

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS**

**JOSÉ GUILHERME FERREIRA MARQUES
GALVÃO**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DA
OUABAÍNA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA INDUZIDA POR
OVALBUMINA**

**JOÃO PESSOA – PB
2022**

**JOSÉ GUILHERME FERREIRA MARQUES
GALVÃO**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DA
OUABAÍNA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA INDUZIDA POR
OVALBUMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de **DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Área de concentração: **Farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

**JOÃO PESSOA – PB
2022**

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

G182a Galvão, José Guilherme Ferreira Marques.
Avaliação dos mecanismos imunomoduladores da ouabaína no modelo experimental de asma induzida por ovalbumina / José Guilherme Ferreira Marques Galvão. - João Pessoa, 2022.
92 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Ouabaína - Processos asmáticos. 2. Asma. 3. Imunomodulação. 4. Alergia. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.234 (043)

**JOSÉ GUILHERME FERREIRA MARQUES
GALVÃO**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DA
OUABAÍNA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA INDUZIDA POR
OVALBUMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.

Tese de doutorado aprovada em: 24/02/20022

BANCA EXAMINADORA

Sandra Rodrigues Mascarenhas

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas (**Orientadora**)
(Centro de Biotecnologia – UFPB)

Profa. Dra. Camille de Moura Balarini
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB. **Avaliadora Externa**)
Camille de Moura Balarini

Profa. Dra. Maria do Socorro França Falcão
(Centro de Biotecnologia – UFPB. **Avaliadora Externa**)
Maria do Socorro França Falcão

Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz
(Centro de Biotecnologia – UFPB. **Avaliadora Externa**)
Josiane de Campos Cruz

Prof. Dr. Leandro Augusto de Oliveira Barbosa
(CCO – UFSJ. **Avaliador Externo**)
Leandro Augusto de Oliveira Barbosa

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
(DCF – UFPB. **Avaliadora Interna Suplente**)
Marianna Vieira Sobral

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(UFCG. **Avaliador Externo Suplente**)

*A minha família por ser sempre meu porto seguro; minha filha **Helena**, minha esposa **Alynne**, meus pais **Rosalvo** e **Gilda** e meus irmãos **Lucas** e **Aurélio**,*

Eu dedico!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, alicerce da minha fé cristã, por me deixar seguir sempre que pensei em desistir.

A minha **família**, que transcende os conceitos fraternos e de pertencimento. Especialmente a minha esposa **Alynne** por estar ao meu lado nos últimos 12 anos e por ter sonhado comigo essa conquista. Devo a você toda a minha perseverança. A minha buduguinha **Helena**, por iluminar os meus dias e por me ensinar que eu posso ser algo além de um simples ser humano. Hoje eu sou um pai. Aos meus pais **Gilda** e **Zezé** por terem sido luta, sonhos, amor e acima de tudo carinho em todos os meus 30 anos de vida. Vocês são minha fundação maior. Aos meus irmãos **Lucas** e **Aurélio** por estarem conectados a mim num laço que me deixa ter a certeza de que nunca estarei só. Eu amo vocês.

A minha fundamental orientadora, **Sandra Mascarenhas**, por ter me apresentado o significado do que é fazer ciência com a esperança de que amar o conhecimento não precisa estar associado apenas a resultados, *papers* e discussões, mas que eles antes de qualquer coisa são frutos de dedicação e de saber caminhar pelo mundo científico sem perder a si próprio. A senhora é uma inspiração diária. Nunca vou me esquecer o que você fez por mim nesses mais de 10 anos de companheirismo. Obrigado por ser o nosso farol.

Aos meus irmãos científicos (sempre vou adorar essa expressão), **Luiz**, **Deyse**, **Éssia**, **Juliane** e **Marreiro**. No entanto, preciso especialmente dedicar um tempo a mais para **Luiz**, por ser um irmão além da bancada e por sempre conseguir me deixar menos agoniado depois de horas discutindo música, reality show ou episódios de séries de fantasia. Eu levarei você para sempre comigo, cara.

Aos meus amigos-irmãos, **Danilo** e **Renan**. Vocês nem imaginam a diferença que fazem na minha vida. Um simples telefonema que dura duas horas (sim, é possível), um filme visto juntos, um livro discutido por horas, me fez menos perdido nesses últimos anos. Meu coração sempre está com vocês dois.

A todos que compões o LYMFA, em especial a **Profa. Márcia Piuvezam** e a **Laércia** e **Larissa** por terem me apresentado o mundo da asma e das alergias. Obrigado por todas as contribuições e parcerias.

Aos estimados professores que aceitaram compor a banca examinadora do meu trabalho: **Dra. Camille**, **Dra. Maria do Socorro**, **Dra. Josiane**, **Dr. Leandro**, **Dr. Abrahão** e **Dra. Mariana** e que com toda certeza contribuíram para a melhoria desse trabalho.

A minha **turma de doutorado**, por estarem juntos nesse sonho sem nunca deixar de se ajudar.

A querida **Mônica**, por todas as conversas animadas entre um experimento e outro. Pelo cafezinho indispensável e por sempre ter um sorriso para nos animar nos momentos mais difíceis. Você nunca vai deixar de ser importante.

A todos os professores do **Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** pelos ensinamentos e por terem contribuído diretamente na minha formação, alguns ainda durante a minha graduação.

A **Caroline Medeiros** pela excelência no trabalho na secretaria e por nunca nos deixar na mão, mesmo que a gente tente tirar a mesma dúvida mais de uma vez.

A **Universidade Federal da Paraíba**, minha casa de formação desde 2009, quando comecei a dar os meus primeiros passos nesse sonho de ser cientista. Obrigado pela infraestrutura. Ainda agradeço ao **CNPq** e a **CAPES** pelo apoio financeiro.

Agradeço por TUDO!

“Está tudo bem precisar de ajuda. Todos nós temos coisas que não podemos fazer sozinhos”.

N.K. Jemisin.

GALVÃO, J.G.F.M. AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DA OUABAÍNA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA INDUZIDA POR OVALBUMINA. 2022. 94fls.

Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

Distúrbios inflamatórios alérgicos como a asma tipo 2 (TH2^{hi}), podem ser tratados em sua fase tardia com corticosteroides, que acabam por promover uma melhora do quadro inflamatório crônico que se instala nas vias aéreas. A ouabaína, um esteroide cardiotônico com propriedades imunomoduladoras, é capaz de regular a liberação de histamina pelos mastócitos em processos alérgicos simples, e de atenuar a inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA). Estes achados reforçam o papel fisiológico desempenhado pela ouabaína durante respostas inflamatórias alérgicas, evidenciando indícios do potencial modulador fisiológico e farmacológico dessa substância em processos asmáticos. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com a ouabaína sob os parâmetros celulares, endoteliais e histológicos característicos do modelo de asma TH2^{hi} . Para isso utilizamos um modelo experimental de asma induzida por OVA com duração de 12 semanas. Camundongos *Balb/c* fêmeas foram sensibilizados com OVA nos dias 0 e 14 e desafiados com OVA por aerossol entre os dias 21 e 84, durante três dias consecutivos por semana. O tratamento com a ouabaína e a droga padrão budesonida ocorreu uma hora antes de cada desafio e no 85º dia do protocolo, foi realizada a coleta do material biológico. Os animais com asma tratados com ouabaína apresentaram redução ($p<0,05$) da migração de células totais e individualmente de eosinófilos, macrófagos e linfócitos no lavado do fluido broncoalveolar (BALF); dos níveis séricos de IgE total e OVA-específica; dos níveis de citocinas, no BALF (IL-33, TSLP, IL-4, IL-1β, TGF-β e TNF-α); da **inflamação** e da hiperprodução de muco nos pulmões; da hiper-reatividade brônquica e do remodelamento tecidual pulmonar. Adicionalmente, o tratamento com ouabaína reduziu a frequência de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF. Assim, os resultados obtidos nesse estudo, sugerem que a ouabaína como um esteroide cardiotônico imunomodulador, é capaz de reduzir as principais características que determinam o endotipo asmático alérgico, conhecido como asma TH2^{hi} .

Palavras chaves: Ouabaína; Asma; Imunomodulação; Alergia.

GALVÃO, J.G.F.M. EVALUATION OF OUABAIN IMMUNOMODULATOR MECHANISMS IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF OVALBUMIN-INDUCED ASTHMA. 2022. 94 pages. Thesis (PhD in Natural and Bioactive Synthetic Products) - UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Allergic inflammatory disorders such as TH2^{hi} asthma can be treated in their late phase with corticosteroids, which end up promoting an improvement in the chronic inflammatory condition that settles in the airways. Ouabain, a cardiotonic steroid with immunomodulatory properties, is able to regulate histamine release by mast cells in simple allergic processes, and to attenuate ovalbumin-induced allergic airway inflammation (OVA). These findings reinforce the physiological role played by ouabain during allergic inflammatory responses, showing evidence of the physiological and pharmacological modulating potential of this substance in asthmatic processes. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of treatment with ouabain on cellular, endothelial and histological parameters characteristic of the TH2^{hi} asthma model. For this, we used an experimental model of OVA-induced asthma with a duration of 12 weeks. Female Balb/c mice were primed with OVA on days 0 and 14 and from days 21 to 84 for three consecutive days per week were challenged with aerosolized OVA. Treatment with ouabain and the standard drug budesonide occurred one hour before each challenge and on the 85th day of the protocol, biological material was collected. The animals with asthma treated with ouabain showed a reduction ($p<0.05$) in the migration of total cells and individually of eosinophils, macrophages and lymphocytes in the bronchoalveolar fluid lavage (BALF); serum levels of total and OVA-specific IgE; cytokine levels in BALF (IL-33, TSLP, IL-4, IL-1 β , TGF- β and TNF- α); inflammation and overproduction of mucus in the lungs; of bronchial hyperreactivity and lung tissue remodeling. Additionally, treatment with ouabain reduced the frequency of p-p38 MAPK activation in lymphocytes in BALF. Thus, the results obtained in this study suggest that ouabain as an immunomodulatory cardiotonic steroid is able to reduce the main characteristics that determine the allergic asthmatic endotype, known as TH2^{hi} asthma.

Keywords: Ouabain; Asthma; Immunomodulation; Allergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenótipos, endotipos e biomarcadores da asma	21
Figura 2. Esquema representativo do modelo experimental de asma	25
Figura 3. Estrutura química da ouabaína.....	26
Figura 4. Imunomodulação pela ouabaína.....	29
Figura 5. Esquema representativo do modelo experimental de asma.....	35
Figura 6. Esquema representativo da estratégia de análise dos dados avaliados por citometria de fluxo.....	38
Figura 7. Esquema representativo dos efeitos imunomodulatórios da ouabaína no modelo de asma TH2^{Hi}.....	66

LISTA DE PAINÉIS

Painel 1. Efeito da ouabaína sobre os aspectos histopatológicos dos pulmões, no modelo experimental de asma, com a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE).....	44
Painel 2. Efeito da ouabaína sobre a produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas, no modelo experimental de asma, com a coloração de ÁcidoPeriódico – Schiff (PAS)	45
Painel 3. Efeito da ouabaína sobre Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de asma, com a coloração de Tricomico de Masson (TM).....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Avaliação do efeito da ouabaína sobre a migração de células totais para o fluido do lavado broncoalveolar.....	40
Gráfico 2. Efeito da ouabaína sobre a migração de leucócitos diferenciais para o fluido do lavado broncoalveolar.....	41
Gráfico 3. Avaliação do efeito da ouabaína sobre a concentração de IgE total e IgE-OVA específica no modelo de asma.....	42
Gráfico 4. Efeito da ouabaína sobre o infiltrado celular (coloração HE), hiperprodução de muco (coloração PAS) e hiperatividade brônquica com remodelamento tecidual (coloração de Tricomico de Masson), no modelo de asma.....	47
Gráfico 5. Efeito da ouabaína sobre a produção das citocinas IL-33, TSLP, IL-4, IL-1β, TGF-β, e TNF-α no modelo de asma.....	48
Gráfico 6. Efeito da ouabaína na frequência de ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com asma.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ANG II	Angiotensina-II
AHR	Hiper-reatividade das vias áreas
AP-1	Proteína adaptadora 1
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
BHR	Hiper-reatividade brônquica
BUD	Budesonida
CDs	Células dendríticas
EGRF	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FcϵRI	Receptores de alta afinidade I
GATA-3	Fator de transcrição de ação trans específicos de células T do tipo 3
HE	Hematoxilina-eosina
IFN- γ	Interferon γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucinas
ILC-2	Células linfoides inatas do grupo 2
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEC	Matrix extracelular
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
NFATc	Fator nuclear das células T ativadas
NF-κB	Fator nuclear κ B
OVA	Ovalbumina
OUA	Ouabaína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido Periódico-Schiff
STAT6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
T_H	Linfócito T <i>helper</i>

Th2^{hi}	Asma Tipo 2 Alto Nível
Th2^{lo}	Asma Ripo 2 Baixo Nível
TM	Tricomio de Masson
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TSLP	Linfopoetina do estroma tímico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Perfil epidemiológico da asma.....	20
1.2. Características fenotípicas da asma	21
1.3. Fisiopatologia da asma.....	23
1.4. A ouabaína como uma substância imunomoduladora	27
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Geral	33
2.2. Específicos.....	33
3. METODOLOGIA	35
3.1. Animais	35
3.2. Grupos experimentais.....	35
3.3. Protocolo experimental de asma	35
3.4. Quantificação da celularidade.....	36
3.5. Avaliação dos parâmetros histológicos pulmonares.....	37
3.6. Quantificação de IgE e citocinas	37
3.7. Marcação celular da MAP quinase fosforilada p-p38 por citometria de fluxo	38
3.8. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Efeito da ouabaína na migração de células totais no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de asma.	41
4.2. Efeito da ouabaína na migração de leucócitos diferenciais (eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos) no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de asma.	42
4.3. Efeito da ouabaína sobre a concentração de imunoglobulina E (IgE) total e de IgE-Ovalbumina específica no modelo de asma alérgica crônica, induzida por ovalbumina..	43
4.4. Efeito da ouabaína sobre os parâmetros histopatológicos característicos do modelo de asma.	44
4.5. Avaliação do efeito da ouabaína sobre a produção de citocinas IL-33, TSLP, IL-4, IL-1β, TGF-β, e TNF-α no modelo de asma do tipo 2, induzida por ovalbumina.....	48
4.6. Efeito da ouabaína na ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com asma.	50
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	66

7. REFERÊNCIAS	68
8. APÊNDICES	87

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A asma é um processo inflamatório crônico definido como uma doença heterogênea, que pode se desenvolver a partir de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. A inflamação pulmonar, associada a uma hiper-reactividade das vias aéreas a estímulos diretos e indiretos de substâncias geralmente inócuas, representa uma característica marcante desse processo (GINA, 2021; HOLGATE et al., 2015).

Devido a sua heterogeneidade, apresenta uma etiologia de sintomas respiratórios relativamente complexos, dentre eles, sibilância, falta de ar, tosse e sensação de aperto no peito com limitação variável do fluxo de ar expirado. Esses sintomas podem variar ao longo do tempo e de intensidade podendo piorar e levar à insuficiência respiratória (BOULET, 2018; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019; VAN HELDEN; LAMBRECHT, 2013).

Os estudos com asma em humanos não conseguem se enquadrar em todos os requisitos dos comitês de ética. Portanto, modelos animais são necessários para melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos para avaliar a segurança e a eficácia de novas terapias na asma, antes de se iniciar os ensaios clínicos em humanos (KUMAR et al., 2008). Diferentes fenótipos patológicos já foram descritos na asma, mas ainda não existe uma maneira padrão de distingui-los. Eles diferem em relação aos parâmetros clínicos, critérios fisiológicos e gatilhos ambientais, bem como características celulares para identificar endotipos distintos da doença (HESSELMAR et al., 2012; WENZEL, 2006). Os modelos animais são limitados por não serem capazes de mimetizar todas as características e fenótipos da asma humana, mas ao longo dos anos, eles provaram seu valor em ampliar o conhecimento de muitas características inflamatórias, estruturais e fisiológicas da asma, como o fenótipo tipo 2 (T2 High) (CHAPMAN et al., 2014; SAGAR; AKBARSHAH; ULLER, 2015).

Distúrbios inflamatórios alérgicos como a asma tipo 2, podem ser tratados em sua fase tardia com corticosteroides, que acabam por promover uma melhora do quadro inflamatório crônico que se instala nas vias aéreas (DERENDORF; MELTZER, 2008; DERENDORF et al., 2014). A ouabaína, um esteroide cardiotônico com propriedades imunomoduladoras (SZAMEL et al., 1981; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008; LEITE et al., 2015; GALVÃO et al., 2017; CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; CAVALCANTE-SILVA et al., 2021), é capaz de

regular a liberação de histamina pelos mastócitos em processos alérgicos simples (LAGO et al., 2001; SENOL et al., 2007), e de atenuar a inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA), diminuindo a migração de células para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e citocinas pró-inflamatórias (GALVÃO et al., 2017).

Estes achados reforçam o papel fisiológico desempenhado pela ouabaína durante respostas inflamatórias alérgicas, evidenciando indícios do potencial modulador fisiológico e farmacológico dessa substância em processos asmáticos. Logo, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos desse esteroide na inflamação pulmonar alérgica, agora caracterizada endotípicamente como asma tipo 2.

1.1. Perfil epidemiológico da asma

A asma acomete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em todos os países, mas independente do seu grau de desenvolvimento, é considerada uma das principais enfermidades não transmissíveis e está entre as mais prevalentes ao redor do globo. Segundo dados da OMS (2019), a asma é a doença crônica mais frequente em crianças e apresenta uma mortalidade preocupante, sendo esta doença responsável por 1 em cada 250 mortes no mundo. Em termos mundiais, os custos com a asma superam os da tuberculose e HIV/AIDS somados (WHO, 2021). O Brasil é o 8º país em prevalência desta doença. Em 2015, foram notificadas 383.000 mortes por asma. No Brasil, é a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde e três pessoas morrem por dia no país em decorrência de crises asmáticas (WHO, 2021). Estima-se que 19% dos adolescentes e 24% das crianças brasileiras são asmáticas (ASBAI, 2018).

O termo “asma” identifica um espectro de sintomas relacionados com problemas respiratórios, classicamente relacionados a uma limitação reversível do fluxo aéreo (WENZEL, 2012). Este termo é tradicionalmente utilizado para descrever o início da doença, o associando com respostas alérgicas e atópicas (GAUTHIER; RAY; WENZEL, 2015). De acordo com a American Thoracic Society (ATS), pacientes com asma são definidos como aqueles que necessitam de tratamento com doses elevadas de corticosteróides (ex.: budesonida), sejam eles inalados ou sistêmicos, em combinação com uma segunda medicação a longo prazo (ex.: montelucaste). Esta definição inclui tanto pacientes que mantém a doença sobre controle, quanto aqueles desregulados (DERENDORF; MELTZER, 2008).

Estudos têm observado prevalência menor em países asiáticos, sul-americanos e africanos em comparação aos países mais desenvolvidos, o que pode estar relacionado a fatores ambientais e de estilo de vida (MASOLI et al., 2004). A asma está associada a uma alta carga de doença e é responsável por uma utilização desproporcionalmente alta de cuidados de saúde em casos graves não controlados (TAY et al., 2017). Um estudo conduzido por Grant e colaboradores (2000), descreveu que o nível socioeconômico ruim (incluindo baixa renda e baixo nível de escolaridade) também pode se correlacionar com a maior mortalidade relacionada a doença. Logo, os distúrbios asmáticos tem sido diretamente associados ao comprometimento da qualidade de vida, resultando em aumento de faltas ao trabalho e à escola, incapacidade de realizar tarefas domésticas e restrição de atividades sociais (SONG et al., 2014).

1.2. Características fenotípicas da asma

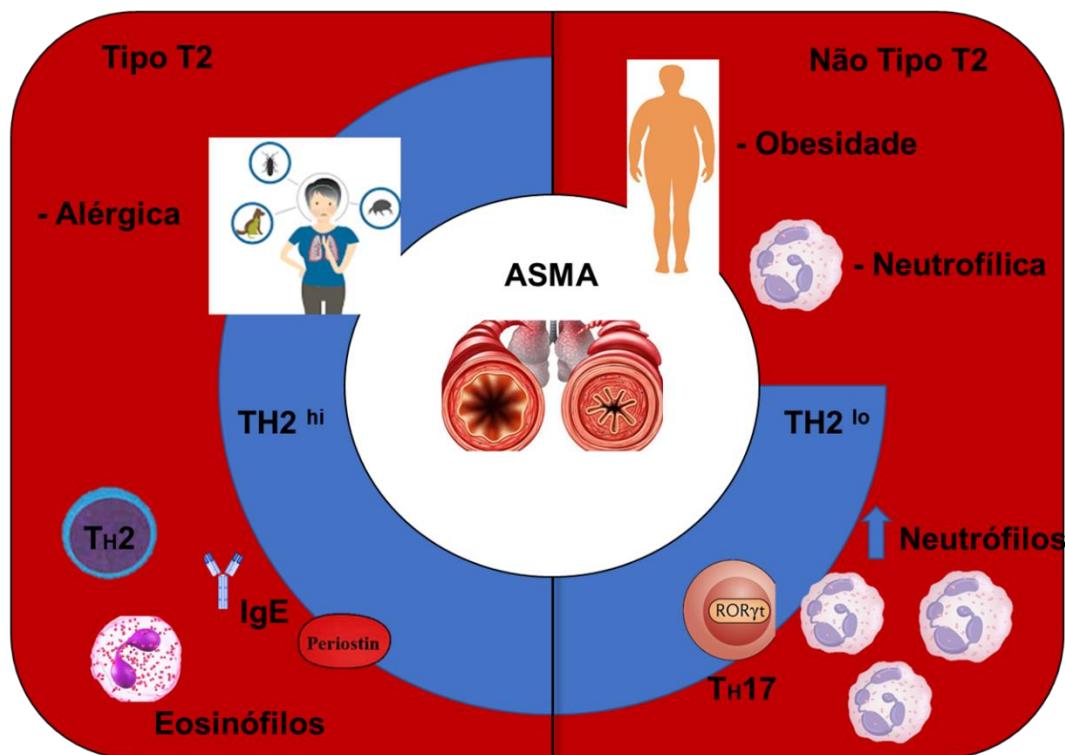
Um fenótipo é definido como o conjunto de características visíveis de um indivíduo resultante da interação de seu genótipo com o meio ambiente. Os fenótipos da asma caem em várias categorias, como características tratáveis ou intratáveis, parâmetros mensuráveis, preditores de risco ou da melhora dos pacientes. Esses fenótipos são usados para a atual gestão clínica estratificada da doença. Contudo, fenótipos não necessariamente se relacionam ou fornecem *insights* sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes que são descritos como os endotipos da asma (AGACHE; AKDIS, 2016; WENZEL, 2006).

A fenotipagem da asma é necessária para uma abordagem mais precisa dos pacientes e uma melhor compreensão da diversidade dos fenômenos asmáticos. A heterogeneidade da asma pode ser vista nas suas diversas apresentações clínicas, diferentes respostas ao tratamento, diferentes características fisiopatológicas, bem como achados que tentam entender os vários mecanismos patogênicos, que levam aos seus múltiplos fenótipos (AGACHE; AKDIS; VIRCHOW et al., 2012). Fenótipos de asma compreendem grupos de pacientes caracterizados por características clínicas ou biológicas semelhantes. O início precoce da asma é tipicamente associado aos fenótipos alérgicos e ainda é o perfil mais extensivamente investigado (FAJT; WENZEL, 2015).

Estes fenótipos de asma podem ser divididos em dois tipos principais,

considerando a existência da inflamação eosinofílica e da sensibilização alérgica, ou a total independência da participação da imunoglobulina E (IgE) (MIRANDA et al., 2004; NAIR, 2013). Por mais que não tenhamos um consenso sobre as características fenotípicas gerais da asma, a mais aceita, atualmente, baseia-se na fase da vida (infância ou fase adulta) em que os sintomas se apresentarem e na posterior caracterização dos seus respectivos endotipos. Assim, na asma tipo T2 (TH2^{hi}), os subfenótipos de início precoce são costumeiramente direcionados para a asma alérgica, enquanto na asma não tipo T2 (TH2^{lo}) destacam-se subfenótipos como, a asma neutrofílica e asma associada a obesidade (Figura 1) (FAHY, 2015; GINA, 2019; HOLGATE et al., 2015; WENZEL, 2012).

Figura 1. Fenótipos e endotipos da asma.



Fenótipos e endotipos da asma: As características fenotípicas do processo asmático, costumeiramente podem ser sumarizadas com a asma Tipo T2 (Alérgica) e NãoTipo T2 (Associada a obesidade e/ou neutrofílica). Junto aos fenótipos, temos também os endotipos da asma: TH2^{hi} e TH2^{lo} . Essa subdivisão sintetiza a expressão de substâncias e a presença de células imunológicas dentro do espectro TH2^{hi} (citocinas TH2 como a IL-4, eosinófilos, IgE, periostina) e TH2^{lo} (Aumento de neutrófilos e linfócitos TH17). Fonte: Galvão, 2022.

1.3. Fisiopatologia da asma

O endotipo da asma alérgica eosinofílica é caracterizado por apresentar uma resposta predominante T_{H2}^{hi} . Logo, a sua fisiopatologia associa-se diretamente a mecanismos moleculares e celulares da inflamação das vias aéreas, semelhantes aos que dão início a grande parte dos distúrbios inflamatórios alérgicos. No entanto, diferente dos processos alérgicos mais brandos, a manutenção do evento inflamatório T_{H2} durante a asma, desencadeia uma inflamação crônica e a perda da função tecidual das vias aéreas inferiores. Sabe-se assim, que a asma alérgica é amplamente dependente da sensibilização pela IgE (MIRANDA et al., 2004). O primeiro contato do organismo com o alérgeno inalado – proteínas de ácaros presentes na poeira doméstica, ou no pelo de animais e no pólen de flores – ocorre com o auxílio do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e de moléculas co-estimulatórias presente nas células dendríticas (CDs) (LLOYD et al., 2010).

Essa entrada desencadeia a ativação das células do epitélio respiratório, promovendo a liberação de citocinas locais que recebem o nome de alarminas. Dentre elas temos a IL-33 e a Linfopoetina do Estroma Tímico (TSLP) (EIFAN et al., 2012; HAENUKI et al., 2012). As alarminas atuam em células intraepiteliais ou subepiteliais do tecido respiratório, como as células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2). A ativação das ILC2, produz citocinas clássicas da resposta tipo 2 como a IL-13 e a IL-5 (LICONA-LIMÓN et al., 2013; NASR et al., 2017). As alarminas também atuam nas células apresentadoras de抗ígenos (APCs), destacando-se as próprias células dendríticas, que são essenciais para o processo de polarização do perfil T_{H2} (LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019; MELUM et al., 2014; SALVATI et al., 2021).

As CDs capturam o alérgeno e, ativadas pelas alarminas, dirigem-se para os linfonodos de drenagem, onde apresentam os peptídeos alergênicos via MHC-II, para os linfócitos T_{CD4^+} *naive* ou virgens. Na presença de IL-4, temos o início da polarização T_{H2}^{hi} . Os linfócitos T_{CD4^+} *naive* (T_{H0}) começam a polarizar para a subpopulação T_{H2} , com ativação dos fatores de transcrição GATA-3 (fator de transcrição de ação trans específicos de células T do tipo 3) e STAT6 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 6) (HOLGATE et al., 2015). Os linfócitos T_{H2} passam a produzir as citocinas clássicas (IL-4, IL-13 e IL-5), com o auxílio da ativação de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) como a p38 e a ERK1/2 e de fatores

transcricionais como o NF- κ B que estão diretamente associados ao GATA-3 (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; KHORASANIZADEH et al., 2017; SCHULIGA; MICHAEL, 2015; TULLY et al., 2013).

Durante o início dos eventos asmáticos, IL-4 não é apenas produzida a partir da diferenciação de células TH2, mas também por linfócitos NKT, basófilos, mastócitos e eosinófilos (VAN PANHUYSEN et al., 2011). A sua produção regula um sinal que ativa a transcrição de IL4, graças a fatores de transcrição TH2 como o GATA-3 e o STAT6. Assim, a longa jornada de polarização, termina com a manutenção da identidade das células do endotipo TH2^{hi} que foram diferenciadas no processo de manutenção com a ajuda do GATA-3 (ZHU et al., 2002).

A IL-4 e IL-13 compartilham receptores celulares e ativam os linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos como as imunoglobulinas E (IgE)-alérgeno específica. Assim, a IgE-alérgeno específica se liga aos receptores de alta afinidade I (FcεRI) presentes na membrana de mastócitos teciduais e basófilos e eosinófilos circulantes, finalizando o processo que é denominado de sensibilização alérgica (GOULD; SUTTON, 2008; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; WYNN, 2015).

Após um segundo contato, o alérgeno se ligará diretamente ao complexo IgE-FcεRI, ancorado na membrana de mastócitos teciduais e basófilos. Via ligação cruzada esse contato provoca a ativação celular com liberação dos grânulos contendo mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, as prostaglandinas e os leucotrienos (BOULET, 2018). Os mastócitos residem próximo a superfície da mucosa e de vasos sanguíneos (GURISH; AUSTEN, 2012), já os basófilos se apresentam na corrente sanguínea, o que ajuda na amplificação dos sinais inflamatórios liberados durante o segundo contato (YOSHIMOTO et al., 2009).

Uma rede complexa de células, citocinas e quimiocinas se mobilizam para sustentar os eventos tardios do endotipo TH2^{hi}. Por exemplo, a IL-4 apresenta um papel essencial na polarização do perfil TH2, atuando como marcador positivo na manutenção da resposta tipo 2 (GOUR; WILLS-KARP, 2015; WYNN, 2015), enquanto a sinalização de IL-1 está diretamente envolvida em vários aspectos do remodelamento das vias aéreas. Isso inclui ativação do músculo liso e hiperreatividade das vias áreias (AHR) na asma, bem como hipersecreção crônica de muco e produção anormal de proteínas da matriz extracelular (MEC). IL-1α e β também são conhecidas por contribuir para a inflamação TH2 na asma através da ativação e

recrutamento de eosinófilos, mastócitos, CDs e outras células inflamatórias. As concentrações de IL-1 β costumeiramente estão aumentadas na expectoração e no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) de pacientes com asma sintomáticos em comparação com asmáticos assintomáticos (BROIDE et al., 1992; THOMAS; CHHABRA, 2003).

Adicionalmente, o compartilhamento de receptores celulares indica que a IL-4 e IL-13, possuem papel fundamental na amplificação do processo inflamatório tecidual na asma, ativando os macrófagos tipo 2 (M2) no epitélio respiratório. Os M2 produzem o TGF- β (fator de transformação do crescimento β), citocina pró-inflamatória responsável por estimular a produção de fibras colágenas pelos fibroblastos. Essas fibras se depositam nas vias áreas, produzindo uma fibrose tecidual e estimulando o remodelamento tecidual com espessamento cada vez mais acentuado da MEC (BAGNASCO et al., 2016; GOUR; WILLS-KARP, 2015; HOLGATE et al., 2015).

Além do TGF- β , a própria IL-4 também ativa diretamente os fibroblastos o que reforça a hiperprodução de colágeno nas vias áreas. Nas células musculares lisas, essas citocinas participamativamente no processo de hipertrofia e/ou hiperplasia muscular, levando a um quadro de AHR ou hiper-reatividade brônquica (BHR) (BOULET, 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015). Já a IL-13, outra citocina do perfil TH2^{hi}, promove uma hipersecreção de mucinas, consequência de uma hiperplasia das células caliciformes nas vias áreas (BARLOW et al., 2012; GOUR; WILLS-KARP, 2015).

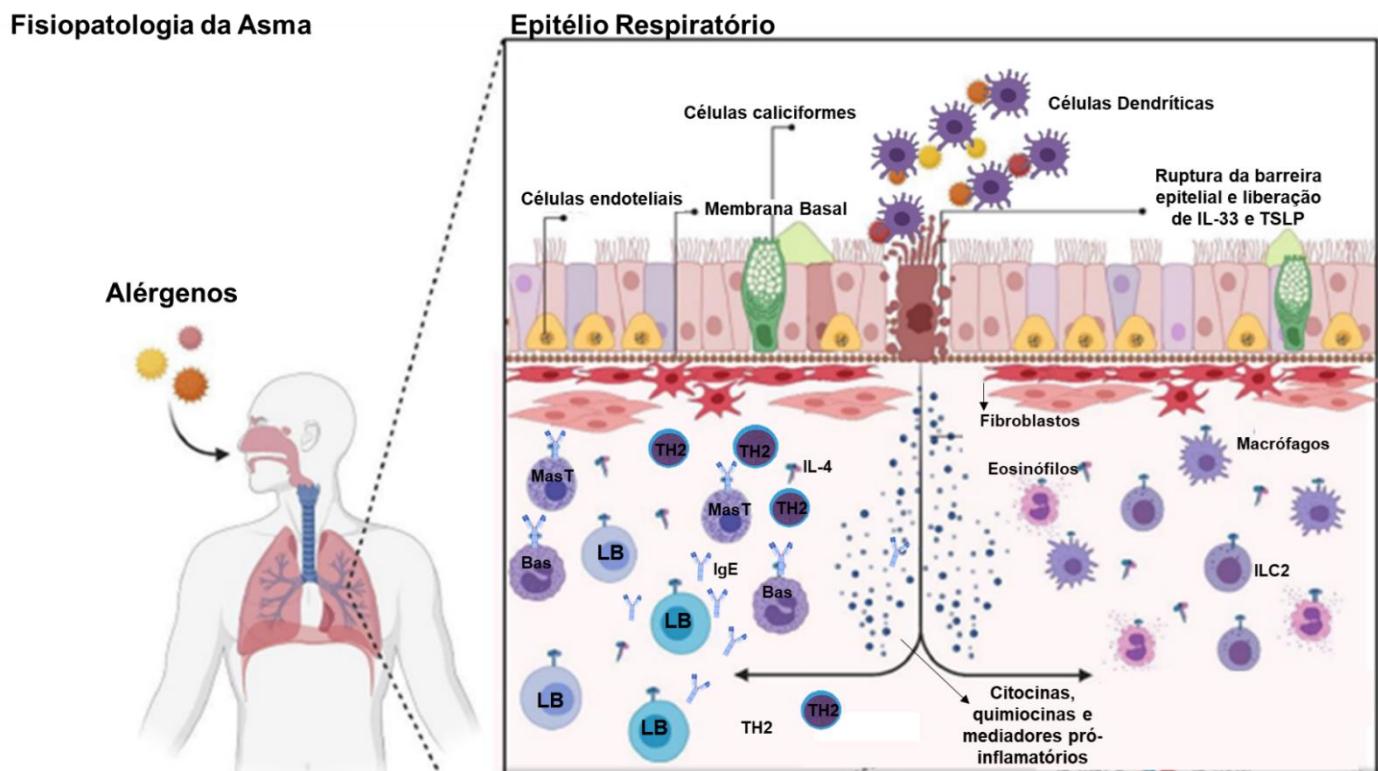
O TGF- β derivado de eosinófilos ativa a liberação de fibroblastos e proteínas da matriz, provocando o espessamento da membrana basal reticular e associando à inflamação eosinofílica na asma (BRIGHTLING et al., 2003; ELTBOLI et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2008). Os eosinófilos ainda, apresentam a capacidade de apresentar os alérgenos aos linfócitos T (BARNES, 2008; VAN RIJT et al., 2003) e os que se infiltram nas mucosas das vias aéreas têm a capacidade de fixar IgEs nas suas membranas e respondem ao contato com o alérgeno liberando mediadores inflamatórios que atuam na manutenção da resposta imune tipo 2 (BOULET, 2018; FAJT; WENZEL, 2015).

Finalizando a instalação da inflamação crônica o TNF- α possui importantes efeitos biológicos na inflamação e remodelação das vias aéreas e pode promover lesão do epitélio das vias aéreas e hiperresponsividade das vias aéreas (KIM et al., 2008; BROEKMAN et al., 2016). Além disso, o TNF- α em sua forma solúvel pode

estimular a indução de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e IL-8 (BRIGHTLING; BERRY; AMRANI, 2008). Portanto, o TNF- α acaba sendo um mediador crítico para a avaliação inflamação das vias aéreas. Por exemplo, em quadros de crise aguda, o TNF- α promove principalmente a inflamação e diminui a função ventilatória pulmonar (Figura 2) (LEE et al., 2016).

Figura 2. Fisiopatologia da asma.

Fisiopatologia da Asma

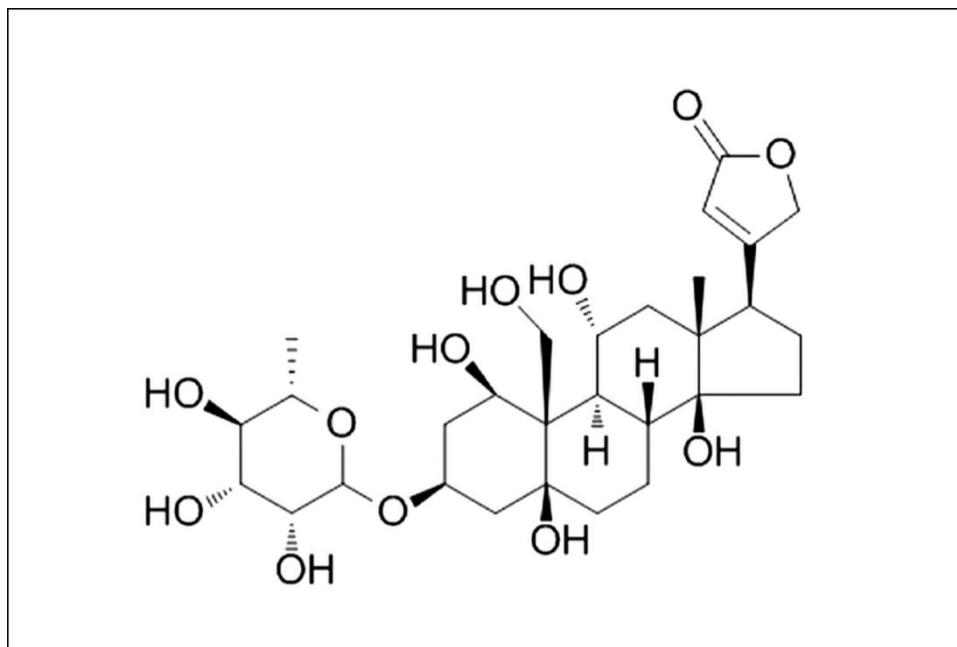


Fisiopatologia da asma: Durante o primeiro contato com o alérgeno, APC's como as células dendríticas levam a substância para as vias aéreas inferiores. A entrada e ruptura epitelial, libera diversas citocinas pró-inflamatórias como a IL-33 e o TSLP. A apresentação antigênica para os linfócitos naïve (TH0) se dá nos linfonodos de drenagem abaixo do epitélio. Nela, temos o início da polarização TH2, com o estímulo da produção de IL-4, eosinopoiese, troca de isotipo para IgE pelos linfócitos B e a sensibilização de basófilos e mastócitos. Durante o segundo contato, a degranulação das células sensibilizadas, liberará citocinas pró-inflamatórias que sustentarão todo o processo asmático e sua cronicidade. Dentre os eventos envolvidos temos, o remodelamento tecidual pelos fibroblastos. Bas (Basófilo), IgE (Imunoglobulina E), ILC2 (células linfoïdes inatas do grupo 2), IL-4 (Interleucina 4), IL-33 (Interleucina 33), LB (Linfócito B), MasT (Mastócito), TH2 (Linfócito TH2), TSLP (Linfopoetina do Estroma Tímico). Fonte: Galvão, 2022.

1.4. A ouabaína como uma substância imunomoduladora

Esteroides cardiotônicos, como a ouabaína e a digoxina, são ligantes naturais da Na⁺/K⁺-ATPase que através de uma ação dose-dependente, modulam eventos moleculares responsáveis pelo controle dos níveis de sódio (homeostase do sódio) e a liberação de mediadores inflamatórios (XIE; ASKARI, 2002). A ouabaína é um esteroide cardiotônico (Figura 3) identificado por Hamlyn e colaboradores (1991) no plasma de mamíferos. Estudos posteriores mostraram que a ouabaína pode ser produzida pela glândula adrenal, hipotálamo e pela hipófise, sendo considerada um hormônio (FERRANDI et al., 1997; PAMNANI et al., 1981). Em relação à adrenal, a síntese de ouabaína parece ocorrer na zona glomerulosa do córtex (LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1995), sendo sua liberação estimulada pela angiotensina II (ANG II) ou pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1994).

Figura 3. Estrutura química da ouabaína.



Fonte: PIVOVAROV; CALAHORRO; WALKER, 2018.

Altos níveis circulantes de ouabaína também foram encontrados em pacientes com disfunções cardiovasculares, como hipertensão, assim como em modelos experimentais de hipertensão em ratos (HUANG; LEENEN, 1996; SCHONER, 2000). Além disso, já foi demonstrado que a ouabaína participa da resposta do organismo ao estresse agudo (GOTO et al., 1995).

A Na⁺/K⁺-ATPase é o único receptor estabelecido para os esteroides cardiotônicos como a ouabaína, que interage com aminoácidos localizados nas alças extracelulares da subunidade α da enzima (DVELA et al., 2007). As ações moduladoras deste receptor recaem tanto sobre o equilíbrio iônico celular, alterando diferentes funções celulares, como na migração celular (WARD; BECKER, 1970), mas também como um importante transdutor de sinal (FAN; XIE; TIAN, 2017; LI; XIE, 2009). Estudos demonstraram que baixas concentrações circulantes de ouabaína, insuficientes para inibir o transporte de sódio e potássio, e consequentemente alterar o potencial de membrana plasmática, foram capazes de promover alterações conformacionais na estrutura da Na⁺/K⁺-ATPase. Este processo, por sua vez, favoreceu a dissociação da bomba de sódio e potássio com a proteína cinase Src e, desta forma, resultou na modulação de vias de sinalização que regulam processos como crescimento, proliferação celular (BARWE et al., 2005); apoptose (WANG et al., 2003).

Diferentes estudos evidenciaram o papel imunomodulador da ouabaína tanto em células da imunidade inata como da imunidade adaptativa (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009; CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). As pesquisas no início dos anos 60 demonstraram que a ouabaína inibe a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos (fito-hemaglutinina - PHA). Posteriormente, observou-se que este efeito se repetia utilizando outros estímulos, como éster de forbol (BRODIE et al., 1995; OLEJ et al., 1994) anti-CD3 (SZAMEL et al., 1995), ionóforo de cálcio (JENSEN, WINGER; NOWELL, 1977) e interleucina 2 (IL-2) (REDONDO; RIVAS; FRESNO, 1986).

No entanto, apesar do efeito inibitório sobre a proliferação linfocitária, as células estimuladas com PHA e tratadas com ouabaína apresentavam CD69, uma molécula expressa precocemente e relacionada ao processo de ativação celular (AUSSEL et al., 1996; PIRES et al., 1997), indicando que elas eram responsivas aos estímulos, porém não conseguiam prosseguir no ciclo celular. Esse efeito ocorria, em parte, pela inibição da expressão de CD25 e/ou liberação de IL-2 (OLEJ et al., 1994; SZAMEL et al., 1995). A redução da IL-2 induzida por ouabaína também diminui o número de linfócitos T reguladores em camundongos (SILVA et al., 2019). A ouabaína também interfere na maturação de células dendríticas (NASCIMENTO et al., 2014), células fundamentais para resposta de linfócitos T.

Apesar do seu efeito anti-proliferativo, foi demonstrado que a ouabaína não interfere no efeito citotóxico de células NK (*natural killer*) (MORAES et al., 1989) e células LAK (*lymphokine-activated killer*) (OLEJ et al., 1994). Além disso, evidenciou-

se também que a ouabaína modula negativamente a maturação (DE PAIVA et al., 2011) e a dinâmica (SILVA et al., 2016) dos linfócitos B.

A ouabaína estimula o aumento da expressão da molécula CD69 em timócitos (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). Além disto, estas células expostas à ouabaína e ao mitógeno ConA mostram diminuição dos níveis de NFATc, fator nuclear das células T ativadas, e da fosforilação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008). Ademais, estudos apontam que a ouabaína atua sinergicamente com glicocorticoides para induzir atrofia tímica (RODRIGUES-MASCARENHAS; SANTOS; RUMJANEK, 2006).

Em monócitos humanos a ouabaína regula negativamente a expressão de mCD14, uma molécula de superfície envolvida na resposta contra bactérias Gram-negativas, por meio da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e da MAPK p38 (VALENTE et al., 2009). Além disto, monócitos tratados com ouabaína apresentam níveis elevados de CD69, HLA DR, CD86 e CD80, marcadores de ativação celular, além de aumentar a capacidade fagocítica dessas células (TEIXEIRA; RUMJANEK, 2014).

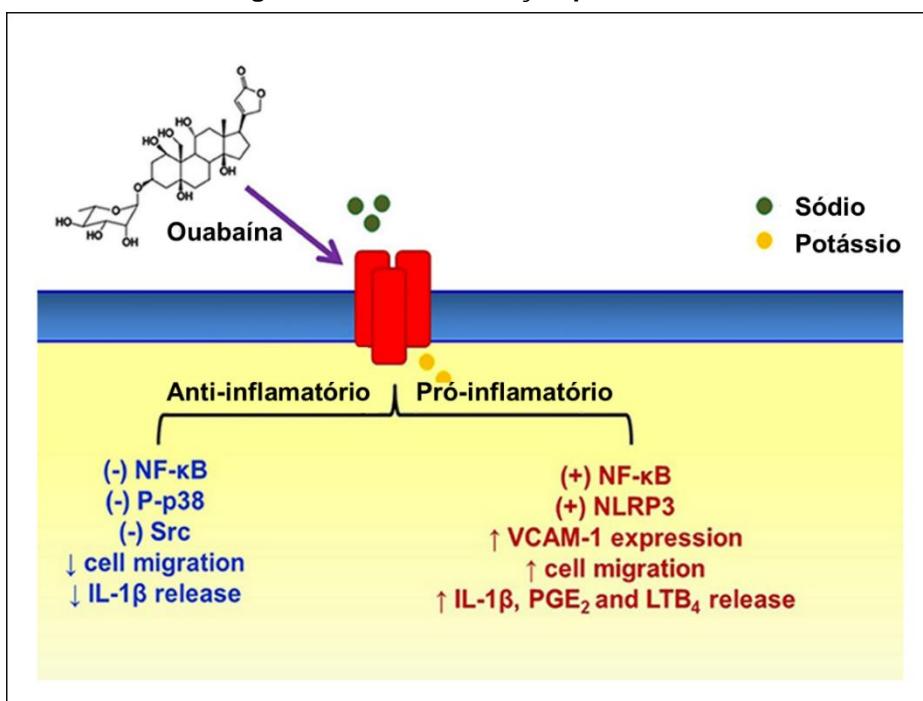
O efeito da ouabaína sobre a produção de citocinas depende do estado de ativação celular. Na ausência de estímulos, a ouabaína pode induzir a produção das citocinas pró-infamatórias IL-1 β e TNF- α e diminuir a produção de IL-6 em monócitos (FOEY; CRAWFORD; HALL, 1997). No entanto, quando estes são estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), o tratamento com ouabaína reduz os níveis dessas três citocinas (MATSUMORI et al., 1997).

Nosso grupo vem demonstrando que ouabaína e outros esteroides cardiotônicos (ex.: marinobufagina) (CARVALHO et al., 2019), em baixas doses apresentam efeito anti-inflamatório em diversos modelos, com redução da migração de células para o sítio inflamado, modulação de fatores de transcrição e síntese de citocinas (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). VASCONCELOS e colaboradores (2011) demonstraram que o edema de pata induzido por zimosan, carragenina, PGE₂, bradicinina e pelo composto 48/80 (desgranulador de mastócitos) é reduzido pelo tratamento intraperitoneal (0,56 mg/kg) com a ouabaína. Este efeito pode estar relacionado, em parte, com a redução da permeabilidade vascular induzida por esse hormônio (LEITE et al., 2015). Além disso, já foi demonstrada a capacidade deste esteroide em modular a nocicepção em modelos de dor inflamatória (VASCONCELOS et al., 2011).

Utilizando diferentes estímulos nosso grupo demonstrou que a ouabaína reduz a

migração de neutrófilos induzida por zimosan (LEITE et al., 2015), *L. amazonensis* (JACOB et al., 2013), inflamação pulmonar alérgica (GALVÃO et al., 2017) e LPS (SILVA, 2016). Outros grupos também demonstraram o efeito inibitório da ouabaína sobre a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (WARD; BECKER, 1970; RAY; SAMANTA, 1997). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a ouabaína atua para reduzir a migração neutrofílica. Recentemente, demonstramos que a ouabaína reduz a expressão de CD18 ($\beta 2$ -integrina) em neutrófilos, sem interferir na expressão de CXCR2 e na viabilidade dessas células (Figura 4) (CAVALCANTE-SILVA et al., 2019).

Figura 4. Imunomodulação pela ouabaína.



Imunomodulação pela ouabaína: Alguns eventos celulares e moleculares modulados pela ouabaína em processos inflamatórios. Os efeitos duais da ouabaína (pró e anti-inflamatório) dependem de algumas condições, como concentração da substância, tipo de célula, modelo experimental e até mesmo estado funcional. Este hormônio esteroide pode modular algumas vias de sinalização celular devido à ligação com a Na⁺/K⁺-ATPase, o que não significa necessariamente a inibição da bomba. (+) ativação; (-) inibição; ↑ aumento; ↓ diminuição; cell migration (migração celular); expression (expressão); release (liberação). Fonte: Adaptado de CAVALCANTE-SILVA et al., 2017.

Foi demonstrado ainda que a ouabaína reduz a resposta inflamatória desencadeada pela infecção causada por *Leishmania amazonensis* em camundongos (JACOB et al., 2013), reduzindo os níveis de interferon γ (IFN- γ). Adicionalmente, foi demonstrado que ouabaína reduz os níveis de TNF- α e IL-1 β em modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan. Esse efeito está associado à redução da translocação do fator nuclear κB (NF-κB) para o núcleo (LEITE et al., 2015).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a ouabaína atenua a inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA) (GALVÃO et al., 2017). Nesse contexto, o potencial imunomodulador da ouabaína justifica a investigação de sua ação anti-inflamatória num modelo crônico e persistente, com presença de remodelamento tecidual e que mimetize o endotípico TH2^{hi}, presente na asma.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o efeito do tratamento com a ouabaína sob os parâmetros celulares, endoteliais e histológicos característicos do modelo de asma T_{H2}^{hi} .

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito da ouabaína na migração de células totais e diferenciais para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) no modelo de asma;
- Estudar a ação da ouabaína sobre a produção de imunoglobulina E total e imunoglobulina E-ovalbumina específica;
- Elucidar a ação da ouabaína sob a produção das citocinas características do processo asmático do tipo T2 como IL-33, TSLP, IL-4, IL-1 β , TGF- β e TNF- α ;
- Mensurar as alterações histopatológicas: infiltrado celular, produção de muco e o remodelamento tecidual;
- Determinar se os possíveis efeitos imunomodulatórios da ouabaína estão associados a mecanismos de transduções de sinal intracelular envolvendo a MAPK p38.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Para a realização desse trabalho foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas com idade de sete semanas, pesando de 18 a 22g e. Os animais foram mantidos a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas com livre acesso à água e a uma dieta controlada, sendo provenientes do biotério Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM/UFPB e seu uso aprovado pela Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA) sob a certidão de número 100/2016 (ANEXO 1).

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=7): o grupo Salina representando os animais saudáveis e não sensibilizados com ovalbumina (OVA); o grupo OVA representando os animais sensibilizados e desafiados com OVA; o grupo budesonida (BUD) de animais sensibilizados com OVA e tratados com a droga padrão budesonida (350 µg/kg) e o grupo ouabaína (OUA) de animais sensibilizados com OVA e tratados com a substância teste ouabaína (0,56 mg/kg).

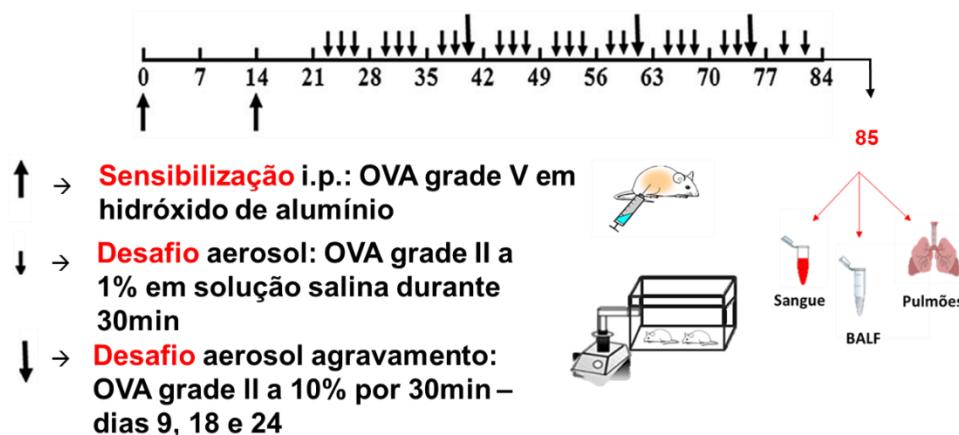
3.3. Protocolo experimental de asma (Consertar As informações de tratamento)

Camundongos BALB/c fêmeas dos grupos OVA, BUD e OUA foram sensibilizados com 10µL/g de uma suspensão contendo 50 µg/mL de OVA grade V e 10 mg/mL de hidróxido de alumínio em solução salina por via intraperitoneal (i.p.) nos dias 0 e 14 do protocolo. A partir do dia 21 os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II a 1% em solução salina durante 30 minutos, três vezes por semana ao longo de nove semanas. Para garantir o agravamento do processo asmático no 9º, 18º e 24º dia, os camundongos foram desafiados durante 30 minutos com aerossol de OVA grade II a 10% em solução salina (GUO et al, 2013). Após 24 horas do último desafio com OVA (dia 85) os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (xilazina 20 a 30 mg/kg + quetamina 200 a 300 mg/kg) e as coletas do fluido do lavado broncoalveolar (BALF), do sangue e dos pulmões foram realizadas (XIE et al., 2014)

(Figura 5).

Figura 5. Esquema representativo do modelo experimental de asma. (adicionar a oua 1 hora antes de cada desafio)

Protocolo experimental de asma grave



3.4. Quantificação da celularidade

A celularidade foi quantificada no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) que foram coletados no 85º dia do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio. O BALF foi coletado com 1,5 mL de PBS+/- gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia o fluido foi transferido para tubos tipo eppendorf e armazenado em isopor refrigerado. A contagem do número total de células no BALF foi realizada em câmara hemocitométrica (Neubauer). O BALF foi diluído (1:4) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ). Para tal, em 10µL do BALF foi adicionado 30 µL de Turk; a contagem das células totais foi realizada no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS).

Após a contagem das células totais, os tubos foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 300 g, em uma temperatura de 4 °C, por seis minutos. Os sobrenadantes foram separados e congelados no freezer a uma temperatura de - 20°C para posterior dosagem de citocinas. Para contagem diferencial, o pellet foi ressuspenso em 300µL de PBS+/- gelado. Logo após isso, foram retirados 200 µL do BALF para ser centrifugado em lâminas de citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia

óptica. Cada lâmina foi analisada até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram divididos em quatro classes: macrófagos; linfócitos; neutrófilos e eosinófilos.

3.5. Avaliação dos parâmetros histológicos pulmonares

Os pulmões dos camundongos foram coletados no dia do desfecho (85º dia) do protocolo de asma grave após a eutanásia por overdose anestésica. Os tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada a temperatura ambiente. O processamento histológico iniciou-se pela desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo com espessura de 4 μ m, adicionados em lâmina e desparafinizados. Os cortes aderidos na lâmina foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido Periódico – Schiff (PAS) ou Tricomico de Masson (TM) e analisadas em microscopia óptica (Motic BA 410). As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP. As análises morfométricas dos achados histológicos foram realizadas pelo software KS400.

Para a realização da técnica de morfometria utilizou-se os cortes histológicos corados pelo HE, TM e PAS. Estes foram visualizados pela objetiva de 40x e digitalizadas 20 imagens aleatórias através do mesmo microscópio e microcâmera, perfazendo uma área total de 281.872 mm² de parênquima pulmonar analisado em cada tipo de coloração. A área de HE e PAS positiva e a área corada pelo TM foram calculadas pelos algoritmos construídos no software KS400. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de azul (TM), roxo (PAS positiva) ou rosa (HE positiva) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μ m² (PRATA et al., 2017).

3.6. Quantificação de IgE e citocinas

O soro e o sobrenadante armazenados a -20°C foram utilizados para a quantificação de IgE (soro) e das citocinas IL-4, IL-33, TSLP, TGF-β, IL-1β, e TNF-α (sobrenadante), onde foi utilizado o teste imunoenzimático ELISA sanduíche, de acordo com o protocolo especificado no kit do fabricante (eBioscience, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). De forma resumida, placas de ELISA foram sensibilizadas com os anticorpos de captura e incubadas por 18 h (overnight) a 4 °C.

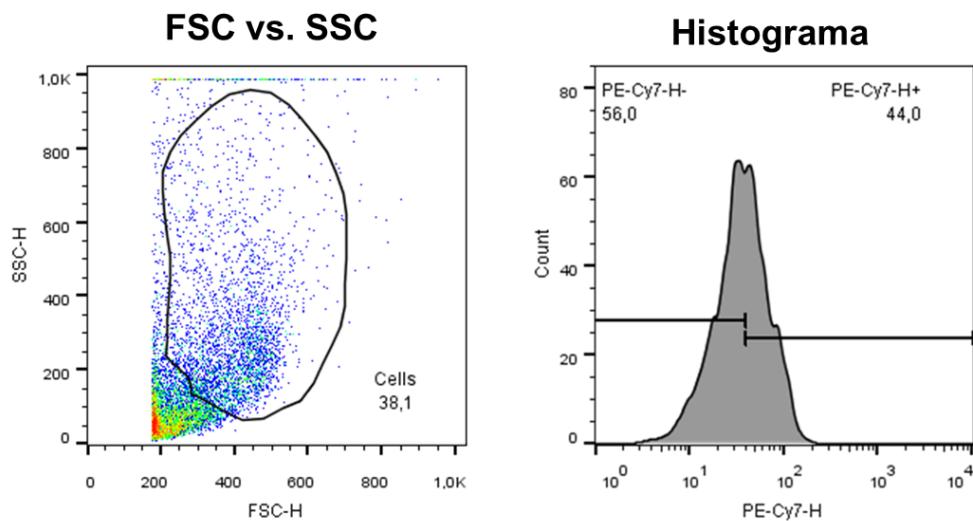
Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por 1 hora. Após esse período, lavou-se as placas e adicionou-se as amostras a serem analisadas incubando-as overnight a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas novamente e os anticorpos de detecção adicionados (1 h). Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionado. As placas foram incubadas por mais 30 min à temperatura ambiente e após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Após 15 minutos a reação foi interrompida com a solução de parada (ácido sulfúrico 1N) e a leitura realizada em leitor de microplaca utilizando um comprimento de onda de 450 nm.

3.7. Marcação celular da MAP quinase fosforilada p-p38 por citometria de fluxo.

A análise celular por citometria de fluxo permite a distinção de populações celulares heterogêneas a partir de parâmetros como “*forward-scattered light*” (FSC) e “*side-scattered light*” (SSC), os quais distinguirão as células pelo tamanho e granulosidade respectivamente. A avaliação da expressão da porção fosforilada da MAPK p-p38 foi realizada após a coleta do BALF. O lavado foi centrifugado, retirado o sobrenadante e ressuspenso em volume calculado para 5 x 10⁵ células/mL de PBS+/- gelado e destinado à análise dos parâmetros FSC e SSC no citômetro de fluxo (FACSCanto™ II) utilizando anticorpo específico e marcação fluorescente. O protocolo específico para marcação foi realizado de acordo com as normas do Kit do fabricante utilizado (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson*) e os dados foram gerados a partir da coleta de 10.000 eventos. A análise foi baseada na obtenção de um gráfico de tamanho (FSC) vs. granulosidade (SSC) no qual foi feito um gate na população de granulócitos excluindo os debrís. Posteriormente, a análise foi realizada de acordo com a porcentagem de células marcadas e com a intensidade de fluorescência emitida, através da geração de um gráfico do tipo histograma (Figura 6). Esses dados foram avaliados pelo software FlowJo versão 10.

Figura 6. Esquema representativo da estratégia de análise dos dados avaliados por citometria de fluxo.



Gate e histograma representativos: estratégia elaborado pelo autor para análise das subpopulações marcadas com p-p38.

3.8. Análise estatística.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 9.1 e valores com $p < 0,05$, considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Para analisar os dados do Citometro de Fluxo foi utilizado o programa FlowJo, versão 10. Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e a diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey e Dunnet.

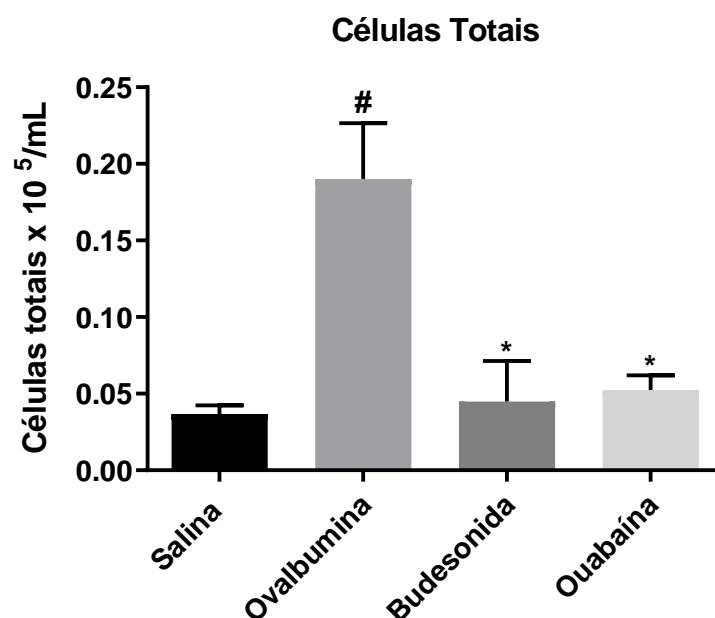
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da ouabaína na migração de células totais no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de asma.

No modelo de asma alérgica do tipo TH2^{hi} induzida por ovalbumina (OVA), espera-se um aumento na migração celular para o sítio inflamado (pulmões), em decorrência das sensibilizações e posteriores desafios realizados durante o protocolo (GUO et al, 2013). As células inflamatórias totais que migraram para o BALF estão expressas no **gráfico 1**. As sensibilizações e os desafios com o alérgeno proteico aumentaram significativamente o número de células totais no espaço broncoalveolar do grupo OVA quando comparado ao grupo salina ($0,19 \pm 0,018$ vs $0,0375 \pm 0,002$, com o $p < 0,05$). Na comparação da migração celular ocorrida no grupo OUA tratado com a ouabaína ($0,56$ mg/kg) em relação à ocorrida no grupo OVA, observou-se que o tratamento com a substância teste foi eficaz em reduzir a migração celular para o espaço broncoalveolar ($0,19 \pm 0,018$ vs $0,0525 \pm 0,004$, com $p < 0,05$), assim como o tratamento com a droga padrão budesonida (350 µg/kg) no grupo BUD ($0,19 \pm 0,018$ vs $0,0450 \pm 0,013$, com $p < 0,05$) (**gráfico 1**).

Gráfico 1. Avaliação do efeito da ouabaína sobre a migração de células totais para o fluido do lavado broncoalveolar.

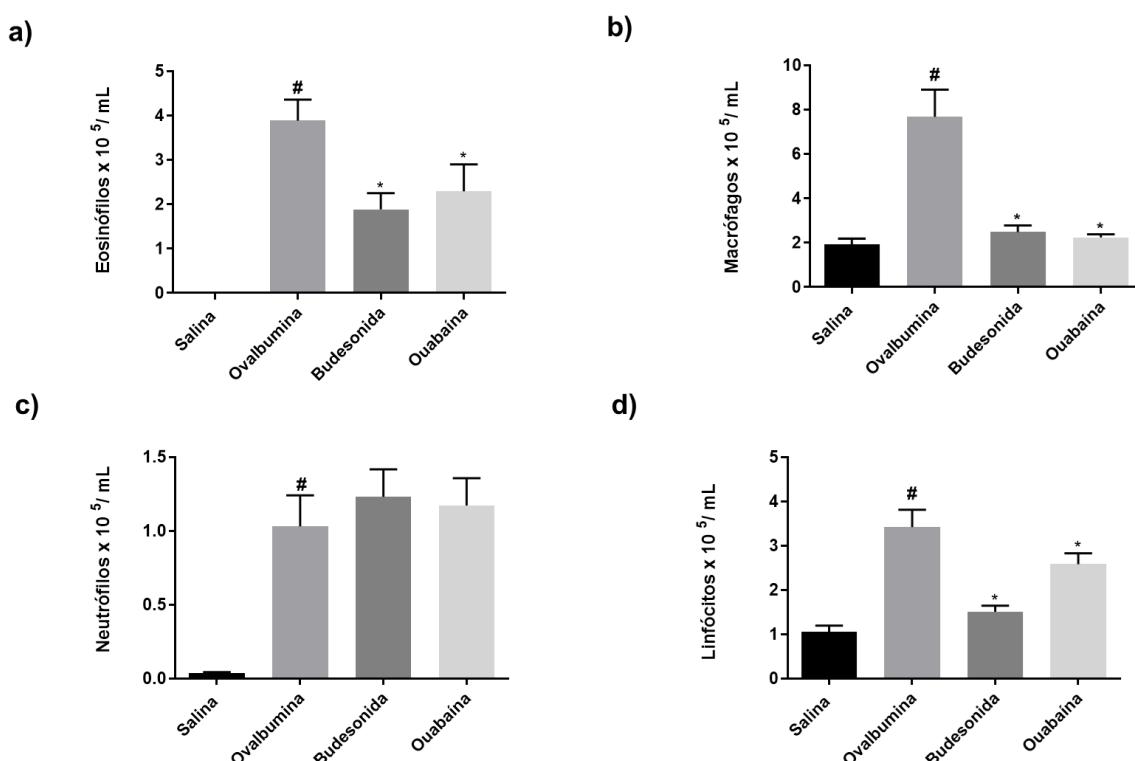


Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 μ g/kg) uma hora antes de cada desafio. O BALF dos animais foi coletado 24h após o último desafio e a migração de leucócitos foi quantificada em microscopia óptica comum. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey. Valores de ${}^{\#}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo salina, e ${}^{*}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

4.2. Efeito da ouabaína na migração de leucócitos diferenciais (eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos) no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de asma.

A migração das subpopulações de leucócitos diferenciais durante os eventos asmáticos do tipo T_{H2}^{hi} , é uma característica determinante para a avaliação das alterações de celularidade no protocolo executado. Com relação a essa contagem diferencial, observou-se migração de eosinófilos (**Gráfico 2a**), macrófagos (**Gráfico 2b**), neutrófilos (**Gráfico 2c**) e linfócitos (**Gráfico 2d**) para o BALF quanto comparamos o grupo ovalbumina com o grupo salina. O tratamento com a ouabaína reduziu a migração de eosinófilos em 37,6% ($p < 0,05$), de macrófagos em 69% ($p < 0,05$), de linfócitos em 29,6% ($p < 0,05$), porém não foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos.

Gráfico 2. Efeito da ouabaína sobre a migração de leucócitos diferenciais para o fluido do lavado broncoalveolar.



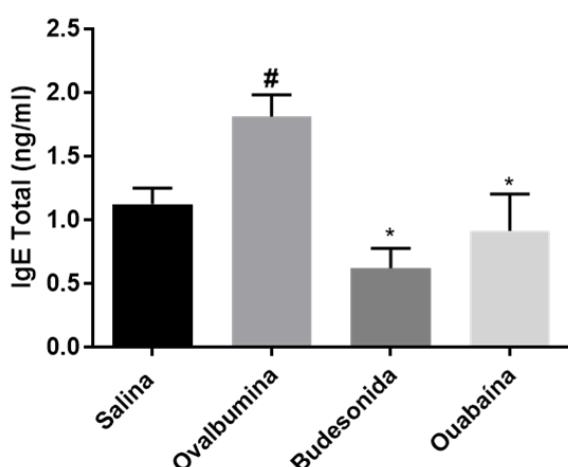
Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 µg/kg) uma hora antes de cada desafio. O BALF dos animais foi coletado 24h após o último desafio e a migração de leucócitos diferenciais foi quantificada em microscopia óptica comum. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey. Valores de ${}^{\#}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo salina, e ${}^{*}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

4.3. Efeito da ouabaína sobre a concentração de imunoglobulina E (IgE) total e de IgE-Ovalbumina específica no modelo de asma alérgica crônica, induzida por ovalbumina.

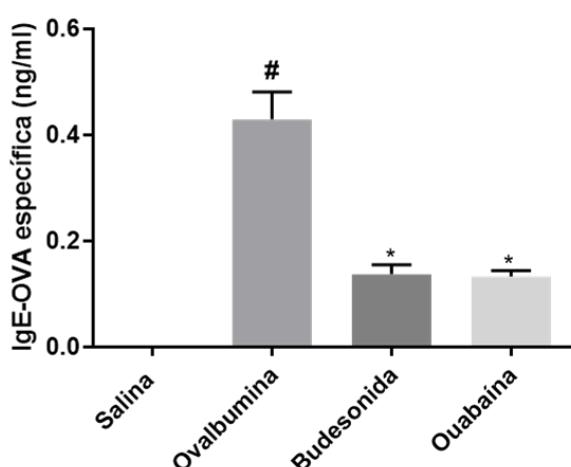
O **Gráfico 3a** demonstra que os animais do grupo ovalbumina, por serem expostos ao alérgeno, no primeiro momento durante a sensibilização e em seguida durante os desafios por aerossol, apresentaram um aumento significativo na produção de IgE total ($1,809 \pm 0,099$ vs $1,121 \pm 0,07$, com $p < 0,05$). O tratamento com a ouabaína durante os desafios foi capaz de reduzir a concentração de IgE total quanto comparado ao grupo OVA ($1,809 \pm 0,099$ vs $0,911 \pm 0,16$, com $p < 0,05$). A droga padrão budesonida também reduziu a concentração de IgE total ($1,809 \pm 0,099$ vs $0,9205 \pm 0,19$, com $p < 0,05$). A IgE-Ovalbumina específica (IgE-OVA), é um importante parâmetro para delimitar a sensibilização dos animais com o alérgeno utilizado no modelo experimental. Podemos observar no **gráfico 3b** que o tratamento com a ouabaína ($0,4293 \pm 0,13$ vs $0,2298 \pm 0,13$, com $p < 0,05$) e com a budesonida ($0,4293 \pm 0,13$ vs $0,2251 \pm 0,13$), reduziu as concentrações de IgE-OVA quando comparado ao grupo ovalbumina.

Gráfico 3. Avaliação do efeito da ouabaína sobre a concentração de IgE total e IgE-OVA específica no modelo de asma.

a)



b)

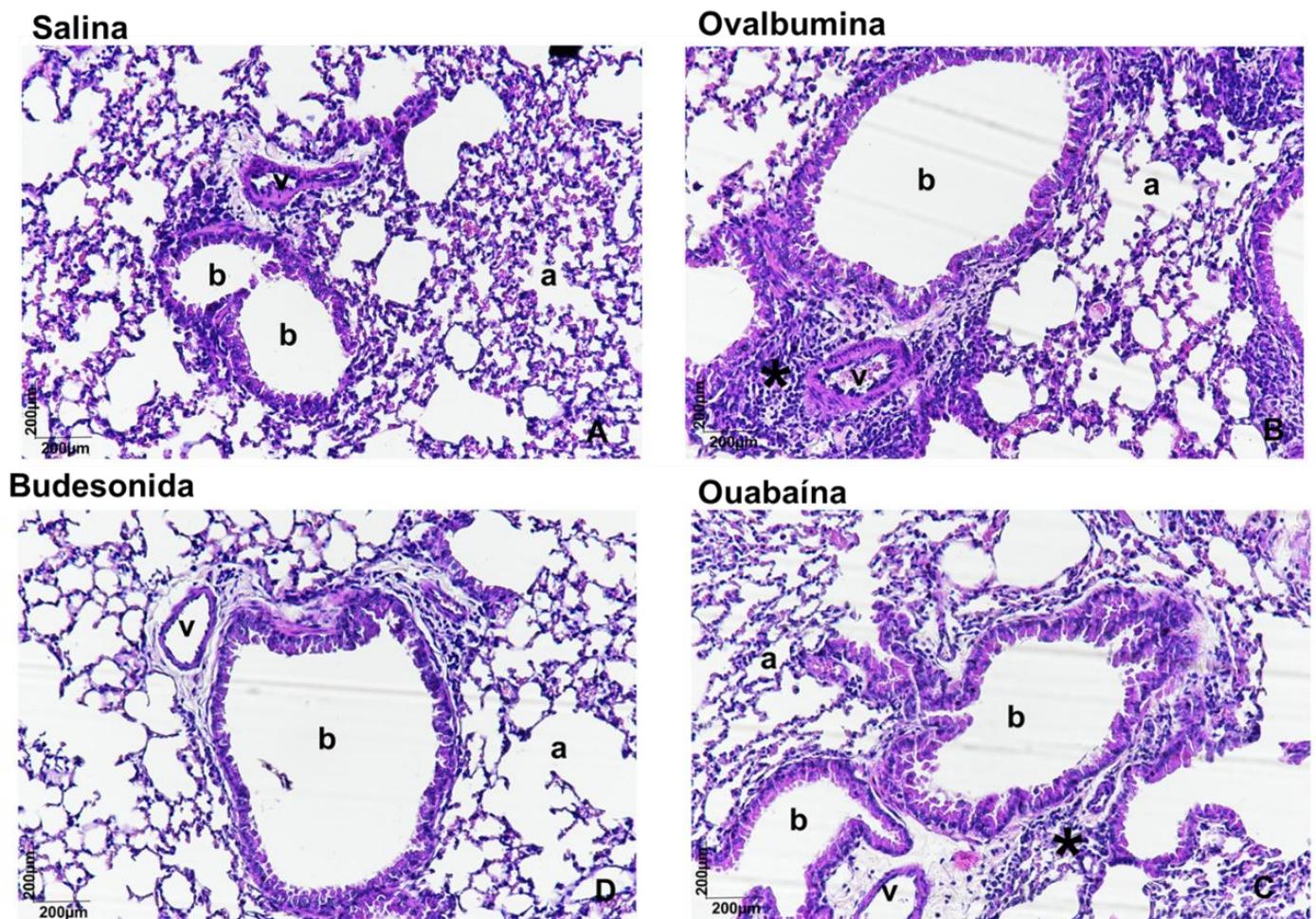


Camundongos BALB/c fêmeas (n=7) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 µg/kg) uma hora antes de cada desafio. 24 horas após o último desafio, coleta-se 1mL de sangue para obtenção do soro. O soro coletado foi utilizado no ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche) para quantificação da concentração total de IgE e de IgE-OVA específica. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Valores de #p < 0,05 foram considerados significativos quando comparados com o grupo salina, e *p < 0,05 foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

4.4. Efeito da ouabaína sobre os parâmetros histopatológicos característicos do modelo de asma.

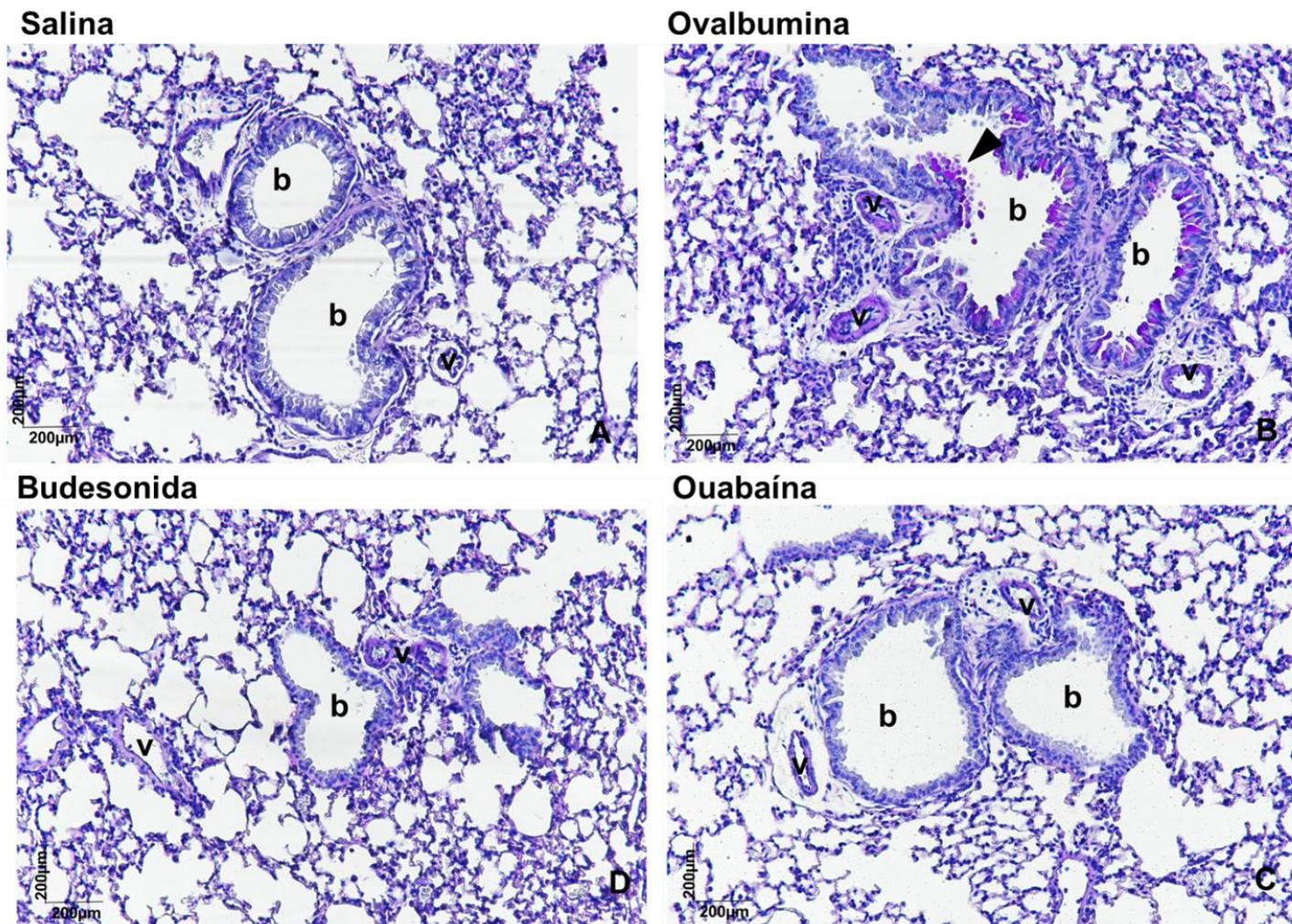
Os parâmetros histopatológicos pulmonares dos grupos experimentais estão demonstrados nos **Painéis 1, 2 e 3**, onde podemos observar respectivamente as variações de infiltrado celular (**Painel 1 – Coloração de Hematoxilina & Eosina**), hiperplasia das células caliciformes (**Painel 2 – Coloração de Ácido Periódico – Schiff**) e remodelamento tecidual (**Painel 3 – Coloração de Tricomico de Masson**). Os animais sensibilizados e desafiados com a ovalbumina no protocolo de 85 dias, apresentaram alterações histopatológicas que comprovam a instalação do processo asmático TH2^{hi}. Adicionalmente o tratamento com a ouabaína e com a droga padrão budesonida, foi capaz de diminuir a migração nas regiões perialveolares (**Gráfico 4a**), bem como a hiperprodução de muco (**Gráfico 4b**) e o processo de fibrose pulmonar (**Gráfico 4c**).

Painel 1. Efeito da ouabaína sobre os aspectos histopatológicos pulmonares no modelo experimental de asma grave, com a coloração de Hematoxilina & Eosina.



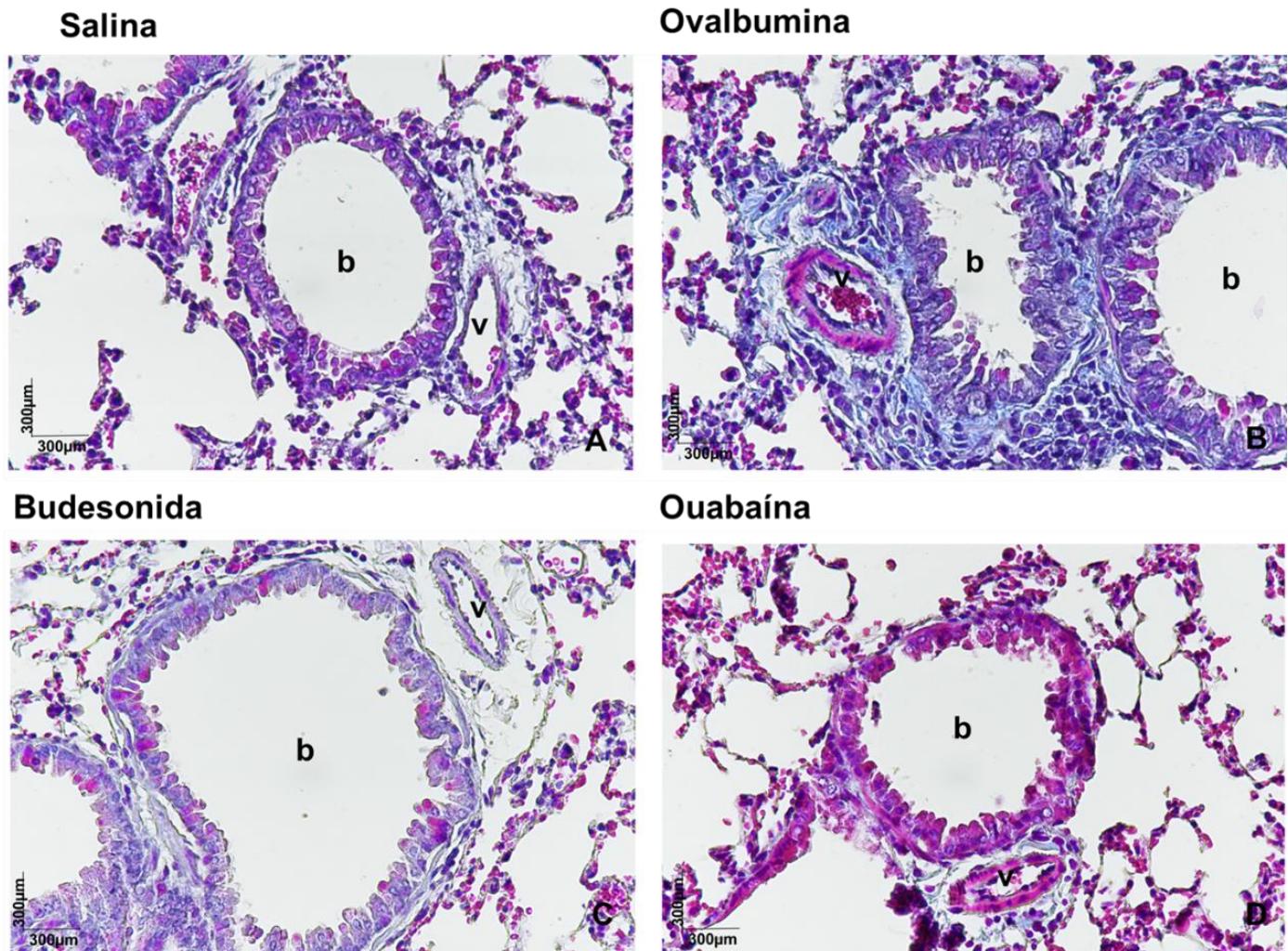
Painel 1: Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 µg/kg) uma hora antes de cada desafio. 24 horas após o último desafio, coleta-se os pulmões para determinação dos parâmetros histopatológicos. Os pulmões coletados foram utilizados para determinação dos marcadores teciduais da asma como infiltrado celular. Aumento de 20x. a (alvéolos); b (brônquios); v (vasos sanguíneos); *(infiltrado celular).

Painel 2. Efeito da ouabaína sobre a produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas, no modelo experimental de asma grave, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS).



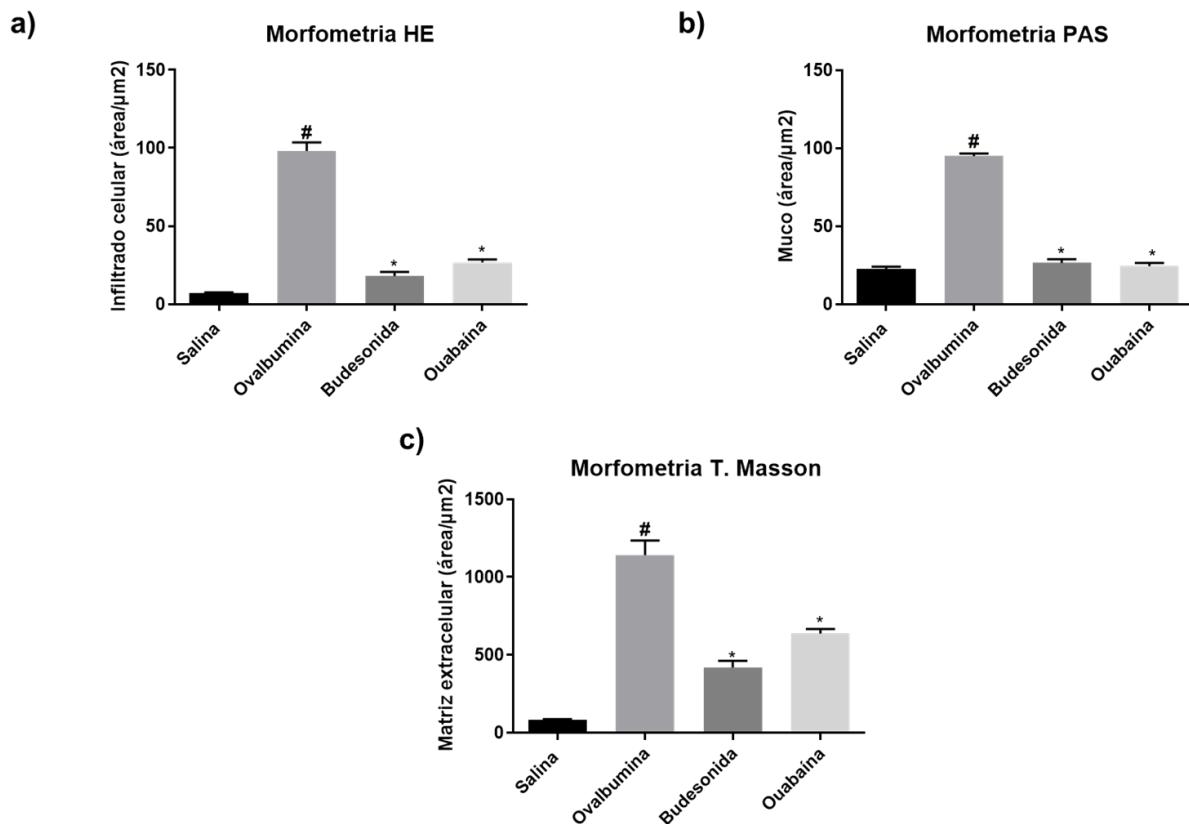
Painel 2: Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 μ g/kg) uma hora antes de cada desafio. 24 horas após o último desafio, coleta-se os pulmões para determinação dos parâmetros histopatológicos. Os pulmões coletados foram utilizados para determinação dos marcadores teciduais da asma como hiperplasia das células caliciformes com hiperprodução de muco. Aumento de 20x. b (brônquios); v (vasos sanguíneos).

Painel 3. Efeito da ouabaína sobre Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de asma grave, com a coloração de Tricomico de Masson (TM).



Painel 2: Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 µg/kg) uma hora antes de cada desafio. 24 horas após o último desafio, coleta-se os pulmões para determinação dos parâmetros histopatológicos. Os pulmões coletados foram utilizados para determinação dos marcadores teciduais da asma como hiperplasia das células caliciformes com remodelamento tecidual e fibrose. Aumento de 30x. b (brônquios); v (vasos sanguíneos).

Gráfico 4. Efeito da ouabaína sobre o infiltrado celular (coloração HE), hiperprodução de muco (coloração PAS) e hiperatividade brônquica com remodelamento tecidual (coloração de Tricomo de Masson), no modelo de asma.



Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 $\mu\text{g}/\text{kg}$) uma hora antes de cada desafio. 24 horas após o último desafio, coleta-se os pulmões para determinação dos parâmetros histopatológicos. Os pulmões coletados foram utilizados para determinação dos marcadores teciduais da asma como infiltrado celular, hiperprodução de muco e fibrose. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Valores de $\#p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo salina, e $*p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

4.5. Avaliação do efeito da ouabaína sobre a produção de citocinas IL-33, TSLP, IL-4, IL-1 β , TGF- β , e TNF- α no modelo de asma do tipo 2, induzida por ovalbumina.

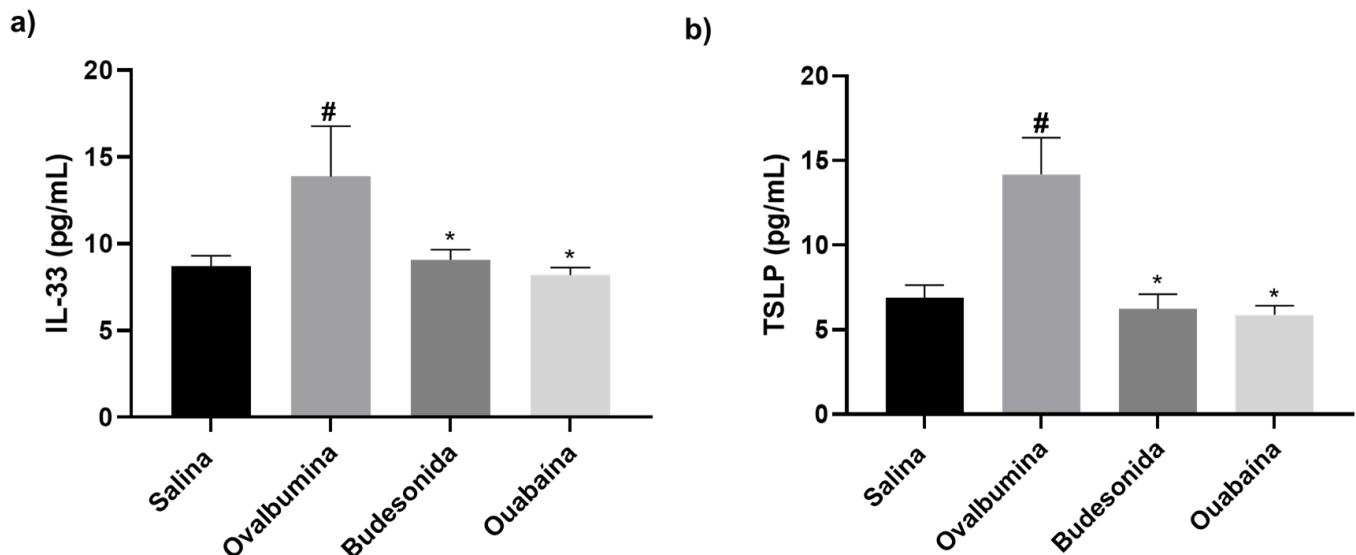
As citocinas alarminas produzidas pelo epitélio respiratório durante o primeiro contato com o alérgeno, também são essenciais para a manutenção da inicialização da resposta asmática alérgica. Ao avaliarmos a produção das alarminas IL-33 (gráfico 5a) e TSLP (gráfico 5b), podemos observar que no modelo de asma, há um aumento na expressão das citocinas quando o grupo é sensibilizado e desafiado com a ovalbumina. O tratamento com a ouabaína e

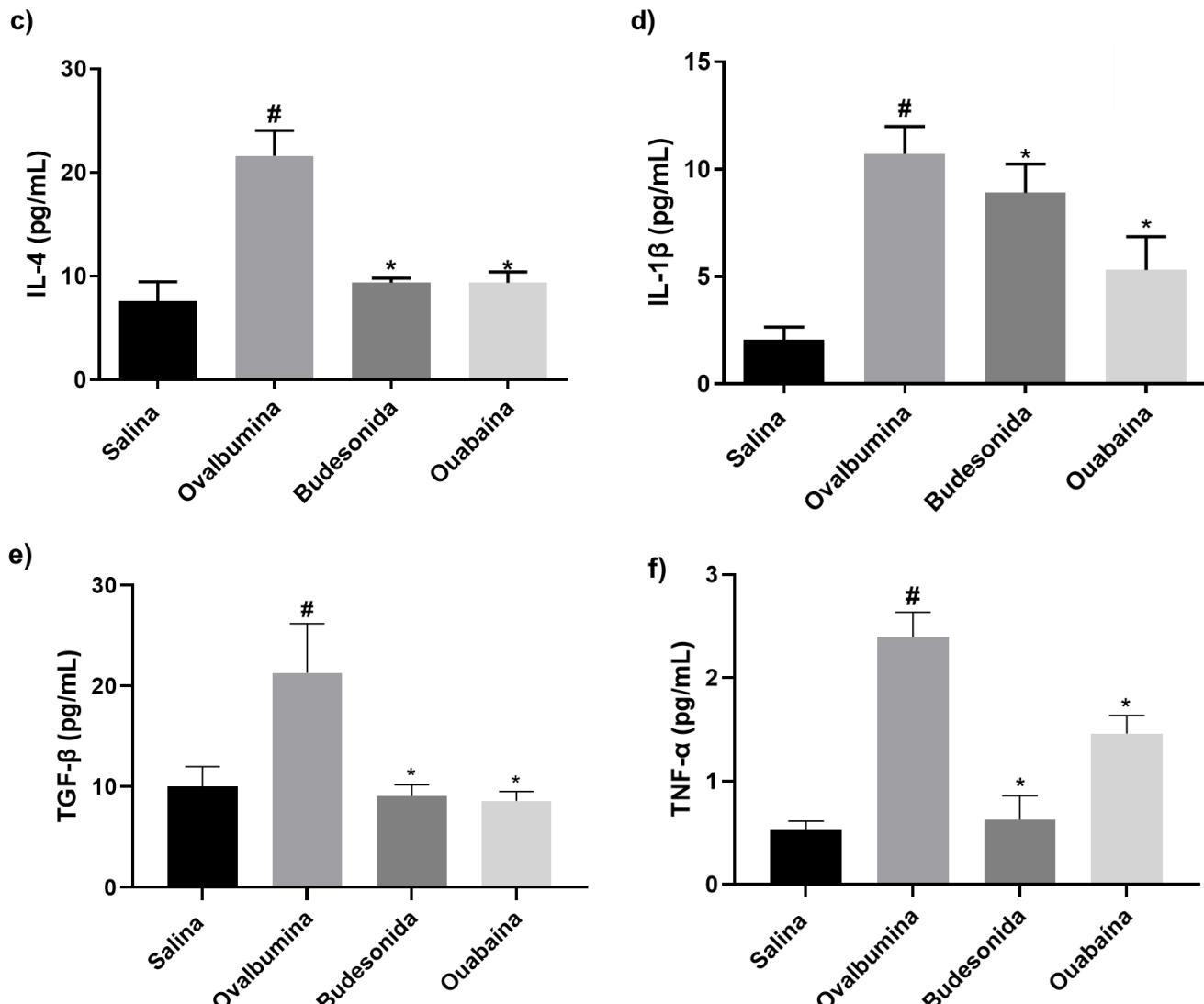
com a droga padrão budesonida, foi capaz de reduzir a produção dessas duas citocinas (**gráficos 5a e b**).

Citocinas clássicas do perfil Th2 como a IL-4 (**gráfico 5c**), apresentam-se em níveis elevados no grupo ovalbumina (OVA) em comparação aos níveis das mesmas no grupo salina ($21,6 \pm 1,098$ vs $7,6 \pm 0,83$, com $p < 0,001$). O tratamento com ouabaína (0,56 mg/kg) foi capaz de reduzir os níveis de IL-4 quando comparado ao grupo OVA ($21,6 \pm 1,098$ vs $9,365 \pm 0,46$, com $p < 0,001$) (**gráfico 5c**). Além de participar do recrutamento de diversas células pró-inflamatórias para a cavidade pulmonar, IL-1 β também está ligada ao início do remodelamento tecidual. Os níveis de IL-1 β ($10,9 \pm 0,39$ vs $2,043 \pm 0,3435$, com $p < 0,001$) apresentaram-se elevados quando comparamos o grupo OVA com o grupo salina (**gráficos 5d**). Ademais, o tratamento com a ouabaína reduziu os níveis dessa citocina ($10,9 \pm 0,39$ vs $5,303 \pm 0,9$, com $p < 0,001$) quando comparado ao grupo ovalbumina.

O TGF- β está intimamente ligado ativação dos fibroblastos e consequentemente a produção das fibras colágenas no remodelamento tecidual, os desafios com a ovalbumina aumentaram a produção dessa citocina e o tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir a sua expressão quando comparado ao grupo OVA ($16,71 \pm 1,098$ vs $8,752 \pm 0,46$, com $p < 0,001$) (**gráfico 5e**). Ligado a lesão epitelial, TNF- α também está presente na inflamação asmática do tipo T2. O tratamento com a ouabaína reduziu as concentrações dessa citocina ($2,493 \pm 0,071$ vs $0,5291 \pm 0,034$, com $p < 0,001$), como podemos ver no **gráfico 5f**.

Gráfico 5. Efeito da ouabaína sobre a produção das citocinas IL-33, TSLP, IL-4, IL-1 β , TGF- β , e TNF- α no modelo de asma.





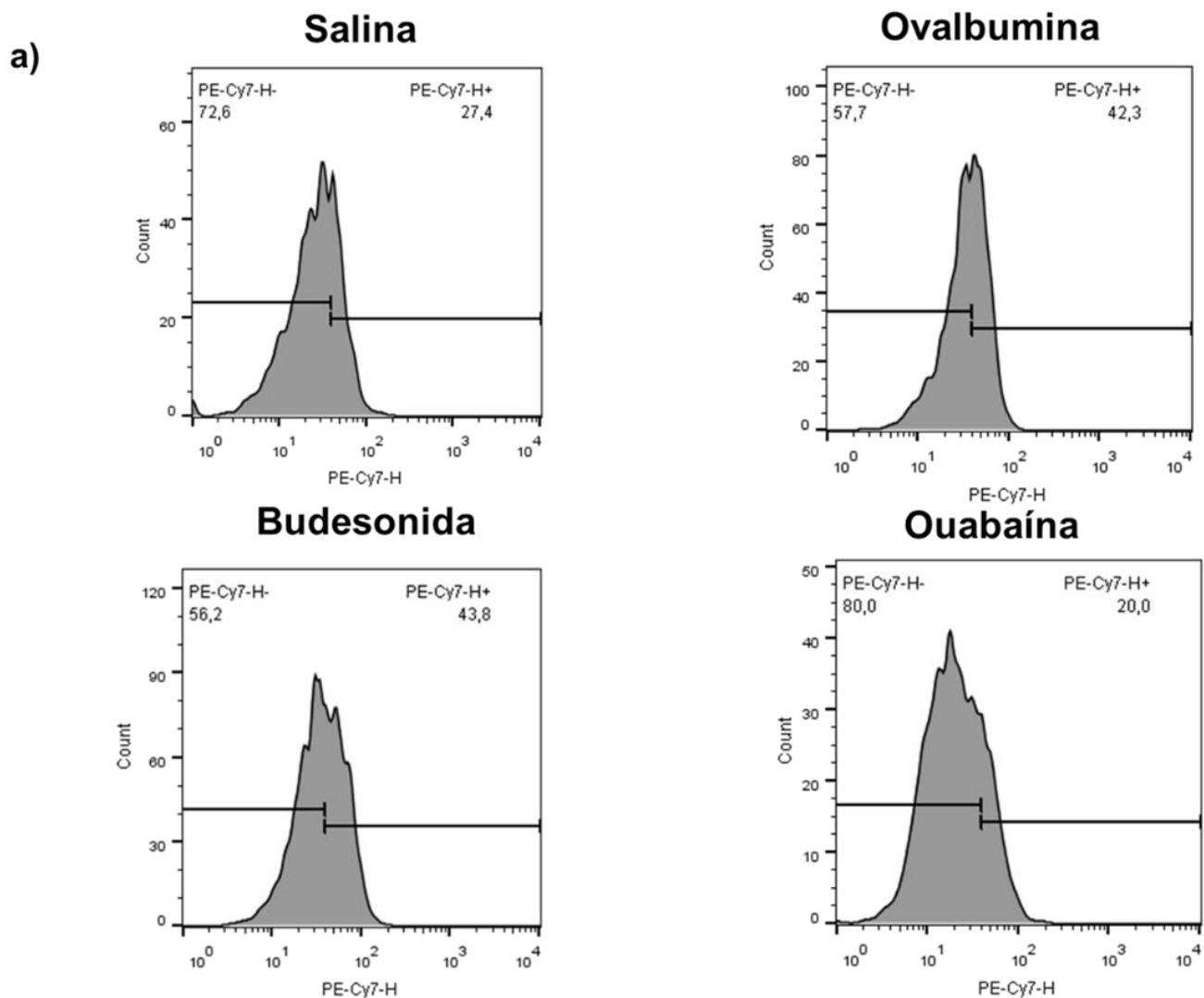
Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 μ g/kg) uma hora antes de cada desafio. O BALF dos animais foi coletado 24h após o último desafio. O sobrenadante foi coletado e utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche) para quantificação das concentrações das citocinas. a. IL-33; b. TSLP; C; IL-4; d. IL-1 β ; e. TGF- β ; f. TNF- α . Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Valores de ${}^{\#}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo salina, e $*p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

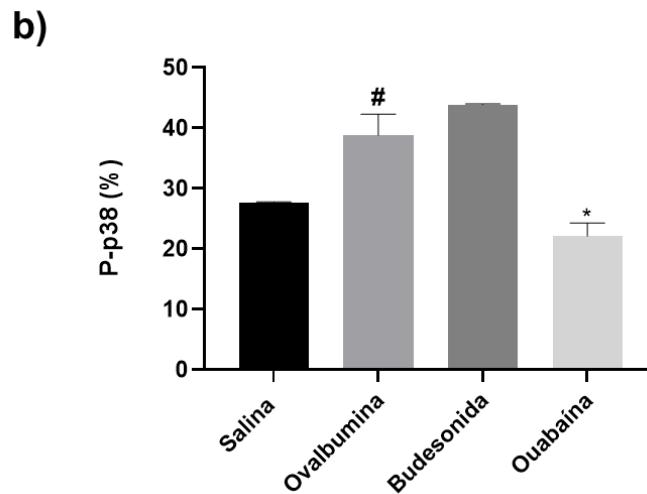
4.6. Efeito da ouabaína na ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com asma.

A frequência de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF de animais com asma experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no **Gráfico 6a**, onde podemos observar histogramas representativos dos diferentes grupos experimentais. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ($p < 0,05$) na **frequência** (ajustar) de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF quando comparado ao grupo salina (**Gráfico 6b**).

Adicionalmente os animais sensibilizados, desafiados com ovalbumina, mas tratados com a ouabaína apresentaram redução ($p < 0,01$) na frequência de ativação da p-p38 MAPK no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA (Gráfico 6b).

Gráfico 6. Efeito da ouabaína na frequência de ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com asma.





Camundongos BALB/c fêmeas ($n=7$) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados via intraperitoneal (i.p.) com ouabaína (0,56 mg/kg) e budesonida (350 µg/kg) uma hora antes de cada desafio. O BALF dos animais foi coletado 24h após o último desafio. O BALF foi coletado e utilizado para citometria de fluxo e posterior quantificação da ativação da MAPK p-38. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. Valores de ${}^{\#}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo salina, e ${}^{*}p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Entender o funcionamento de modelos experimentais de asma, principalmente os que destacam seus fenótipos e endotipos é essencial no desenvolvimento de pesquisas que busquem novas terapias para a doença (AGACHE; AKDIS, 2016). No modelo de asma alérgica do tipo T2 (T_{H2}^{hi}) utilizado nesse presente estudo, foi possível detectar que o tratamento com a ouabaína (OUA) (0,56 mg/kg) durante os desafios com a ovalbumina (OVA) reduziu a migração celular para a cavidade pulmonar, através da imunomodulação de parâmetros essenciais para a manutenção do endotipo T_{H2}^{hi} , como a produção de IgE específica para OVA, produção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de proteínas cinases como a MAPK p-38.

A migração celular num processo inflamatório é um fator determinante para a manutenção da inflamação (MEDZHITOV, 2008). As ações imunomoduladoras da ouabaína que envolvem a redução na migração de leucócitos totais para os sítios inflamados em eventos inflamatórios agudos, são uma constante em diferentes modelos (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009; JACOB et al., 2012; LEITE et al., 2015; CAVALCANTE-SILVA et al., 2019). Evidenciamos aqui, que a OUA também é capaz de modular a resposta celular em processos crônicos como a asma T_{H2}^{hi} , ao diminuir o número de células pró-inflamatórias que se deslocam para a cavidade pulmonar.

Assim, ao atuar como uma substância mediadora de vias de transdução de sinal, a ouabaína acaba ativando cascatas de sinalização como a transdução via Src-ras através do receptor de fator de crescimento transdérmico (EGF), presente nas calveolas celulares. Este evento pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e como consequência a ativação da proteína adaptadora 1 (AP-1) e do fator nuclear kappa B (NF- kB), que estão envolvidos em diversos processos celulares como crescimento, apoptose, adesão e migração (AIZMAN; APERIA, 2003; CEREIJIDO et al., 2012; TIAN et al., 2006; XIE; ASKARI, 2002).

Recentemente, foi descrito que a OUA também apresenta a capacidade de reduzir a resposta inflamatória na peritonite induzida por zimosan, diminuindo não só a migração celular, como a permeabilidade vascular, ao inibir a ativação do NF- κ B que é essencial para a produção das citocinas IL-1 β e TNF- α (LEITE et al., 2015), ambas integrantes desse modelo de inflamação. Adicionalmente, a OUA pode modular vias de sinalização quimiotática em neutrófilos através da inibição de MAPK p38 (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021).

Os modelos de asma alérgica aguda e crônica frequentemente utilizam a OVA como o antígeno sensibilizante. A via de sensibilização e escolha do antígeno pode oferecer diferentes perspectivas sobre a fisiopatologia da inflamação nas vias aéreas inferiores. Por exemplo, a OVA tem a vantagem de estar disponível em formas relativamente puras, com níveis muito baixos das endotoxinas contaminantes de preparações antigênicas convencionais, permitindo assim, a indução de uma resposta predominante do fenótipo T_H2 com características eosinofílicas (HERBERT et al., 2010).

Os eosinófilos presentes no soro e no BALF de pacientes asmáticos, podem ser usados para diagnosticar a asma eosinofílica, característica determinante para o perfil T2. Dessa forma, embora a eosinofilia no BALF seja mais precisa, a eosinofilia sérica pode servir como um marcador substituto da concentração dessas células sempre que necessário (DE GROOT; BRINKE; BEL, 2015). Uma meta-análise de indivíduos asmáticos, feita em 2012 concluiu que a contagem de eosinófilos no BALF, pode ser usada para orientar a terapia em asmáticos (PETSKY et al., 2012). Adicionalmente, a eosinofilia sérica é usada para monitorar a resposta bioquímica à terapia anti-IL-5. Para crianças com asma, por exemplo, a eosinofilia periférica está associada a exacerbações mais frequentes da asma (TRAN et al., 2014). De todos os biomarcadores para asma, a contagem de eosinófilos no BALF tem os dados mais significativos para a endotipagem dessa doença (GANS; GAVRILOVA, 2019).

A contagem de leucócitos diferenciais no estudo, mostrou uma acentuada eosinofilia nos camundongos sensibilizados e desafiados com a OVA durante 12 semanas. O tratamento com a ouabaína reduziu a migração desses granulócitos para a cavidade pulmonar, assim como a droga padrão budesonida. Na inflamação alérgica pulmonar de 23 dias, a OUABAÍNA diminui a concentração de eosinófilos no BALF (GALVÃO et al., 2017). De forma semelhante, a bufalina, um importante esteroide cardiotônico imunorreativo usado na produção do *chansu* (medicamento tradicional chinês) (KRENN; KOPP, 1998), diminui a migração de eosinófilos em modelo funcional de asma moderada (ZHAKEER et al., 2017). Adicionalmente, a ouabaína na dose de 100 micromolar é capaz de reduzir os efeitos tóxicos de eosinófilos em cultura de células de ratos expostas a diferentes concentrações dessa população de leucócitos (TAI et al., 1982), reiterando sua ação sobre esses leucócitos específicos.

Embora eosinófilos e neutrófilos sejam considerados importantes para diferenciar os endotipos da asma, o perfil inflamatório asmático é heterogêneo e possui várias outras células envolvidas. Por muito tempo, o papel dos macrófagos na fisiopatologia da asma foi pouco estudado, embora seja agora conhecido, que eles podem polarizar em muitos fenótipos diferentes e que esses fenótipos diferencialmente polarizados estão alterados na asma

(DRAIJER et al., 2017). Os macrófagos estão abundantemente presentes no tecido pulmonar, mas sua contribuição para a patologia da asma parece ser por meio de uma mudança na sua função e não necessariamente nos seus números, uma vez que a quantidade dessas células pode permanecer inalterada no tecido pulmonar de pacientes com asma (MELGERT et al., 2011).

Para o BALF asmático, resultados contraditórios foram encontrados, com mais (KIM et al., 2019), menos (DEMARCHE et al., 2016) e números semelhantes (BUSSE et al., 2017) de macrófagos em comparação a controles negativos. Essas diferenças podem ser devido ao endotipo de asma analisado. Além disso, a localização pode explicar por que diferenças de macrófagos são encontradas no BALF e raramente no tecido pulmonar. Macrófagos alveolares, residentes na superfície epitelial alveolar, podem se apresentar no escarro (BALF), mas macrófagos intersticiais, localizados no tecido pulmonar, não estão presentes nesse fluido, e só podem ser detectados em cortes e biópsias de tecido. Portanto, a asma T_{H2}^{hi} pode ser acompanhada por alterações no número de macrófagos alveolares e não macrófagos intersticiais (WENZEL et al., 2012).

A concentração de macrófagos presentes no BALF no modelo de asma utilizado nesse estudo, foi aumentada para os animais asmáticos e reduzida para os animais tratados com a OUA e com a budesonida. Resultados do nosso grupo, já demonstraram que a ouabaína pode reduzir a migração celular de macrófagos em diferentes modelos de inflamação (VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2012; LEITE et al., 2015). Em modelos de endotoxemia, a glicolise induzida pelo fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α), provoca uma remodelação funcional em macrófagos, polarizando suas ações para o perfil pró-inflamatório. Nesse contexto, Shao e colaboradores (2019), relataram que a ouabaína pode inibir significativamente a regulação positiva de HIF-1 α diretamente em macrófagos. No entanto, durante a inflamação alérgica pulmonar simples, o tratamento com a ouabaína antes das sensibilizações, não modula a concentração de macrófagos presentes no lavado (GALVÃO et al., 2017), reforçando a variedade de respostas que a substância pode modular a depender do desenho experimental escolhido.

Pacientes com asma sintomática podem apresentar níveis elevados de neutrófilos periféricos que mostrem sinais de ativação diversificados. Tanto o número quanto os níveis de ativação desses neutrófilos são menores na ausência de sintomas ou após o tratamento e resolução do processo alérgico (RADEAU et al., 1990). O número dessas células no escarro induzido em indivíduos controle é, em alguns casos, semelhante ao de pacientes com asma leve a moderada (TAHA et al., 2001), mas em outros descobriu-se que é maior (PROFITÀ et al., 2003; HESSELMAR et al., 2013). No entanto, níveis aumentados de neutrófilos foram

encontrados em pacientes com asma aguda ou persistente em comparação com controles positivos (FAHY et al., 1995), especialmente em pacientes com baixo número de eosinófilos e resposta fraca aos corticosteroides inalados (FAJT; WENZEL, 2015).

A baixa neutrofilia esteve presente no nosso modelo, corroborando fatores definidores do perfil TH2^{hi} (GAUTHIER; RAY; WENZEL, 2015). O tratamento com a OUA e com a budesonida não foi capaz de diminuir a reduzida concentração de neutrófilos presente no BALF dos nossos animais, apesar das evidências de que a nossa substância teste, pode atuar diretamente em perfis neutrofilícios de inflamação (JACOB et al., 2012; CAVALCANTE-SILVA et al., 2021). As ações imunomoduladoras da OUA, dependem da ativação celular nos processos inflamatórios (OLEJ et al., 1994), desta forma a baixa neutrofilia evidenciada no modelo experimental, pode justificar a ação reduzida da substância, nesse perfil leucocitário.

Em eventos asmáticos do tipo 2, vem se demonstrando que o número de linfócitos ativados está relacionado ao grau de responsividade brônquica (AMIN et al., 2000; AZZAWI et al., 1992). Sabe-se também que durante a exacerbação da doença, o número dessa população de células está aumentado nos pulmões asmáticos. Nesse contexto, a maioria desses linfócitos foi identificada como linfócitos T. Os linfócitos podem ativar outras células inflamatórias para liberar citocinas, que estimulam eosinófilos e mastócitos, resultando em sua degranulação (AMIN et al., 2000; BYSTROM; AMIN; BISHOP-BAILEY, 2011). Isso é importante devido ao significado primordial que eosinófilos e mastócitos possuem como células efetoras primárias para asma alérgica (AMIN, 2012). Os linfócitos também podem ser importantes na asma devido a produção de linfocinas que influenciam outras células, como os basófilos e as células caliciformes (CARLSON; PETERSON; VENGE, 1993). O mecanismo para isso é complexo. No entanto, em reações alérgicas intestinais, pode ser demonstrado que fatores imunes derivados de linfócitos T induzem a maturação e diferenciação de células produtoras de muco (HOGAN et al., 2008; MILLER; NAWA; PARISH, 1979).

O dano epitelial causado pela ativação de eosinófilos e linfócitos é proposto como um dos principais mecanismos fisiopatológicos da asma. O número de linfócitos no BALF, está significativamente correlacionado ao dano epitelial na asma alérgica (TRAUTMANN et al., 2002). Isso pode indicar que essas células desempenham um papel no dano direto às células epiteliais. Uma explicação mais provável para essas relações, entretanto, é o fato de que os linfócitos ativados estão envolvidos na atração dos eosinófilos para os pulmões durante a asma alérgica. Essas correlações poderiam, portanto, ser expressões de fenômenos paralelos de retroalimentação patológica, como a destruição das células epiteliais ciliadas pulmonares, que pode ser causada pela liberação de TNF- α por macrófagos ou linfócitos (JIANG et al., 2009).

A primeira evidência da ação da ouabaína nas células linfoides envolveu a inibição da proliferação de linfócitos induzida pelo mitógeno fitohemaglutinina (QUASTEL; KAPLAN, 1968). No nosso modelo de asma, o tratamento com a ouabaína reduziu a concentração de linfócitos no BALF, de forma semelhante a budesonida. Anteriormente, nosso grupo já havia mostrado, qua a ouabaína administrada antes das sensibilizações que antecedem a inflamação alérgica, é capaz de reduzir a subpopulação de linfócitos T (GALVÃO et al., 2017). A ouabaína também pode modular a maturação de linfócitos T em diversos estágios e sob diferentes exposições a mitógenos. Indicando que sua ação anti-proliferativa se estende a modelos complexos de inflamação e ativação celular (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2006; RODRIGUES-MASCARENHA et al. 2008; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009).

A imunoglobulina E (IgE) tem um papel central na fisiopatologia da asma alérgica (FROIDURE et al., 2015). Existem dois tipos de IgE: uma é a IgE clássica, que é definida como a alérgeno-específica e se liga aos receptores de IgE em células inflamatórias relacionadas a asma, causando a liberação de mediadores pró-inflamatórios. O outro é a IgE citocinérgica, que usa um mecanismo produzido na ausência de alérgeno (BAX; KEEBLE; GOULD, 2012). No entanto, para se estudar asma alérgica, evitar o alérgeno nunca é algo eficaz, já que os efeitos pleiotrópicos da IgE são mediados pela ativação de receptores IgE específicos expressos tanto por células imunoinflamatórias (mastócitos, eosinófilos, basófilos e células dendríticas) quanto por células estruturais das vias aéreas como as células epiteliais e musculares (GOULD; SUTTON, 2008).

Ao se determinar a concentração de IgE total com a finalidade de confirmar que realmente foi desencadeado um processo inflamatório alérgico pulmonar no nosso modelo (LLOYD et al., 2010; KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008), podemos observar que o tratamento com a oubaína foi capaz de reduzir a concentração total de IgE quando comparada ao grupo OVA e consequentemente a concentração de IgE-OVA específica. Essa redução, pode ser justificada pela capacidade que a oubaína tem de inibir a maturação de linfócitos B no baço e na circulação periférica (PAIVA et al., 2011), ou mesmo, pelo seu papel limitante na dinâmica entre as diferentes subpopulações de linfócitos B nos órgãos periféricos (DA SILVA et al., 2016). Adicionalmente, essa redução também pode estar diretamente ligada a diminuição nas concentrações de IL-4 nos animais tratados com ouabaína e com a budesonida. A troca de isotipo para IgE nos linfócitos B durante o processo de sensibilização é um ponto crucial para a manutenção do processo asmático severo e depende essencialmente da IL-4 (PUNNONEN et al., 1997).

A inflamação persistente das vias aéreas não só causa os sintomas clássicos da asma, mas também leva ao processo de remodelamento e fibrose. O remodelamento é um processo de reconstrução da parede brônquica e é caracterizado por hipertrofia/hiperplasia de músculo liso, hiperplasia de glândulas mucosas, derramamento e metaplasia do epitélio, angiogênese, produção de colágeno subepitelial, deposição de glicoproteína e deposição de matriz extracelular na submucosa, músculo e adventícia (HOLGATE; POLOSA, 2006; PAIN et al., 2014). Nesse contexto, avaliar os parâmetros histopatológicos nos traz uma visão completa do sucesso do modelo escolhido, já que a avaliação reforça as características definidoras da asma alérgica T2.

A amostragem histológica das vias aéreas na asma para exame morfológico é normalmente realizada por meio de broncoscopia de fibra óptica. Dois tipos principais de espécimes são usados para o exame: biópsias endobrônquicas e biópsias transbrônquicas. Em contraste com a lavagem broncoalveolar ou expectoração induzida para coleta do BALF, as biópsias diretas fornecem informações histológicas sobre a morfologia das vias aéreas, permitindo que os investigadores examinem os diferentes compartimentos da parede brônquica, como epitélio, submucosa, músculo liso e glândulas, bem como suas relações estruturais (MOORE et al., 2011).

Nesse estudo, analisamos o infiltrado celular na camada adventícia brônquica (coloração HE), a produção de muco pelas células caliciformes hiperplásicas (coloração PAS), e a fibrose tecidual (coloração T. Masson). Os resultados demonstraram que a ouabaína não só diminui o infiltrado de células inflamatórias nos brônquios, como consegue diminuir a hiper-responsividade característica da produção exagerada de muco. Adicionalmente, o tratamento com a substância, também reduziu a fibrose quando compararmos o grupo tratado com OUA com o ovalbumina. Já foi demonstrado que a ouabaína e a bufalina, podem modular parâmetros histopatológicos em modelos alérgicos mais brandos e menos duradouros (GALVÃO et al., 2017; ZHAKER et al., 2017). Os achados desse presente estudo, reforçam que além dessa modulação, a OUA estende suas ações para reparos teciduais ao reduzir a deterioração pulmonar presente na asma, corroborando achados de Li e colaboradores (2018) que mostram a ouabaína reduzindo fibrose pulmonar através da inibição da produção de fibronectina e colágeno, regulados pela ativação das vias de transdução do TGF-β.

Protocolos que mimetizam o endotipo da asma TH2^{hi}, como o utilizado nesse estudo, costumeiramente avaliam a presença das alarminas como a IL-33 e TSLP. Essa avaliação, nos permite inferir a ativação das células epiteliais e a estimulação das células linfoides inatas de classe 2 (ILC2) e de células dendríticas, essas últimas atuando na indução da polarização do

perfil T_H2 durante a apresentação antigênica. Os camundongos com asma (grupo ovalbumina) apresentaram aumento nos níveis das duas alarminas em comparação com os do grupo Salina (animais saudáveis). No entanto, o tratamento com a ouabaína promoveu uma redução dos níveis dessas citocinas. Tem sido descrito que o receptor de IL-33 (IL-33R), presente principalmente nas ILC-2 das vias aéreas, é um membro da superfamília de receptores do tipo Toll like (TLR/IL-1), onde a cascata de sinalização intracelular culmina na ativação dos fatores de transcrição NF-κB e AP-1 através da via MyD88-IRAK1/4 e TRAF6/MAPK, respectivamente, com produção das citocinas do perfil T_H2 (IL-5 e IL-13) (KUBO, 2017).

Outros estudos demonstraram que as proteases de alérgenos induzem o aumento de TSLP e IL-33 a partir do receptor PAR-2 (receptor 2 ativado por protease) acoplado a proteína G nas células epiteliais (GOON GOH et al., 2008). A ativação do PAR-2 leva ao recrutamento da proteína G, que induz o aumento dos níveis de fosfolipase C (PKC) e de Ca²⁺ intracelular, a ativação das vias das MAPK e do fator de transcrição NF-κB e, por sua vez, a produção das alarminas TSLP e IL-33 (KATO et al., 2007). O sinergismo entre STAT-6 e NF-κB induz a produção de TSLP em resposta a IL-4 pelas células epiteliais, já a acetilação de STAT-1 mediada por IFN-γ inibe a ativação de NF-κB ao promover o sequestro desse no citosol, impedindo sua translocação para o núcleo (RALLABHANDI et al., 2008).

Quando nos referimos à fisiopatologia da asma tipo T2, o fenótipo T_H2 (IL-4, IL-5, IL-13 IL5, IL-1β, TGF-β e TNF-α) é capaz de explicar a evolução de um processo asmático crônico. Em asmáticos, a resposta para gatilhos como alérgenos ou exercícios, é a liberação de IL-1 como um mediador imunológico junto com outras citocinas principais como o TSLP e o fator estimulador de colônia de monócitos de granulócitos (GM-CSF) nas vias aéreas, resultando em eosinofilia, troca de isotipo de imunoglobulina para IgE (TAKHAR et al., 2007) e inflamação T_H2 (IL-4, IL-9, IL-13) (CHUNG; BARNES, 1999; TAKHAR et al., 2007). Adicionalmente, IL-1α e β são conhecidos por contribuir para a inflamação T_H2 na asma através da ativação e recrutamento de eosinófilos, mastócitos, células dendríticas (WILLART et al., 2012). No nosso modelo, o tratamento com a OUA reduziu a concentração das citocinas IL-4 e IL-1β, quando comparado ao grupo OVA.

Recentemente, Kobayashi e colaboradores (2017) demonstraram que o efeito da ouabaína na liberação de IL-1β, tanto em macrófagos quanto no tecido cardíaco, está relacionado à ativação do inflamassoma de NLRP3, que por sua vez é mediada por efluxo do íon potássio (K⁺). Vale ressaltar que neste estudo os autores utilizaram altas doses de OUA tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Isso contrasta com outros estudos que mostram uma redução de um padrão diferente de citocinas, incluindo IL-1β (LEITE et al., 2015) com doses mais baixas de ouabaína na

presença de estímulo inflamatório (JACOB et al., 2013). A modulação nas concentrações de IL-4 em outros modelos alérgicos, também foi observada com baixas concentrações de ouabaína e outros glicosídeos como a bufalina (GALVÃO et al., 2017; ZHAKER et al., 2017).

Várias células dendríticas com diferentes fenótipos, perfis de produção de citocinas e capacidade de estimular diferentes subpopulações de linfócitos já foram descritas. Alguns sinais de perigo como TNF- α induzem o aparecimento de células dendríticas com um perfil pró-inflamatório (SCHNURR et al., 2000). Na asma, a maturação de células dendríticas depende não só de TSLP e IL33, como também do TNF- α . A OUA pode modular diretamente a proliferação de células dendríticas em sinergismo com o TNF- α (NASCIMENTO et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, o remodelamento das vias aéreas denota as modificações fisiopatológicas da estrutura normal da parede das vias aéreas, incluindo mudanças na composição e organização dos constituintes celulares e moleculares durante o processo asmático (VIGNOLA et al., 2003). Essas modificações são parcialmente reversíveis na asma leve, mas na maioria das vezes são irreversíveis na asma crônica grave (VIGNOLA et al., 2003), sendo associadas a principal causa de sintomas associados à diminuição da função pulmonar (LAZAR; PANETTIERI, 2003). Nesse contexto, o TGF- β mostra-se de particular importância, pois induz múltiplos efeitos no mesmo tipo de célula, dependendo das condições microambientais e celulares. Assim, a alta expressão de TGF- β e a sua associação com eosinófilos e com a gravidade da asma (DOHERTY; BROIDE, 2007), acaba transformando essa citocina num parâmetro importantíssimo para avaliarmos o fenótipo T2.

Recentemente, foi demonstrado que a OUA regula negativamente os níveis de RNA mensageiro (RNAm) para a proteína do TGF β R2 em cultura de fibroblastos pulmonares humanos e células epiteliais, resultando na perda das sinalizações induzidas pelo TGF β (fosforilação SMAD2) e as suas respostas funcionais como a diferenciação de miofibroblastos (LA et al., 2016). No modelo de asma tipo T2 apresentado, o tratamento com a OUA reduziu as concentrações de TGF β de forma semelhante ao tratamento com a budesonida. Apesar do mecanismo preciso pelo qual a ouabaína regula negativamente a expressão de TGF β não estar claro, já é bem estabelecido que a ligação da ouabaína à Na $^+$ /K $^+$ ATPase em concentrações nanomolares resulta não só na inibição de sua atividade de bombeamento, como também na ativação de cascatas de regulação gênica como as que levam a expressão de TGF β e sua posterior fosforilação (TIAN et al., 2006; XIE et al., 2002).

As MAPKs representam um importante ponto de convergência para múltiplas vias de sinalização que são ativadas durante a inflamação e diversos processos imunológicos. Portanto,

essas enzimas podem impactar os variados eventos celulares relevantes para a fisiopatologia da asma, incluindo diferenciação de células T_H2, infiltração de células inflamatórias, funções epiteliais e endoteliais, bem como hiperplasia de miofibroblastos e hiper-reatividade. De fato, a ativação de MAPK pode ser detectada tanto em células inflamatórias quanto nas células epiteliais brônquicas (PELAIA et al., 2004).

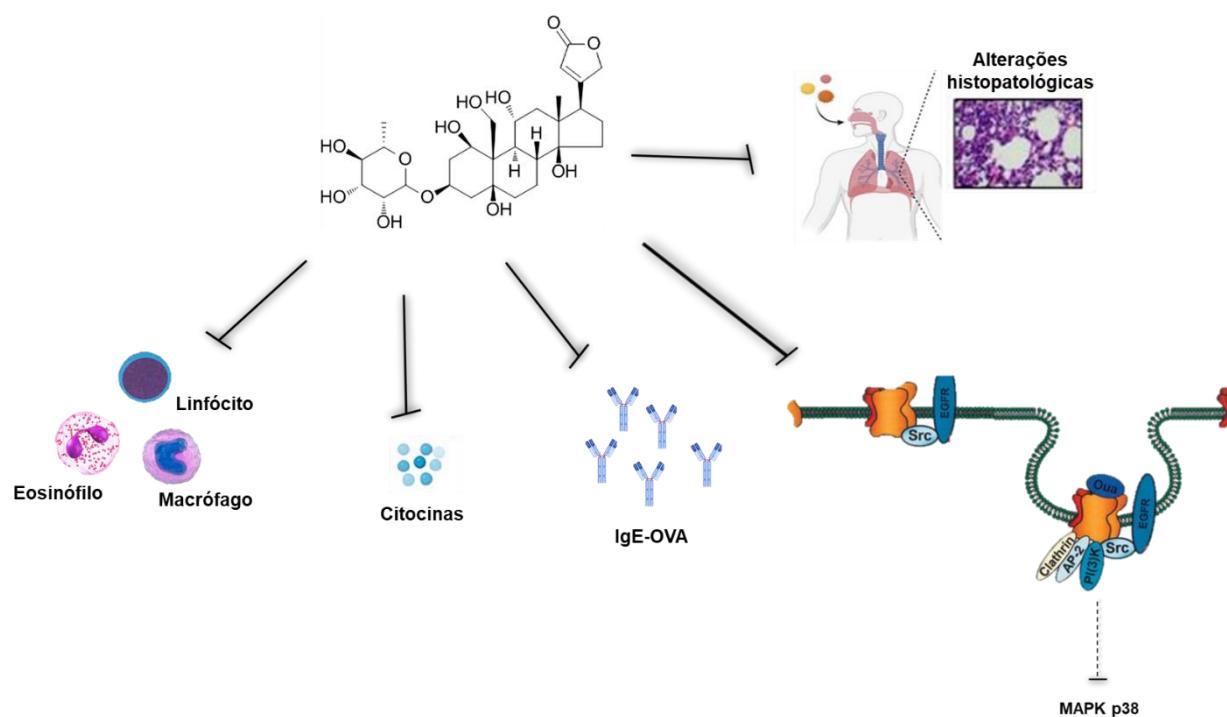
A atividade secretora dos linfócitos T_H2 é afetada por p38, que por fosforilação do fator de transcrição GATA-3 promove a síntese de IL-4, IL-5 e IL-13. A p38 também é capaz de inibir a apoptose de eosinófilos e parece estar implicada na diferenciação dessas células e na liberação das suas citocinas, bem como na eosinopoiese induzida por antígenos (CHEN et al., 2000; KANKAANRANTA et al., 1999). A inibição dessa MAPK pode evitar a eosinofilia pulmonar induzida por alérgenos, hipersecreção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas, efeitos resultantes em parte da ativação de p38 na apoptose de eosinófilos e na produção de citocinas nas células do músculo liso das vias aéreas (CHUNG, 2011). Nossos resultados mostraram que a expressão de p38 como uma característica pró-inflamatória da atividade pulmonar asmática, aumentou nos animais desafiados com a ovalbumina. O tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir a expressão dessa MAPK, corroborando dados anteriores do nosso grupo, onde o uso de doses pequenas da substância, inibiu a p38 em diferentes populações celulares (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram os mecanismos imunomoduladores da ouabaína administrada via intraperitoneal na dose de 0,56 mg/Kg no protocolo experimental de asma do tipo TH₂^{hi}. Podemos inferir que esses mecanismos envolvem a supressão da via de sinalização intracelular da p38 MAPK. Adicionalmente, a inibição dessa via reduz parâmetros essenciais para a inicialização do processo asmático, como a expressão de IL-33 e TSLP, bem como padrões de cunho crônico como o remodelamento das vias aéreas com fibrose e destruição epitelial, mediados pelo TGF-β e pelo TNF-α. Assim, podemos concluir que a ouabaína como um esteroide cardiotônico imunomodulador, é capaz de reduzir as principais características que determinam o endotipo asmático alérgico, conhecido como asma TH₂^{hi}.

Figura 7. Esquema representativo dos efeitos imunomodulatórios da ouabaína no modelo de asma TH₂^{hi}



Fonte: Galvão, 2022.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- AGACHE, I.; AKDIS, C.; VIRCHOW, J.C. Untangling asthma phenotypes and endotypes. **Allergy**, v. 67, n. 7, p. 835-846, mai. 2012.
- AGACHE, I.; AKDIS, C. A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. **Allergology International**, v. 65, n. 3, p. 243–252, jul. 2016.
- AMIN, K. et al. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 162(6): 2295–2301, 2000.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9–14, 2012.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, C.; ROMAGNANI, S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** Mosby Inc. 1 mar. 2015.
- ASBAI. **ASBAI - Associação Brasileira de Alergia e Imunologia**. Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/secao.asp?s=81&id=940>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- AUN, M. V. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. **Journal of asthma and allergy**, v. 10, p. 293–301, 2017.
- AUSSEL, C. et al. Submicromolar La³⁺ concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3 or thapsigargin-activated Jurkat cells. **Biochem. J.**, v. 313, p. 909-913, 1996.
- AZZAWI, M. et al. T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. **American Review of Respiratory Disease** 145(6): 1477–1482, 1992.
- BAGNASCO, D. et al. A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 170, n. 2, p. 122–131, 2016.
- BARLOW, J. L. et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 1, p. 191- 198.e4, jan. 2012.
- BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 15 mar. 2008.
- BARNES, P. J. Biochemical Basis of Asthma Therapy. **Journal of Biological Chemistry**, v.

286, n. 38, p. 32899–32905, 23 set. 2011.

BARNES, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 13, p. 1541–1558, 1 jul. 2017.

BARRETT, N. A. et al. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 2, p. 1119–28, 15 jan. 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.

BAX, H.J.; KEEBLE, A.H.; GOULD, H.J. Cytokinergic IgE Action in Mast Cell Activation. **Front. Immunol.**, 2012, 3, 229, 2012.

BLUME, C.; DAVIES, D. E. In vitro and ex vivo models of human asthma. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 394–400, jun. 2013.

BONAMICHI-SANTOS, R. et al. Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us? **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

BOULET, L. P. Airway remodeling in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.24, n. 1, p. 56–62, jan. 2018.

BRANCHETT, W. J.; LLOYD, C. M. Regulatory cytokine function in the respiratory tract. **Mucosal Immunology**Nature Publishing Group, , 1 maio 2019.

BRIGHTLING, C. E. et al. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. **Thorax**, v. 58, n. 6, p. 528–32, jun. 2003.

BRIGHTLING C.; BERRY, M.; AMRANI, Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, p. 5–10, 2008.

BYSTROM, J.; AMIN, K; BISHOP-BAILEY, D. Analysing the eosinophil cationic protein—a clue to the function of the eosinophil granulocyte. **Respiratory Research** 12(10): 1465–9921, 2011.

BROEKMAN, W. et al. TNF-alpha and IL-1betaactivated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor. **Respir Res**, v.17:3, 2016.

BRODIE, C. et al. Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. **J. Cell Physiol.**, v. 165, p. 246-253, 1995.

BROIDE, D. H. et al. Cytokines in symptomatic asthma airways. **J Allergy Clin Immunol**, n. 89,v. 5, p958-967, 1992.

BUSSE, P. J. et al. Effect of aging on sputum inflammation and asthma control. **J Allergy**

- Clin Immunol**, 139(6):1808-1818, 2017.
- CALLIARI, V. M. **Principios de Morfometria Digital Ks300 para Iniciantes - Marcelo Vidigal Caliari | Estante Virtual**. Editora da ed. Belo Horizonte: [s.n.].
- CANNING, B. J.; CHOU, Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 702–20, out. 2008.
- CARDOSO, T. DE A. et al. Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dадоsextraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **Jornal Brasileiro de pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163–168, 2017.
- CARLSON, M.; PETERSON, C.; VENGE, P. The influence of IL-3, IL-5, and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation. **Allergy** 48(6): 437–442, 1993.
- CARVALHO, D. C. M. et al. Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2019, p. 1– 11, 2019.
- CASALE, T. B. Biologics and biomarkers for asthma, urticaria, and nasal polyposis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 5, p. 1411–1421, 2017.
- 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.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. **Inflammopharmacology**, [s. l.], 2019.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CARVALHO, D. C. M.; LIMA, E. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 1829-1833, 2021.
- CHAPMAN, D. G. et al. Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next? **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 12, p. 2055–64, dez. 2014.
- CHEN, C.H.; ZHANG, D. H. et al. Cyclic AMP activates p38 mitogen-activated protein kinase in Th2 cells: Phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression. **J Immunol** 165: 5597–5605, 2000.
- CHUNG, K. F., BARNES P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**, 54(9): 825-857, 1999.
- CHUNG, K.F. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Asthma and COPD. **Chest**, p. 1470-1479, 2011.
- DE PAIVA, L. S.; COSTA, K. M.; CANTO, F. B.; et al. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, n. 9, p. 1038-43, 2011.
- DE GROOT, J. C.; BRINKE, A. T.; BEL, E. H. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. **ERJ Open Res**, v. 1, n. 1, 2015.

- DELL'ARINGA, M.; LEE REINHARDT, R. Notch signaling represents an important checkpoint between follicular T-helper and canonical T-helper 2 cell fate article. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 4, p. 1079–1091, 1 jul. 2018.
- DEMARCHE, S. et al. Detailed analysis of sputum and systemic inflammation in asthma phenotypes: are paucigranulocytic asthmatics really non-inflammatory? **BMC Pulm Med**, 16(46), 2016.
- DERENDORF, H. et al. Clinical development of an advanced intranasal delivery system of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate. **Drugs of Today**, v. 50, n. 1, p. 15, jan. 2014.
- DERENDORF, H.; MELTZER, E. O. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications. **Allergy**, v. 63, n. 10, p. 1292–1300, out. 2008.
- DOHERTY, T.; BROIDE, D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. **Curr Opin Immunol**, v. 19, p. 676–680, 2007.
- DRAIJER, C. et al. Human asthma is characterized by more IRF5+ M1 and CD206+ M2 macrophages and less IL-10+ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways. **J Allergy Clin Immunol**. Jul; 140(1):280-283, 2017.
- DVELA, M. et al. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. **Pathophysiology**, v. 14, n. 3-4, p. 159-166, 2007.
- EIFAN, A. O. et al. Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 6, p. 891–900, jun. 2012.
- ELTBOLI, O. et al. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 20, n. 4, p. 667–70, maio 2015.
- FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57, 2015.
- FAJT, M. L.; WENZEL, S. E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 299–310, fev. 2015.
- 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.

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

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

FORNHEM, C. et al. Allergen-induced late-phase airways obstruction in the pig: mediator release and eosinophil recruitment. **Eur Respir J**, v. 8, n. 8, p. 1100–1109, 1995.

FRAGA RIGHETTI, R. et al. New Pharmacological Targets for Asthma Drug Development.

Journal of Allergy & Therapy, v. 05, n. 02, p. 1–13, 25 mar. 2014.

FROIDURE, A. et al. Asthma phenotypes and IgE responses. **Eur. Respir. J**, 47, 304–319, 2015.

FU, Q. et al. Anti-asthmatic effects of matrine in a mouse model of allergic asthma.

Fitoterapia, v. 94, p. 183–189, 2014.

GALVÃO, J. G. F. M.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CARVALHO, D. C. M.; et al. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1117–1130, 2017.

GANS, D. M.; GAVRILOVA, T. Understanding the Immunology of Asthma: Pathophysiology, Biomarkers, and Treatments for Asthma Endotypes. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 19, p. 525-542, 2019.

GAUTHIER, M.; RAY, A.; WENZEL, S.E. Evolving concepts of asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 192, p. 660–668, 2015.

GAVETT, S. H. et al. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1527–36, nov. 1995.

GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 7, n. 1, p. 34–51, jan. 2016.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-κB and Rel proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 225–260, abr. 1998.

GINA. What's new in GINA 2021? **GINA Global Strategy for Asthma Management and Prevention**, p. 1–36, 2021.

- GOLDSTEIN, L. H.; WEBER-SCHÖNDORFER, C.; BERKOVITCH, M. Antiasthmatic and cough medication. In: **Drugs During Pregnancy and Lactation**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 65–74.
- GÓMEZ, E. et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 45, n. 10, p. 1542–53, out. 2015.
- GOPLEN, N. et al. ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma. **FASEB Journal**, v. 26, n. 5, p. 1934–1945, maio 2012.
- GOTO, A.; YAMADA, K., NAGOSHI, H., et al. Stress-induced elevation of ouabain like compound in rat plasma and adrenal. **Hypertension**, vol. 26, p.1173-1176, 1995.
- GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 205–217, mar. 2008.
- GOUR, N.; WILLS-KARP, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 68–78, set. 2015.
- GRANT The relation of socioeconomic factors and racial/ethnic differences in US asthma mortality. Am J Public Health. 2000 Dec; 90(12):1923-5.
- GREEN, R. H. et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 875–9, out. 2002.
- GUERRA, E. S. et al. Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2017.
- GUIBAS, G. V et al. Relationship of Allergy with Asthma: There Are More Than the Allergy in the Asthma. **Frontiers in pediatrics**, v. 5, p. 92,2017.
- GUO, R. B., et al. Chronic asthma results in cognitive dysfunction in immature mice. **Exp. Neurol.**, v247, p209–217, 2013.
- GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 27 jul. 2012.
- HAENUKI, Y. et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 184- 194.e11, jul. 2012.

- HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 14, p. 6259-63, 1991.
- HESSELMAR, B. et al. The heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults. **J. Allergy**, v. 2012, 163089, fev 2012.
- HELLINGS, P. W. et al. Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 72, n. 11, p. 1657–1665, nov. 2017.
- HENS, G. et al. Original article: Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: ‘united airway disease’ beyond the scope of allergy. **Allergy**, v. 63, n. 3, p. 261–267, 5 dez. 2007.
- HOGAN, S.P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin Exp Allergy** 38(5): 709–750, 2008.
- HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. **Lancet**, 368, 780–793, 2006.
- HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15025, 10 set. 2015.
- HUANG, B. S.; LEENEN, F. H. Brain "ouabain" and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 28, p. 1005-1012, 1996.
- HUANG, W. C. et al. Matrine attenuates allergic airway inflammation and eosinophil infiltration by suppressing eotaxin and Th2 cytokine production in asthmatic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 470–477, 2014.
- HUMBERT, M. et al. Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 5, p. 525- 536.e1, set. 2014.
- IS, IKA, S. et al. Sinomenine ameliorates the airway remodelling , apoptosis of airway epithelial cells , and Th2 immune. **Allergologia et immunopathologia (Madri)**, v. 46, n. 1, p. 67–75, 2018.
- ISHIDA, W. et al. Adjuvants determine the contribution of basophils to antigen sensitization in vivo. **Immunology Letters**, v. 136, n. 1, p. 49–54, 30 abr. 2011.
- JACOB, P. L.; LEITE, J. A., ALVES, A. K. A., et al. Immunomodulatory activity of ouabain in Leishmania leishmania amazonensis infected Swiss mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1313–1321, 2013.
- JATAKANON A, LIM S, B. P. Changes in Sputum Eosinophils Predict Loss of Asthma Control. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p.

64–72, jan. 2000.

JENSEN, P.; WINGER, L.; NOWELL, P. The mitogenic effect of A23187 in human peripheral lymphocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 496, p. 374-383, 1977.

JI, N. et al. Ligustrazine corrects Th1 / Th2 and Treg / Th17 imbalance in a mouse asthma model. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 76–81, 2014.

JIANG, J. et al. Nitric oxide gas phase release in human small airway epithelial cells. **Respiratory Research** 10: 3, 2009.

JOHNSON, J. R. et al. Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 3, p. 378–385, 1 fev. 2004.

KANKAANRANTA, H.; DE SOUZA P.M.; BARNES, P. J.; SALMON, M. et al. SB203580, an inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, enhances constitutive apoptosis of cytokine-deprived human eosinophils. **J Pharmacol Exp Ther** 290: 621–628, 1999.

KATO, A. et al. TLR3- and Th2 Cytokine-Dependent Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Airway Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1080–1087, 15 jul. 2007.

KAY, A. B. The early history of the eosinophil. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 3, p. 575–582, 1 mar. 2015.

KAY, A. B.; PHIPPS, S.; ROBINSON, D. S. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 9, p. 477–482, set. 2004.

KHORASANIZADEH, M. H. et al. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma. **Pharmacology and Therapeutics** Elsevier Inc. 1 jun. 2017.

KIM, H. B. et al. Combined effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-13 polymorphisms on bronchial hyperresponsiveness in Korean children with asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 38, p. 774–780, 2008.

KIM, J. et al. Innate immune crosstalk in asthmatic airways: Innate lymphoid cells coordinate polarization of lung macrophages. **J Allergy Clin Immunol**, 143(5):1769-1782, 2019.

KIMURA, T.; HAN, W.; PAGEL P. et al. Protein phosphatase 2A interacts with the Na,K-ATPase and modulates its trafficking by inhibition of its association with arrestin. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. 29269, 2011.

KRENN, L.; KOPP, B: Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, 48: 1–29, 1998.

KOBAYASHI, M.; USUI-KAWANISHI, F.; KARASAWA, T. et al. The cardiac glycoside

- ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction. **PLoS ONE** 12:e0176676, 2017.
- KUBO, M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. **Immunological Reviews** Blackwell Publishing Ltd 1 jul. 2017.
- KUMAR, R. K. et al. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 32, n. 7, p. 1104–11, jul. 2002.
- KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The classical ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 485–94, jun. 2008.
- KUYAMA, S. et al. Effect of 5-aminosalicylate on allergic rhinitis model in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 6, p. 713–716, 2010.
- LA, J.; REED, E.; CHAN, L. et al. Downregulation of TGF- β Receptor-2 Expression and Signaling through Inhibition of Na/K-ATPase. **PLoS One**. 2016.
- LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 23–29, fev. 2009.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. The Cytokines of Asthma. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 975–991, abr. 2019.
- LAREDO, J; HAMILTON, B. P.; HAMLYN, J. M. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 212, p. 487-493, 1995.
- LAREDO, J; HAMILTON, B. P.; HAMLYN, J. M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, 135, p. 794-797, 1994.
- LAZAAR, A. L.; PANETTIERI, R. A.. Is airway remodeling clinically relevant in asthma? **Am J Med** v. 115, p. 652–659, 2003.
- LI, Z.; XIE, Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, 2009.
- LI, B.; HUANG, X.; LIU, Z. et al. Ouabain ameliorates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of lung fibroblasts. **Am J Transl Res**, 10(9):2967-2974, 2018
- LICONA-LIMÓN, P. et al. Corrigendum: TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells.

Nature Immunology, v. 15, n. 1, p. 109–109, 18 dez. 2013.

LEE, H. S et al. TNF-alpha enhance Th2 and Th17 immune responses regulating by IL23 during sensitization in asthma model. **Cytokine**, v. 79, p. 23–30, 2016.

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

LLOYD, C.M.; HESSEL, E.M. Functions of T cells in asthma: more than Just Th2 cells. **Nature**, v. 10, p. 838-848, 2010.

MANEECHOTESUWAN, K. et al. Regulation of Th2 Cytokine Genes by p38 MAPK-Mediated Phosphorylation of GATA-3. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2491–2498, 15 fev. 2007.

MASOLI M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy** ;59(5):p. 469–78, 2004.

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

MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 93, jun. 2017.

MELGERT, B. N. et al. More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. **J Allergy Clin Immunol**, 127(3):831-3, 2011.

MELUM, G. R. et al. A thymic stromal lymphopoietin–responsive dendritic cell subset mediates allergic responses in the upper airway mucosa. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 613- 621.e7, set. 2014.

MILLER, H. R.; NAWA, Y.; PARISH, C.R. Intestinal goblet cell differentiation in *Nippostrongylus*-infected rats after transfer of fractionated thoracic duct lymphocytes. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, 59: 281–285, 1979.

MIRANDA C.; BUSACKER A.; BALZAR S.; TRUDEAU J.; WENZEL S.E. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, p. 101–108, 2004.

MOORE, W. C.; EVANS, M. D. ; BLEECKER, E. R.; BUSSE, W. W. et al. Safety of investigative bronchoscopy in the Severe Asthma Research Program. **J. Allergy Clin. Immunol**, 128:328–36, 2011.

MORAES, V. L. et al. Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity. **FASEB J.**, v. 3, p. 2425-2429, 1989.

MURARO, A. et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis—PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1347–1358, maio 2016.

NAIR, P. What is an “eosinophilic phenotype” of asthma? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, p. 81-83, 2013.

NASR, W. et al. The Role of the Level of Interleukin-33 in the Therapeutic Outcomes of Immunotherapy in Patients with Allergic Rhinitis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, 28 ago. 2017.

NASCIMENTO, C. R.; VALENTE, R. C.; ECHEVARRIA-LIMA, J. et al. The influence of Ouabain on human dendritic cells maturation. **Mediators Inflamm.** 2014;2014:494956, 2014.

NAVINÉS-FERRER, A. et al. IgE-Related Chronic Diseases and Anti-IgE-Based Treatments. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–12, 21 dez. 2016.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models and Mechanisms**, v. 1, n. 4–5, p. 213–220, 1 nov. 2008.

OH, H.; GHOSH, S. NF-κB: Roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets. **Immunological Reviews**, v. 252, n. 1, p. 41–51, mar. 2013.

OHRUI, T. et al. Vascular permeability and airway narrowing during late asthmatic response in dogs treated with Metopirone. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 89,n. 5, p. 933–43, maio 1992.

OLEJ, B. et al. Effect of ouabain on lymphokine-activated killer cells. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 16, p. 769-774, 1994.

OMS. **OMS | Asma**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/es/>>.

Acesso em: 10 fev. 2018.

ORTEGA, H. G. et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 13, p. 1198–1207, set. 2014.

PAIN, M.; BERMUDEZ, O.; LACOSTE, P. et al. Tissue remodeling in chronic bronchial disease: From the epithelial to mesenchymal phenotype. **Eur. Respir. Rev.**, 23, 118–130, 2014.

- PALOMARES, O. et al. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. **Immunological Reviews**, v. 278, n. 1, p. 219–236, 1 jul. 2017a.
- PALOMARES, Ó. et al. dIvergEnt: How IgE Axis Contributes to the Continuum of Allergic Asthma and Anti-IgE Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1328, 21 jun. 2017b.
- PAMNANI, M. B. et al. Studies on the role os humoral sodium-transport inhibitor and the anteroventral third ventricle (AV3V) in experimental low-renin hypertension. **Clinical science**, v. 61, n. s7, p. 57s-60s, 1981.
- PELAIA, G.; CUDA, G.; VATRELLA, A.; GALLELLI, L. et al. Mitogen-activated protein kinases and asthma. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, p. 642-653, 2004.
- PERA, T.; PENN, R. B. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 164, p. 82–96, ago. 2016.
- PETERS, M. et al. Influence of an Allergen-Specific Th17 Response on Remodeling of the Airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 3, p. 350–358, mar. 2016.
- PETSKY, H. L. et al. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). **Thorax**, v. 67, n. 3, p.199-208, 2012.
- PIRES, V. et al. Ouabain effects on activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA – stimulated cells and of CD69 on PHA – and TPA – stimulated cells. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 19, p. 143-148, 1997.
- PIVOVAROV, A.; CALAHORRO; F.; WALKER, Robert. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. **Invertebrate Neuroscience**, v. 19, p. 221-227, 2018.
- POSSA, S. S. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 46, 2013.
- PRATA, L. O. et al. Original Research: ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Experimental biology and medicine**, v. 242, n. 1, p. 8–21, jan. 2017.
- PROFITÀ, M. et al. Increased prostagladin E2 concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. **J Allergy Clin Immunol**, 112:709-16, 2003.

- QUASTEL, M. R.; KAPLAN, J. G. Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin in vitro. **Nature**, v. 219, n. 5150, p. 198-200, 1968.
- RADEAU, T.; CHAVIS, C.; DAMON, M. et al. Enhanced arachidonic acid metabolism and human neutrophil migration in asthma. Prostaglandins **Leukot Essent Fatty Acids**, 41:131-8, 1990.
- RAY, E.; SAMANTA, A. K. Receptor-Mediated Endocytosis of IL-8: a Fluorescent Microscopic Evidence Ligand-Induced Biological Response in Human Neutrophils. **Cytokine**, v. 9, n. 8, p. 587–596, 1997.
- REDONDO J. M.; LOPEZ RIVAS A; FRESNO, M. Activation of the Na⁺/K⁺-ATPase by interleukin-2. **FEBS Lett.**, v. 206, p. 199-202, 1986.
- REINHARD, L.; TIDOW, H.; CLAUSEN, M. J.; NISSEN, P. Na(+),K (+)-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na(+),K (+)-ATPase. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 2, p. 205-22, 2013.
- REN, M. et al. *Mahuang Fuzi Xixin* Decoction Attenuates Th1 and Th2 Responses in the Treatment of Ovalbumin-Induced Allergic Inflammation in a Rat Model of Allergic Rhinitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERNANDES DOS SANTOS, N.; RUMJANEK, V. M. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sciences**, v. 73, n. 8, p. 1037-51, 2003.
- RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; SANTOS, N. F. ; RUMJANEK, V. M. . Synergistic Effect Between Ouabain and Glucocorticoids for the Induction of Thymic Atrophy. **Bioscience Reports**, v. 26, p. 159-69, 2006.
- RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; BLOISE, F. F.; MOSCAT, J.; RUMJANEK, V. M. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biology International**, v. 32, n. 10, p. 1323-8, 2008.
- RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DE OLIVEIRA, A. S.; AMOEDO, N. D.; et al. Modulation of the immune system by ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 153-163, 2009.
- SAGAR, S.; AKBARSHAH, H.; ULLER, L. Translational value of animal models of asthma: Challenges and promises. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 272–277, 15 jul. 2015.

SAHIN, E. et al. Mechanism of Action of Allergen Immunotherapy. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 30, n. 5_suppl, p. S1–S3, set. 2016.

SALVATI, L.; MAGGI, L; ANNUNZIATO, F.; COSMI, L. Thymic stromal lymphopoietin and alarmins as possible therapeutical targets for asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 21, n.6, p. 590-596, 2021.

SANO, K. et al. Ovalbumin (OVA) and *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli Cooperatively Polarize Anti-OVA T-helper (Th) Cells toward a Th1-Dominant Phenotype and Ameliorate Murine Tracheal Eosinophilia. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1260–1267, 14 jun. 1999.

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.

SCHNURR, M.; THEN, F.; GALAMBOS, P. et al. Extracellular ATP and TNF- α synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **The Journal of Immunology**, vol. 165, no. 8, pp. 4704–4709, 2000.

SHAKOORY, B. et al. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in EosinophilBiology. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 24, n. 5, p. 271–281, maio 2004.

SHAPIRO, S. D. The use of transgenic mice for modeling airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 699–701, out. 2008.

SIDDIQUI, S. et al. Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 122, n. 2, p. 335–41, 341.e1–3, ago. 2008.

SIVA, R. et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 5, p. 906–913, 1 maio 2007.

SILVA, J. M.; NEVES AZEVEDO, A. SANTOS BARBOSA, R. P. et al. Dynamics of murine B lymphocytes is modulated by in vivo treatment with steroid ouabain. **Immunobiology**. 221(2):368-76, 2016.

SILVA, J. M. C.; AZEVEDO, A. D. N.; BARBOSA, R. P. D. S. et al. Ouabain Decreases Regulatory T Cell Number in Mice by Reducing IL-2 Secretion. **Neuroimmunomodulation**. 14:1-10, 2019.

SENOL, M.; OZEROL, I. H.; PATEL, A. V.; SKONER, D.P. The effect of Na⁺-K⁺ ATPase inhibition by ouabain on histamine release from human cutaneous mast cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 294, n. 1-2, p. 25–29, 2007.

- SHAO, C. et al. HIF1 α -Induced Glycolysis in Macrophage Is Essential for the Protective Effect of Ouabain during Endotoxemia. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v 19, 2019.
- SONG, W. J., et al. Epidemiology of adult asthma in Asia: toward a better understanding. *Asia Pac Allergy*. 2014 Apr; 4(2):75-85.
- STOCK, P. et al. CD8+ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 7, p. 1817–1827, jul. 2004.
- SZELENYI, I. Animal models of bronchial asthma. **Inflammation Research**, v. 49, n. 12, p. 639–654, 1 dez. 2000.
- SZAMEL, M.; SCHNEIDER, S.; RESCH, K. Functional interrelationship between Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 17, p. 9198-204, 1981.
- SZAMEL, M. et al. Differential signal transduction pathway regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 12, p. 33-42, 1995.
- TAHA, R. A.; LABERGE, S. et al. Increased expression of the chemoattractant cytokines eotaxin, monocyte chemotactic protein-4, and interleukin-16 in induced sputum in asthmatic patients. **Chest**, 120:595-601, 2001.
- TAI, P.C.; HAYES, D.J.; CLARK, J.B.; SPRY, C.J. Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells in vitro. **Biochem J.**, v. 204, n.1, p. 75-80, 1982.
- TAKHAR P.; CORRIGAN C. J., SMURTHWAITE, L. et al. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 119(1): 213-218, 2007.
- TAY, T. R., et al. Comparison of the Proportion and Healthcare Utilisation of Adult Patients with Uncontrolled Severe Asthma versus Non-Severe Asthma Seen in a Southeast Asian Hospital-Based Respiratory Specialist Clinic. *Ann Acad Med Singap*. 2017 Jun; 46(6):217-228.
- TEIXEIRA, M. P.; RUMJANEK, V. M. Ouabain affects the expression of activation markers, cytokine production, and endocytosis of human monocytes. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- THOMAS, S. S.; CHHABRA, S. K. A study on the serum levels of interleukin-1beta in bronchial asthma. **J Indian Med Assoc**, v. 101, n. (5), p. 282-286, 2003.

- TIAN, J.; CAI, T.; YUAN, Z. et al. Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase Forms a Functional Signaling Complex. **Mol Biol Cell**. 2006 Jan; 17(1):317±26, 2006.
- TRAUTMANN, A. et al. T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 109(2): 329–337, 2002.
- TRAN T. N., et al. High blood eosinophil count is associated with more frequent asthma attacks in asthma patients. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 113, n. 1, p. 19-24, 2014.
- UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. The regulation of allergy and asthma. **Immunological Reviews**, v. 212, n. 1, p. 238–255, ago. 2006.
- VALENTE, R. C. et al. mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p. 228-236, 2009.
- VAN DER WORP, H. B. et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? **PLoS Medicine**, v. 7, n. 3, p. e1000245, 30 mar. 2010.
- VAN HELDEN, M. J.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells in asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 745–754, 2013.
- VAN RIJT, L. S. et al. Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells. **Journal of immunology**, v. 171, n. 7, p. 3372–8, out. 2003.
- VAN RIJT, L. S. et al. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. **Journal of Immunological Methods**, v. 288, n. 1–2, p. 111–121, maio 2004.
- VAN PANHUYSEN, N. et al. Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 2719–2728, 2011.
- VASCONCELOS, R. M.; LEITE, F. C.; LEITE, J. A.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, p.1–11, 2011
- VIGNOLA, A. M.; MIRABELLA, F.; COSTANZO, G. et al. Airway remodeling in asthma. **Chest**, v .123, p. 417S–422, 2003.
- WAGERS, S. et al. The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2019–2027, jun. 2004.
- WARD, P. A.; BECKER, E. L. Potassium reversible inhibition of leukotaxis by ouabain. **Life sciences**, v. 9, n. 6, p. 355–60, 1970.

- 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.
- WENZEL, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. **Lancet**, v. 368, p. 804-8013, 2006.
- WENZEL, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716-725, 2012.
- WHEATLEY, L. M.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 456–463, 29 jan. 2015.
- WHITE, M. V. The role of histamine in allergic diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 4 PART 2, p. 599–605, 1990.
- WHO. **WHO | Asthma (World Health Organization)**. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 11 out. 2021.
- WILLART, M. A.; DESWARTE, K.; POULIOT, P.; BRAUN, H. et al. Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. **J Exp Med**, 209(8): 1505-1517, 2012.
- WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 5, p. 271–282, 17 maio 2015.
- XIA, M. X.; et al. Inhaled budesonide protects against chronic asthma-induced neuroinflammation in mouse brain. **J Neuroimmunol**, v. 15; p. 53-57, 2014.
- XIE, Z.; ASKARI, A. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a signal transducer. **Eur J Biochem**, p 2434–9, 2002.
- YOSHIMOTO, T. et al. Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide–MHC class II complexes to CD4+ T cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 7, p. 706–712, 24 jul. 2009.
- YOUSEFI, S.; SIMON, D.; SIMON, H.-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 736–739, dez. 2012.
- YUN-CHOI, H. S. et al. Antithrombotic effects of YS-49 and YS-51--1-naphthylmethyl analogs of higenamine. **Thrombosis research**, v. 104, n. 4, p. 249–55, 15 nov. 2001.
- ZHAKEER, Z. et al. Bufalin Inhibits the Inflammatory Effects in Asthmatic Mice through the Suppression of Nuclear Factor-Kappa B Activity. **Pharmacology**, 99(3-4), 179–187, 2017.
- ZHANG, T. Z. et al. Anti-asthmatic effects of oxymatrine in a mouse model of allergic

- asthma through regulating CD40 signaling. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 5, p.368–374, 2015.
- ZHANG, Z. et al. Higenamine promotes M2 macrophage activation and reduces Hmgb1 production through HO-1 induction in a murine model of spinal cord injury. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 681–687, dez. 2014.
- ZHANG, Z. et al. Dietary fiber intake regulates intestinal microflora and inhibits ovalbumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.
- ZOSKY, G. R.; SLY, P. D. Animal models of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v.37, n. 7, p. 973–988, jul. 2007.
- ZUBERBIER, T. et al. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA²LEN review. **Allergy**, v. 69, n. 10, p. 1275.
- ZHU, J., et al. Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. **Immunity**, v. 16, n. 5, p. 733–744, 2002.

APÊNDICES

A – Produção científica

1- Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. Inflammation Research (Fator de impacto: 4.575). 2017 (Artigo publicado).

Inflamm. Res.
DOI 10.1007/s0011-017-1092-9

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER



Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation

José Guilherme E. M. Galvão¹ · Laiz Henrique Agra Cavalcante-Silva¹ ·
Deyse Cristina M. Carvalho¹ · Laércia Karla D. P. Ferreira² ·
Talissa Mozzini Monteiro² · Adriano Francisco Alves² ·
Larissa Adilis M. P. Ferreira² · Francisco Allysson A. F. Gadelha² ·
Marcia Regina Pluvezam² · Sandra Rodrigues-Marcenaro¹

Received: 8 May 2017 / Revised: 8 September 2017 / Accepted: 11 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 $\text{CD3}^{+}\text{CD4}^{+}$ 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.

Conclusion 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 *Avicennia ouabaio* and *Strychnos guineensis* [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 induces 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 NF- κ B levels in thymocytes [17, 21]. The association of ouabain plus corticoids produced a synergistic 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-Marcenaro
sandra@chiteca.ufpb.br

¹ Laboratório de Imunobiotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brasil

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

2- Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. Frontiers of Physiology (Fator de impacto: 4.566). 2018 (Artigo publicado).



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

Luiz 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. Galvão¹, Juliane S. de França da Silva¹ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,*}

OPEN ACCESS

Edited and reviewed by:

Carlos Rosales,
Universidad Nacional Autónoma de
Méjico, Mexico

*Correspondence:

Sandra Rodrigues-Mascarenhas
sandra@cbm.uol.br

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

Received: 22 December 2017

Accepted: 03 January 2018

Published: 12 January 2018

Citation:

Cavalcante-Silva LHA, Lima EA, Carvalho DCM, Sales-Neto JM, Alves AKA, Galvão JGFM, Silva JSF and Rodrigues-Mascarenhas S (2018)

Corrigendum: Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain.
Front. Physiol. 9:1.
doi: 10.3389/fphys.2018.00001

¹Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Biológicos, 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 Multidisciplinar de Pós-graduação em Clínicas Fisiológicas, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

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

A corrigendum on

Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain
by Cavalcante-Silva, L. H. A., Lima, E. A., Carvalho, D. C. M., Sales-Neto, J. M., Alves, A. K. A., Galvão, J. G. F. M., et al. (2017). *Front. Physiol.* 8:895. doi: 10.3389/fphys.2017.00895

In the original article, we neglected to include the funder CAPES/PROCAD-2013, grant number 2951/2014. The authors apologize for this error and state that this does not change the scientific conclusions of the article in any way.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Cavalcante-Silva, Lima, Carvalho, de Sales-Neto, Alves, Galvão, Silva and Rodrigues-Mascarenhas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3- 2-Allylphenol Reduces IL-1 β and TNF- α , Promoting Antinociception through Adenosinergic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Mechanisms. Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Fator de impacto: 6.543). 2019 (Artigo publicado).

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2019, Article ID 1346876, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/1346876>



Research Article

2-Allylphenol Reduces IL-1 β and TNF- α , Promoting Antinociception through Adenosinergic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Mechanisms

Humberto de Carvalho Aragão Neto ,¹ Diogo Vilar da Fonseca,¹ Renan Marinho Braga,¹ Marcus Tullius Scotti ,¹ Terezinha Weyne Araújo Borges do Nascimento,¹ Davidson Barbosa Assis,¹ Sandra Rodrigues-Mascarenhas ,¹ Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva ,¹ José Guilherme Ferreira Marques Galvão,¹ Hugo Alexandre Oliveira Rocha ,² Arthur Antunes Jacome Vidal,² José Maria Barbosa Filho ,¹ and Reinaldo Nóbrega de Almeida ¹

¹Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-085, Brazil

²Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal 59072-900, Brazil

Correspondence should be addressed to Reinaldo Nóbrega de Almeida; reinaldoun@aol.com.br

Received 27 June 2018; Revised 6 November 2018; Accepted 15 January 2019; Published 31 March 2019

Academic Editor: David Norman

Copyright © 2019 Humberto de Carvalho Aragão Neto et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2-Allylphenol (2-AP) is a synthetic phenylpropanoid, structurally related to cardenol thymol, and ortho-angelic. Phenylpropanoids are described in the literature as being capable of promoting biological activity. Due to the similarity between 2-AP and other bioactive phenylpropanoids, the present research aims at evaluating the antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory potential of 2-AP *in silico*, *in vitro*, and *in vivo*. At 30 min prior to the start of *in vivo* pharmacological testing, administration of 2-AP (25, 50, 75, and 100 mg/kg i.p.), morphine (6 mg/kg i.p.), dexamethasone (2 mg/kg s.c.), or vehicle alone was performed. In the acetic acid-induced abdominal writhing tests, pretreatment with 2-AP significantly induced the number of abdominal writhes, as well as decreased licking time in the glutamate and formalin tests. Investigation of the mechanism of action using the formalin model led to the conclusion that the opioid system does not participate in its activity. However, the adenosinergic system is involved. In the peritonitis test, 2-AP inhibited leukocyte migration and reduced release of proinflammatory mediators TNF- α and IL-1 β . *In vitro* antioxidant assays demonstrated that 2-AP presents significant ability to sequester superoxide radicals. *In silico* docking studies confirmed interaction between 2-AP and the adenosine A_{2a} receptor through hydrogen bonds with the critical asparagine 253 residues present in the active site. Investigation of 2-AP demonstrated its nociception inhibition and ability to reduce reactive oxygen species. Its interaction with A_{2a} receptors may well be related to its inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β induction activity, corroborating its antinociceptive effect.

I. Introduction

Nociception is the transmission of signals captured by free nerve endings in response to noxious stimuli; this stimulus is converted into electrical signals that reach the spinal cord, thalamus, and cerebral cortex [1]. Increased oxidative stress and inflammation are factors capable of amplifying pain.

The exacerbated production of inflammatory mediators, such as cytokines (TNF- α and IL-1 β), sensitizes and/or activates nociceptive neurons. This sensitization initially occurs in nociceptive neurons near injured tissue, leading to increases in pain sensation at the site [2, 3]. Inflammatory mediators induce recruitment of neutrophils responsible for producing reactive oxygen species (ROS), such as the

4-Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. Journal of Immunology Research (Fator de impacto: 4.818). 2019 (Artigo publicado).

Hindawi
Journal of Immunology Research
Volume 2019, Article ID 1094520, 11 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/1094520>



Research Article

Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines

Deyse C. M. Carvalho,¹ Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva,¹ Éssia de A. Lima,¹ José G. F. M. Galvão,¹ Anne K. de A. Alves,¹ Priscilla R. O. Feijó,² Luis E. M. Quintas,² and Sandra Rodrigues-Mascarenhas.¹

¹Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB 58051-900, Brazil

²Laboratory of Biochemical and Molecular Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Health Science Center, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

Correspondence should be addressed to Sandra Rodrigues-Mascarenhas; sandra@chatec.ufpb.br

Received 4 December 2018; Accepted 28 April 2019; Published 20 May 2019

Academic Editor: Patrice Petit

Copyright © 2019 Deyse C. M. Carvalho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cardiotonic steroids, such as ouabain and digoxin, are known to bind to Na⁺/K⁺-ATPase and to promote several biological activities, including anti-inflammatory activity. However, there are still no reports in the literature about inflammation and marinobufagenin, a cardiotonic steroid from the bufadienolide family endogenously found in mammals. Therefore, the aim of this work was to analyze, *in vivo* and *in vitro*, the role of marinobufagenin in acute inflammation. Swiss mice were treated with 0.56 mg/kg of marinobufagenin intraperitoneally (ip) and zymosan (2 mg/ml, ip) was used to induce peritoneal inflammation. Peritoneal fluid was collected and used for counting cells by optical microscopy and proinflammatory cytokine quantification (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) by immunoenzymatic assay (ELISA). Zymosan stimulation, as expected, induced increased cell migration and proinflammatory cytokine levels in the peritoneum. Marinobufagenin treatment reduced polymorphonuclear cell migration and IL-1 β and IL-6 levels in the peritoneal cavity, without interfering in TNF- α levels. In addition, the effect of marinobufagenin was evaluated using peritoneal macrophages stimulated by zymosan (0.2 mg/ml) *in vitro*. Marinobufagenin treatment at different concentrations (10, 100, 1000, and 10000 nM) showed no cytotoxic effect on peritoneal macrophages. Interestingly, the lowest concentration, which did not inhibit Na⁺/K⁺-ATPase activity, attenuated proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels. To investigate the putative mechanism of action of marinobufagenin, the expression of surface molecules (TLR2 and CD69) and P-p38 MAPK were also evaluated, but no significant effect was observed. Thus, our results suggest that marinobufagenin has an anti-inflammatory role *in vivo* and *in vitro* and reveals a novel possible endogenous function of this steroid in mammals.

1. Introduction

Cardiotonic steroids are natural compounds capable of inhibiting Na⁺/K⁺-ATPase activity, inducing positive cardiac inotropism [1]. Marinobufagenin is a cardiotonic steroid originally isolated from *Bufo marinus* toad venom, currently called *Rhinella marina* [2]. More recently, this substance has been identified in mammalian plasma and urine, being synthesized by the adrenal gland [3, 4]. The putative physiological role of marinobufagenin as natriuretic and vasoconstrictor has also

been experimentally supported [5, 6]. Consequently, this steroid is now considered a mammalian hormone [7, 8], but its endogenous functions are far from being fully understood.

Some studies suggest that cardiotonic steroids, such as ouabain, digoxin, and bufalin, have immunomodulatory activity because they interfere in several inflammatory parameters such as cell migration, vascular permeability, and proinflammatory cytokines [9–14]. The immune system, among several other functions, plays a fundamental role in the recognition and elimination of pathogenic microorganisms by

5- Propriedades terapêuticas da *moringa oleífera* lam. no tratamento do *diabetes mellitus*. Research, Society and Development (Fator de impacto: 1.78). 2020 (Artigo publicado).

Research, Society and Development, v. 9, n. 7, e485974270, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4270>

Andrade, JA, Fernandes, DP, Galvão, JGFM, Silva, DR & Nobrega, RO (2020). Therapeutic properties of *moringa oleifera* lam. in the treatment of *diabetes mellitus*. Research, Society and Development, 9(7): 1-24, e485974270.

Propriedades terapêuticas da *moringa oleífera* lam. no tratamento do *diabetes mellitus*

Therapeutic properties of *moringa oleifera* lam. in the treatment of *diabetes mellitus*

Propiedades terapéuticas de *moringa oleifera* lam. en el tratamiento de la *diabetes mellitus*

Recebido: 06/05/2020 | Revisado: 10/05/2020 | Aceito: 13/05/2020 | Publicado: 23/05/2020

José Isaac Alves de Andrade

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4954-1591>

Faculdade Santa Maria, Brasil

E-mail: isaac-uma@hotmail.com

Daniel Pinheiro Fernandes

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3294-2863>

Faculdade Santa Maria, Brasil

E-mail: dpinheiro15@yahoo.com.br

José Guilherme Ferreira Marques Galvão

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2601-389X>

Faculdade Santa Maria, Brasil

E-mail: guilhermefirst@gmail.com

Danielle Rocha Silva

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2949-2008>

Faculdade Santa Maria

E-mail: prof.daniellerocha@hotmail.com

Rafaela de Oliveira Nobrega

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2303-9218>

Faculdade Santa Maria, Brasil

E-mail: rafaelaconobregas@gmail.com

Resumo

A *Moringa oleifera* é uma espécie de planta perene, nativa do oeste e sul dos Himalaias e do nordeste da Índia. Sua riqueza nutricional e fitoquímica tem sido alvo de vários estudos, pois

6- Neutrophils and covid-19: The road so far. International Immunopharmacology (Fator de impacto: 3,943). 2021 (artigo publicado).

International Immunopharmacology 90 (2021) 107233



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



Review

Neutrophils and COVID-19: The road so far



Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva, Deyse Cristina Madruga Carvalho, Éssia de Almeida Lima, José G.F.M. Galvão, Juliane S. de França da Silva, José Marreiro de Sales-Neto, Sandra Rodrigues-Mascarenhas*

Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Juiz de Fora, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Inflammation
Chemokines
NRTs
SARS-CoV2

ABSTRACT

The SARS-CoV2 infection triggers a multi-system inflammatory disorder, known as COVID-19, a pandemic disease. This disease is characterized by acute respiratory distress syndrome, cytokine-driven hyper-inflammation, and leukocyte count changes. The innate immune response has been linked to COVID-19 immunopathogenesis (e.g., dysfunctional IFN response and myocardial inflammation). In this regard, neutrophils have been highlighted as essential effector cells in the development of COVID-19. This review summarized the significant finds about neutrophils and its effector mechanisms (e.g., neutrophil extracellular traps and cytokines, neutrophil extracellular traps) in COVID-19 so far.

1. Introduction: COVID-19

COVID-19 (Coronavirus disease 2019) is an infectious inflammatory disease caused by SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) [1], a new type of coronavirus identified in China in December 2019 after several patients were diagnosed with non-specific pneumonia [2]. The coronavirus outbreak began in Wuhan, the capital of Hubei province, and quickly spread across continental dimensions, turning Covid-19 into a pandemic disease [3].

Coronaviruses are single-stranded RNA viruses that are characterized by having crown-like projections on their surface. There are four main proteins in the structure of these microorganisms, including the spike protein (S), which is related to the host cell mechanism of invasion [4]. The SARS-CoV-2 is the third virus of the β coronavirus group to demonstrate the capacity to infect humans with pandemic potential [5]. SARS-CoV and the MERS-CoV (Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus) were responsible for previous relevant outbreaks of respiratory disease in 2003 [6,7] and 2012 [8,9], respectively.

Human-to-human transmission occurs through direct contact or respiratory droplets from infected individuals, whether symptomatic or asymptomatic [10–12]. Several reports have suggested that other forms of transmission, such as the fecal-oral route [13–16] and intramembranous vertical transmission, may also happen [17,18]. However, more studies need to be carried out to confirm this form of transmission.

The clinical features of COVID-19 may appear after an incubation

period of around 5–14 days [19]. Some early symptoms resemble those of other viral respiratory infections, such as those caused by influenza viruses. However, dyspnea and high fever define the main clinical difference between COVID-19 and common cold [20]. Additionally, when compared to the influenza virus, SARS-CoV-2 infection presents greater chances of progressing to severe and critical infections, which require oxygen therapy and ventilatory support [21]. Elderly patients and those with chronic conditions have higher risks of rapid progression to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multiple organ failure, often resulting in death. These features demonstrate a systemic aspect of this infection, which is accompanied by an intense inflammatory process [22–24].

2. COVID-19 and inflammation

The COVID-19 infection starts by exposure to microdroplets present in the exhalations of infected individuals. Then, the SARS-CoV-2 spreads to the bronchioles and alveolar spaces [25], entering into the host cells (e.g., endothelial, epithelial, and smooth muscle cells) by binding the angiotensin-converting enzyme (ACE)-2, a metallopeptidase present on the cell surface [26–29].

In the lung, SARS-CoV-2 infects the alveolar cells (type I and II pneumocytes and alveolar macrophages) and then starts intracellular replication in pulmonary tissues. Type I and III interferons (IFN) production is an early defense mechanism in the alveolar cells [25].

* Corresponding author.

E-mail address: sandra@chionc.ufpr.br (S. Rodrigues-Mascarenhas).

**7 - Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice.
International Immunopharmacology. (Fator de impacto:3,943). 2022 (Artigo submetido).**

 International Immunopharmacology <em@editorialmanager.com> 27 de jan. de 2022 10:40 (há 8 dias)  

 para mim 

 inglês  português  Traduzir mensagem Desativar para: inglês 

This is an automated message.

Journal: International Immunopharmacology

Title: Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice

Corresponding Author: Dr. Sandra Rodrigues-Mascarenhas

Co-Authors: José Guilherme Ferreira Marques Galvão; Luiz Cavalcante-Silva; Éssia Lima; Deyse Carvalho; Adriano Alves

Manuscript Number: INTIMP-D-22-00305

Dear José Guilherme Ferreira Marques Galvão,

The corresponding author Dr. Sandra Rodrigues-Mascarenhas has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for International Immunopharmacology.

Submission Title: Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

8- DEPÓSITO DE PATENTE: “Ouabaína como inibidor da migração de neutrófilos”. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210248696, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito aprovado: 09/12/2021.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
AGÊNCIA UFPB DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

REQUISIÇÃO

SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS, Professora Associada do Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e-mail: sandra@cbiotec.ufpb.br, **LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE SILVA**, ~~pós-doutorando~~ e egresso do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, e-mail: luis0710@gmail.com, **JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA**, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, e-mail: juliane.franca@itf.ufpb.br, **JOÃO GUILHERME FERREIRA MARQUES GALVÃO**, doutorando do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, e-mail: guilhermeferst@itf.ufpb.br, **JOÃO MARREIRO DE SALES NETO**, doutorando do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, e-mail: engenheiro.sales@gmail.com, **DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO**, doutoranda do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, e-mail: deysecmc@gmail.com, **ESSIA DE ALMEIDA LIMA**, doutoranda do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, e-mail: essia_almeida@hotmail.com, solicitam à INOVA-UFPB o depósito da patente provisoriamente intitulada: “UTILIZAÇÃO DA OUABAÍNA COMO INIBIDOR DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.”

João Pessoa, 15 de abril de 2021.

Sandra Rodrigues Mascarenhas

Sandra Rodrigues Mascarenhas

ANEXO

ANEXO 1: Certificado da Comissão 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 "Avaliação do efeito da ouabaina sobre a neuroinflamação induzida por asma severa" protocolo nº 100/2016 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).

Vigência do Projeto	2017-2021
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> Balb/c
Número de animais	187
Idade/Peso	4 semanas - 18-22g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB