute inflammation models.

Methods In the present study, the effect of ouabain in a model of allergic airway inflammation induced by ovalbumin (OVA) was assessed.

Results Initially, it was observed that ouabain treatment inhibited cellular migration induced by OVA on bronchoalveolar lavage fluid (BALF), mostly granulocytes, without modulating macrophage migration. In addition, it was observed, by flow cytometry, that ouabain reduces CD3^{high} lymphocytes cells on BALF. Furthermore, treatment with ouabain decreased IL-4 and IL-13 levels on BALF. Ouabain also promoted pulmonary histological alterations, including decreased cell migration into peribronchiolar and perivascular areas, and reduced mucus production in bronchioles regions observed through hematoxylin-eosin (HE) and by periodic acid-Schiff stain, respectively. Allergic airway inflammation is characterized by high OVA-specific IgE serum titer. This parameter was also reduced by the treatment with ouabain.

Conclusions Therefore, our data demonstrate that ouabain negatively modulates allergic airway inflammation induced by OVA.

Keywords Allergic airway inflammation · Ouabain · CD3^+ lymphocytes · Th2 cytokines · Lung histology

Introduction

Ouabain was first described as a cardiotonic glycoside isolated from bark, roots, and seeds of plants, such as *Acocanthera ouabain* and *Strophanthus gratus* [1]. This glycoside was used for a long time in congestive heart failure therapy, because it acts as Na^+/K^+ -ATPase inhibitor [2, 3]. Ouabain is also an endogenous substance present in plasma and tissues of higher mammals [4–6], which indicates an important role in various physiological regulatory mechanisms [7]. It is produced mainly by the adrenal glands, pituitary, and hypothalamus [5–10] and evidence suggests that ouabain release occurs in acute stress situations, such as cortisol production during exercise [11, 12].

Some studies have demonstrated that ouabain presents immunomodulatory effect. Indeed, ouabain inhibits in vitro proliferation of lymphocytes induced by several substances such as phytohemagglutinin [13, 14], phorbol ester [15], and concanavalin A [16, 17]. In addition, this cardiac glycoside reduces mCD14 expression in human monocytes [18] and modulates cytokine production by monocytes and dendritic cells [19, 20]. Besides, ouabain also increases CD69 expression and reduces phosphorylated p38 MAPK and NFATc1 levels in thymocytes [17, 21]. The association of ouabain plus corticoids produced a synergic effect, inducing thymic atrophy in vivo [22]. In addition, ouabain regulates the dynamics of B cells in peripheral organs [23]. Recent data demonstrated that ouabain presents an anti-inflammatory and antinociceptive role [24] by inhibiting molecular events in acute inflammation such as NF- κ B activation on zymosan-induced peritonitis [25].

Responsible Editor: Bernhard Gibbs.

✉ Sandra Rodrigues-Mascarenhas
sandra@chiotec.ufpb.br

¹ Laboratório de Imunobiocologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil

² Laboratório de Imunofarmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil

ANEXO C – Artigo em colaboração publicado na revista Frontiers in Physiology (Fator de Impacto: 4,134)



MINI REVIEW
published: 10 November 2017
doi: 10.3389/fphys.2017.00895



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

Lutz H. A. Cavalcante-Silva¹, Éssia de Almeida Lima², **Deyse C. M. Carvalho³**, José M. de Sales-Neto¹, Anne K. de Abreu Alves², José G. F. M. Carvalho¹, Juliane S. de França da Silva¹ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,3*}

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Carlos 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@cbioec.ufpb.br

Specialty section:

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

Received: 06 September 2017

Accepted: 24 October 2017

Published: 10 November 2017

Citation:

Cavalcante-Silva LHA, Lima EA,
Carvalho DCM, Sales-Neto JM,
Alves AKA, Galvão JCFM, Silva JSF
and Rodrigues-Mascarenhas S (2017)
Much More than a Cardiotonic
Steroid: Modulation of Inflammation
by Ouabain. *Front. Physiol.* 8:895.
doi: 10.3389/fphys.2017.00895

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⁺/K⁺-ATPase, on target cells. This interaction can promote Na⁺ 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

INTRODUCTION

Although the cardiotonic steroid ouabain was originally identified as a plant secondary metabolite (e.g., from *Strophantus gratus* and *Acnicanthera ouabain*), 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).