



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



DANIELLE INGRID BEZERRA DE VASCONCELOS

**ANÁLISE DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA OUABAÍNA NA INFLAMAÇÃO E
NA NOCICEPÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa – PB
2011



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



DANIELLE INGRID BEZERRA DE VASCONCELOS

**ANÁLISE DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA OUABAÍNA NA
INFLAMAÇÃO E NOCICEPÇÃO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular do
Centro de Ciências Exatas e da
Natureza, da Universidade Federal
da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de **MESTRE EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

João Pessoa – PB

2011

V331a Vasconcelos, Danielle Ingrid Bezerra de.
Análise do efeito imunomodulador da ouabaína na
inflamação e nocicepção / Danielle Ingrid Bezerra de
Vasconcelos.- João Pessoa, 2011.
142f. : il.
Orientadora: Sandra Rodrigues Mascarenhas
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Biologia Celular e Molecular. 2. Ouabaína. 3. Anti-
inflamatória. 4. Anti-nociceptiva.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)



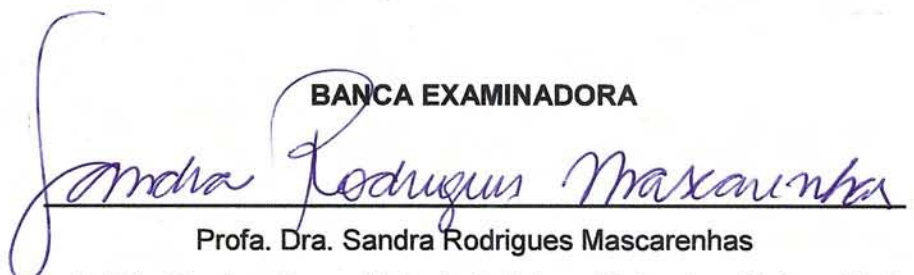
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos

Dissertação de Mestrado avaliada em 30 / 09 / 11

BANCA EXAMINADORA

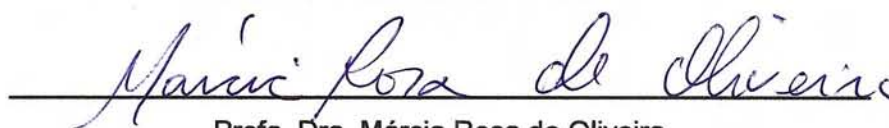


Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Orientadora

Prof. Robson Coutinho-Silva Ph.D.

Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador/a Externo/a



Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Examinadora Interna

Prof. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, com muito carinho, por sempre acreditar no meu sonho e fazer todo o possível para que ele se tornasse realidade.

EPIGRAFE***“De Tudo Ficaram Três Coisas”***

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura... Um encontro

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pela saúde, força e coragem que me proporcionou durante essa fase de minha vida, e principalmente pelo êxito obtido.

À minha mãe, Maria do Socorro Bezerra da Silva, por sua presença, paciência, disponibilidade, amor, preocupação e dedicação todos esses anos. Mãe, obrigada por ter sido sempre tão especial e maravilhosa em minha vida, por sempre ter me dado tanta força e acreditado na possibilidade de todas as minhas realizações.

À minha família, meu irmão, **David Ingsson Bezerra de Vasconcelos**, pois mesmo com seu jeito adolescente fez o possível para me ajudar na realização de minhas atividades. Aos meus tios e tias, avó (*in memoriam*), primos e primas, que tanto confiaram no meu potencial e fizeram o possível para manter meu bem-estar.

À minha orientadora, Sandra Rodrigues Mascarenhas, que foi uma peça chave na minha introdução na vida científica e em toda minha trajetória profissional. Muito obrigada por todas as oportunidades, em especial pelo curso e tutoria dos surdos, que foi uma das melhores experiências de trabalho que pude vivenciar. Obrigada pela confiança, preocupação, disponibilidade e carinho.

Aos meus amigos de pós-graduação, por terem tornados todos os “árduos” momentos de trabalho, em momentos descontraídos. Por serem sempre tão atenciosos e prestativos e por me proporcionar o prazer de ter a companhia de todos, apesar de um tão curto espaço de tempo. Sentirei saudades dos nossos sanduíches e conversas nas madrugadas.

Aos meus colegas de laboratório, que foram tantos em todos esses anos, que não vou arriscar citar nomes, para não esquecer ninguém. Agradeço em especial **aos companheiros de bancada Jacqueline Alves Leite, Juliana da Silva Brandi, Maria Raquel Vitorino de Lima, Airla Laana de Medeiros Cavalcanti e Jéssica de Sá Barreto Callou Peixoto** que foram essenciais para realização desse trabalho, além disso, aos que cooperaram em alguns experimentos Josenilson Feitosa de Lima, Guilherme Carneiro, Fabíola Lélis e Fabrícia Montenegro. Obrigada por todos os momentos de grande teor científico e por todos os momentos divertidos que passamos juntos.

A todos que foram **monitores do curso de surdos** pelo trabalho, colaboração e amizade que passamos, apesar de em um curto espaço de tempo. Agradeço em especial a **Fábio Henrique Tenório de Souza**, por ter sido sempre tão cooperativo e disponível em ajudar sempre.

Aos **amigos pessoais**. Obrigada à todos pelos conselhos, colaborações acadêmicas e científicas, pelo carinho, paciência, amizade, sorrisos e crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

Às professoras que tiveram uma colaboração direta na realização desse trabalho **Márcia Regina Piuvezam e Liana Clébia Lima de Moraes**, que me acolheram tão bem em seus laboratórios e cederam substâncias essenciais para realização dos testes, além de todo o conhecimento científico que precisei.

Aos professores que aceitaram prontamente fazer parte da **banca** e colaborar para a melhoria desse trabalho: **Prof. Robson Coutinho-Silva Ph.D., Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira e Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua**.

À professora Dra. Cristine Hirsch Monteiro, que com tanta dedicação acompanhou meu estágio docência. Obrigada por ter aceitado me orientar nessa disciplina, por toda atenção e disponibilidade. Obrigada por ter me cedido sua turma e ter acompanhado tão de perto todo o processo, me ajudando sempre no meu crescimento profissional, com todo profissionalismo e delicadeza inerentes à sua pessoa. Obrigada pela confiança,

Ao professor e **coordenador da Pós- Graduação, Dr. Luis Fernando Marques-Santos** por ter aceitado ser o meu **tutor na bolsa REUNI**, por confiar no meu trabalho e estar sempre tão disposto a ajudar no meu crescimento profissional. Além disso, por ser super acessível à resolução de todas as dúvidas e problemas.

À José Crispim Duarte e Luis Cordeiro, do Biotério Thomas George (LTF/UFPB), pela amizade e apoio na disponibilidade dos animais.

Às **secretárias do DBM Ludmilla Maul, Regina Emy Sales de Miranda e Dione Alves Porto** por serem sempre tão competentes solícitas e prestativas, além de transformar o ambiente de trabalho num lugar de convivência tão prazerosa. Obrigada por ajudar a resolver todos “os pepinos” e pela companhia na hora do almoço.

Aos demais **funcionários do LTF/UFPB e DBM/UFPB** por sempre estarem disponíveis e tornarem a realização do nosso trabalho a melhor possível.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** CAPES-REUNI pelo apoio financeiro.

A **todos** que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho: **meu muito obrigada!**

RESUMO

A Ouabaína é um glicosídeo cardiotônico, inibidor da Na⁺/K⁺-ATPase, utilizada na clínica para o tratamento de insuficiência cardíaca. Atualmente, sabe-se que essa substância é endógena, e capaz de interferir em várias funções fisiológicas, inclusive em diversos aspectos do sistema imunológico. Apesar disso, pouco se sabe sobre seu envolvimento em processos inflamatórios e nociceptivos. Neste trabalho, foi avaliada a atividade da Ouabaína na inflamação aguda desencadeada pela administração de diversos agentes flogísticos (carragenina, composto 48/80, histamina, PGE2 e bradicinina) e em modelos nociceptivos (contorções abdominais induzidas por ácido acético e placa quente). A Ouabaína produziu uma redução no edema de pata produzido por carragenina e pelo composto 48/80. Esse potencial anti-inflamatório está relacionado ao bloqueio da degranulação de mastócitos, bem como pela inibição da via da PGE2 e da bradicinina, porém é independente da via da histamina. A Ouabaína também apresentou uma atividade anti-nociceptiva central e periférica. Esse efeito está vinculado à inibição da via dos mediadores inflamatórios e a mecanismos opióides, visto que foi revertido pela administração da naloxona, um inibidor dos receptores opióides. Adicionalmente, foi descrito que a inibição da dor pela Ouabaína não possui envolvimento com sedação ou diminuição da capacidade motora. O conjunto desses dados demonstra pela primeira vez, *in vivo*, a atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva da Ouabaína.

PALAVRAS-CHAVE: Ouabaína; anti-inflamatória; anti-nociceptiva.

ABSTRACT

Ouabain, known as a cardiotonic glycoside capable of inhibiting the Na^+/K^+ ATPase, was widely used for heart failure treatment. Identified as an endogenous substance, ouabain is capable of interfering with various physiological functions, including immune system modulation. Besides that, little is known about the involvement of this substance in nociceptive and inflammatory processes. The present study investigated the role of ouabain in acute peripheral inflammation induced by intraplantar administration of different phlogistic agents (carrageenan, compound 48/80, histamine, bradykinin, and PGE₂) and in nociceptive processes (abdominal writhing induced by acetic acid and hot plate). Ouabain produced a significant reduction in the mouse paw edema induced by carrageenan and compound 48/80. This antiinflammatory effect of ouabain is associated to the inhibition of PGE₂, bradykinin, and mast-cell degranulation, but not to histamine. Ouabain also presented a central and peripheral anti-nociceptive activity. This analgesic potential might be related to the inhibition of inflammatory mediators and to activation of opioid receptors, since it was reversed by naloxone, an opioid antagonist. Additionally, the analgesic effect of ouabain was not related to sedative effect or to motor function. Taken together, the present work demonstrated for the first time, *in vivo*, the antiinflammatory and analgesic potential of ouabain.

KEY-WORDS: **Ouabain; antiinflammatory; antinociceptive**

Lista de abreviaturas e siglas

µg - micrograma

µL – microlitro

ATP – Adenosina trifosfato

AP1 - proteína ativadora -1

BRAD – bradicinina

CaMKII - Proteína quinase dependente de Ca²⁺ /Calmodulina

CAR – carragenina

CD14 - Grupo de diferenciação 14

CD69 - Grupo de diferenciação 69

CoNA - Concanavalina A

COX-1 – Ciclooxygenase -1

COX-2 - Ciclooxygenase -2

COX-3 - Ciclooxygenase -3

DAG – diacilglicerol

DP – receptor de prostaglandina D2

DEXA- dexametasona

DZP- diazepam

eNOS - sintase de óxido nítrico endotelial

EP– receptor de prostaglandina E2

FP– receptor de prostaglandina F2a

GMPcíclico - guanosina monofosfato cíclica

HIS - histamina

HR - receptor de histamina

ICAM-1 – Molécula de adesão inter-celular 1

IL 2 - Interleucina 2

IL-1 – Interleucina 1

IL-1- α - Interleucina 1- α

IL-1- β - Interleucina 1- β

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IgG – Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IND- indometacina

INF- γ – Interferon - γ

iNOS - sintase de óxido nítrico induzida

i.p. - intraperitoneal

IP – receptor de prostaglandina I₂

IP₃ - inositol-1,4,5-trifosfato

KDa – Kilodáton

Kg – quilograma

LPS – lipopolissacarídeo

LTs - leucotrienos

MAPK p38 – proteína quinase ativada por mitógeno p 38

mg – miligrama

MHC- complexo de histocompatibilidade principal

mL - mililitro

mm – milímetro

MOR- morfina

N- referente a parte amino de uma proteína

NFATc1 - fator nuclear de células T ativadas

NK - células natural killer

NFκB - factor nuclear kappa B

NLX – Naloxona

nM- nanomolar

nmol- nanomol

nNOS - sintase de óxido nítrico neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - sintase de óxido nítrico

OUA- Ouabaína

PAF - fator de agregação plaquetária

PBS –tampão fosfato salino

pH - potencial hidrogeniônico

PHA – fitohemaglutinina

PGD2 - prostaglandina D2

PGE2 - prostaglandina E2

PGF2a - prostaglandina F2a

PGG2 – prostaglandina G2

PGH2 - prostaglandina H2

PGI2 - prostaglandina I2

SALB- salbultamol

s.c. - subcutânea

SNC- sistema nervoso central

TNF– Fator de necrose tumoral

TNF-α – Fator de necrose tumoral –α

TP- Receptor de prostaglandina

TXA2 - tromboxano A2

V-CAM1- proteína de adesão vascular 1

VE- caderina - caderina endotelial vascular

48/80 - composto 48/80

Lista de símbolos

α - alfa

β - Beta

δ – Delta

κ - Kappa

μ – mu

γ - gama

% - por cento

$A\delta$ – A delta

$A\beta$ – A beta

Ca^{2+} - íon cálcio

H^+ - íon hidrogênio

K^+ - íon potássio

Na^+ - íon sódio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura química da Ouabaína endógena.....	21
FIGURA 2.	Esquema da estrutura da Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	23
FIGURA 3.	Ciclo catalítico da proteína transportadora (Na ⁺ /K ⁺)-ATPase.....	25
FIGURA 4.	A transdução de Sinal da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, desencadeada pela sua inibição parcial pela Ouabaína, e suas conseqüências em miócitos cardíacos.....	26
FIGURA 5.	Representação esquemática de algumas vias de sinalização iniciadas pela Ouabaína.....	29
FIGURA 6.	Mecanismos de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxiande neutrófilos.....	33
FIGURA 7.	Receptores H1 e sua ação na transcrição gênica de mediadores inflamatórios.....	37
FIGURA 8.	Tabela dos receptores de histamina, expressão tecidual, respectivas vias de sinalização e tipo de proteína G acoplada.....	38
FIGURA 9.	Esquema representativo do metabolismo do ácido aracdônico pela via da cicloxigenase e lipoxigenase.....	40
FIGURA 10.	Produção das prostaglandinas através da via da cicloxigenase.....	41
FIGURA 11.	Receptores de PGE2 e suas vias de sinalização.....	42
FIGURA 12.	Via de produção da bradicinina.....	43
FIGURA 13.	A cascata inflamatória desencadeada por IL-1 e TNF.....	45

FIGURA 14.	Representação esquemática do rearranjo do citoesqueleto celular, promovendo o aumento da permeabilidade vascular.....	48
FIGURA 15.	Sensibilização de nociceptores periféricos a partir de mediadores químicos liberados em virtude de uma lesão tecidual.....	50
FIGURA 16.	Diferentes nociceptores detectam diferentes tipos de dor.....	52
FIGURA 17.	Mecanismos de transmissão da dor aguda.....	53
FIGURA 18.	Desenho esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal.....	54
FIGURA 19.	Resumo esquemático do estudo da atividade anti-inflamatória da Ouabaína através do teste de edema de pata com diferentes agentes flogísticos.....	63
FIGURA 20.	Resumo esquemático da metodologia aplicada no estudo da atividade anti-inflamatória da Ouabaína através do teste de edema de pata com diferentes agentes flogísticos.....	63
FIGURA 21.	Resumo esquemático da metodologia aplicada no teste de placa quente e avaliação do possível efeito opióide da Ouabaína.....	65
FIGURA 22.	Efeito da Ouabaína no edema de pata induzido por carragenina.....	68
FIGURA 23.	Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado por 48/80.....	70
FIGURA 24.	Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado por histamina.....	72
FIGURA 25.	Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado por PGE2.....	74
FIGURA 26.	Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado pela	

bradicinina.....	76
FIGURA 27. Efeito da Ouabaína no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	78
FIGURA 28. Efeito da Ouabaína no teste de placa quente.....	80
FIGURA 29. Efeito da Ouabaína no teste de labirinto de cruz elevada.....	82
FIGURA 30. Resumo esquemático do efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo da Ouabaína.....	93

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	A Ouabaína	21
1.2	A Na ⁺ /K ⁺ - ATPase: caracterização do receptor da Ouabaína.....	22
1.3.	Atuação fisiopatológica da Ouabaína.....	27
1.3.1.	Atuação da Ouabaína no sistema imunológico.....	29
1.4.	Inflamação.....	31
1.4.1.	Inflamação aguda.....	32
1.4.1.1.	Componentes envolvidos na resposta inflamatória aguda.....	34
1.4.1.1.1.	“Sinais de perigo” e receptores Toll like.....	34
1.4.1.1.2.	Mediadores envolvidos na resposta inflamatória.....	35
1.4.1.1.2.1.	Aminas vasoativas	35
1.4.1.1.2.1.1.	Histamina.....	36
1.4.1.1.2.2.	Eicosanóides	38
1.4.1.1.2.2.1.	Prostaglandinas.....	40
1.4.1.1.2.3.	Cininas	42
1.4.1.1.2.3.1.	Bradicinina.....	43
1.4.1.1.2.4.	Citocinas pró-inflamatórias	43
1.4.1.1.2.5.	Citocinas quimiotáticas ou quimiocinas.....	45
1.4.1.1.2.6.	Outros mediadores.....	45
1.4.1.1.3.	Formação do edema inflamatório.....	47
1.5.	Dor e nocicepção.....	48
1.5.1	Classificação da dor.....	49

1.5.2.	Mecanismo de transmissão da dor.....	49
1.5.3.	Processamento central da dor e sistema opióide.....	53
2.	OBJETIVOS.....	57
2.1.	Objetivo geral.....	58
2.2.	Objetivos específicos.....	58
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1.	Materiais.....	60
3.1.1.	Substâncias utilizadas.....	60
3.1.2.	Aparelhos e equipamentos utilizados.....	60
3.2.	Métodos.....	61
3.2.1.	Animais.....	61
3.2.2.	Tratamento dos animais com ouabaína.....	62
3.2.3.	Análise anti-inflamatória da Ouabaína.....	62
3.2.3.1.	Avaliação da atividade da ouabaína frente á inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos.....	62
3.2.4.	Estudo da atividade antinociceptiva da Ouabaína.....	63
3.2.4.1.	Interferência da Ouabaína no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	63
3.2.4.2.	Influência da Ouabaína no teste de placa quente e possibilidade de envolvimento opióide.....	64
3.2.5.	Avaliação da interferência da Ouabaína no comportamento.....	65
3.2.5.1.	Análise do efeito da Ouabaína na sedação e movimentação.....	65
3.2.6.	Análise Estatística.....	65
4.	RESULTADOS.....	66
4.1.	Efeito anti-inflamatório da Ouabaína.....	67
4.1.1	Efeito da Ouabaína no teste cutâneo induzido por carragenina.....	67
4.1.2.	Efeito da Ouabaína no edema de pata desencadeado pelo	

	composto 48/80.....	69
4.1.3.	Efeito da Ouabaína no teste cutâneo provocado pela histamina.....	69
4.1.4.	Efeito da Ouabaína no edema de pata desencadeado pela prostaglandina E2 (PGE2).....	73
4.1.5.	Efeito da Ouabaína no edema de pata induzido pela bradicinina.....	75
4.2.	Efeito anti-nociceptivo da Ouabaína.....	77
4.2.1	Efeito da Ouabaína no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	77
4.2.2	Efeito da Ouabaína no teste de placa quente e possível envolvimento opióide.....	79
4.3.	Interferência da Ouabaína no comportamento.....	81
4.3.1.	Análise do efeito da Ouabaína na sedação e movimentação.....	81
5.	DISCUSSÃO.....	83
6.	CONCLUSÕES.....	92
7.	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXOS.....	130
	Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	
	Anexo B: Artigo publicado	

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Ouabaína

A Ouabaína é um digitálico, que foi extraído inicialmente das sementes e raízes das árvores *Acocanthera ouabaio* e *Strophantus gratus*, da família Apocynaceae (BLAUSTEIN, 1993). No ano de 1991, Hamlyn e colaboradores caracterizaram a Ouabaína endógena, (Figura 1), encontrada no plasma humano. Esse composto foi descrito como sendo estruturalmente, biologicamente e imunologicamente indistinguível da Ouabaína proveniente de vegetais (HAMLYN *et al*, 1991).

Historicamente, o uso de digitálicos foi iniciado em 1775, por Willian Withering, o qual utilizou o extrato da dedaleira (*Digitallis purpurea*), para o tratamento da insuficiência cardíaca. Foi a partir desse momento que houve a introdução desses glicosídeos cardiotônicos no contexto do tratamento da insuficiência cardíaca. Por mais de 200 anos, esses medicamentos foram utilizados na clínica e apesar do desconhecimento do mecanismo, os resultados eram eficazes (WITHERING, 1785).

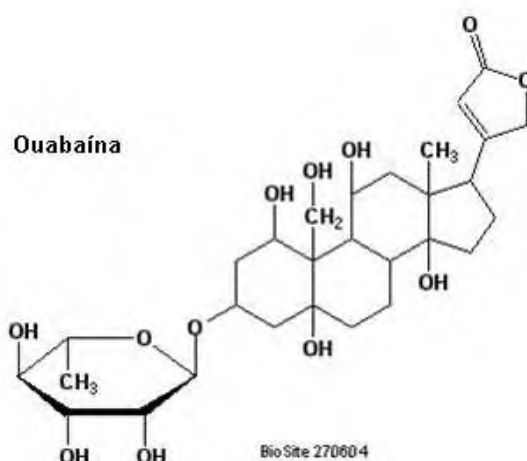


FIGURA 1: Estrutura química da Ouabaína endógena. FONTE: Retirado e adaptado de HINSON *et al*, 1995.

Shatzmann, em 1953, descobriu que os digitálicos atuavam inibindo a bomba de Na^+/K^+ , através de sua ligação na face exterior da membrana celular (HOFFMAN, 1966). A descoberta do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, em 1960, elucidou o mecanismo pelo qual a inibição da bomba de Na^+/K^+ causava o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular resultando na contração cardíaca (SCHONER, 2002).

No ano de 1960, Skou, demonstrou que a Ouabaína atuava semelhantemente aos outros glicosídeos, inibindo a atividade da Na^+/K^+ ATPase, interagindo com a subunidade α , onde se encontravam também os sítios de ligação do Na^+ , do K^+ e do ATP. A isoforma de

maior afinidade pelo glicosídeo é a subunidade α -3. A interação da região lipofílica da Ouabaína com a Na^+/K^+ ATPase depende da conformação dessa enzima, e seu sítio de ligação com alta afinidade pela Ouabaína, está disponível quando essa enzima atinge um estado conformacional ativo, denominado E2_i (QIU *et al.*, 2003).

Sugere-se que a Ouabaína endógena, seja produzida pela adrenal, hipotálamo e hipófise (HAMLYN *et al.*, 1991; LAREDO, HAMILTON, HAMLYN, 1994; FERRANDI *et al.*, 1997). Na glândula adrenal, a etapa inicial da síntese da Ouabaína endógena parece estar relacionada a clivagem da cadeia lateral da molécula de colesterol e ao metabolismo sequencial de progesterona e pregnenolona (HAMLYN *et al.*, 2003). Adicionalmente sugere-se que participam da síntese de esteróides algumas enzimas, a exemplo da enzima citocromo P-250, que parecem também estar associadas à produção de Ouabaína pela adrenal (LICHTSTEIN *et al.*, 1998). No entanto, os eventos mais tardios da cadeia da síntese deste digitálico permanecem obscuros.

A secreção de Ouabaína pela adrenal é dependente de ACTH (LAREDO, HAMILTON, HAMLYN, 1994; BECK *et al.* 1996; HINSON, HARWOOD, DAWNAY, 1998; SOPHOCLEOUS, ELMATZOGLOU, SOUVATZOGLOU, 2003) e angiotensina II (LAREDO *et al.* 1997; SHAH *et al.*, 1998), dessa forma, sua liberação ocorre em circunstâncias similares àquelas onde há secreção de corticóides. Em relação ao sistema nervoso, a produção da Ouabaína parece ser regulada por neurônios adrenérgicos centrais (YAMADA, GOTO, OMATA, 1995).

1.2. A Na^+/K^+ ATPase: caracterização do receptor da Ouabaína

A Na^+/K^+ ATPase foi descrita por Skou, em 1957, em estudos de frações microssomais de membranas de nervos de caranguejo. Trata-se de uma proteína eletrogênica que se utiliza da hidrólise de ATP para promover a entrada de 2 íons de K^+ e a saída de 3 Na^+ por transporte ativo, mantendo desta maneira, altos níveis de K^+ e baixos níveis de Na^+ intracelular, e consequentemente, altas concentrações de Na^+ e baixas de K^+ extracelular (SKOU, 1990).

Este gradiente de íons é imprescindível para manutenção de alguns mecanismos biológicos essenciais, como potencial de membrana, volume manutenção dos níveis de H^+ (pH citoplasmático) e Ca^{2+} intracelulares (através dos trocadores Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, respectivamente), além do transporte transcelular de outros solutos a exemplo de células intestinais, renais e glândulas (BLANCO, MERCER, 1998). Em repouso a Na^+/K^+ ATPase é

responsável pelo consumo de 20-30% do ATP produzido pela célula (JORGENSEN, HÅKANSSON, KARLISH, 2003).

A Na^+/K^+ -ATPase é composta pelas subunidades α (112KDa), β (55KDa) e γ (6,5KDa) (Figura 2), as quais podem evidenciar-se de maneiras distintas de acordo com a conformação da bomba (BLANCO, MERCER, 1998; KAPLAN, 2002).

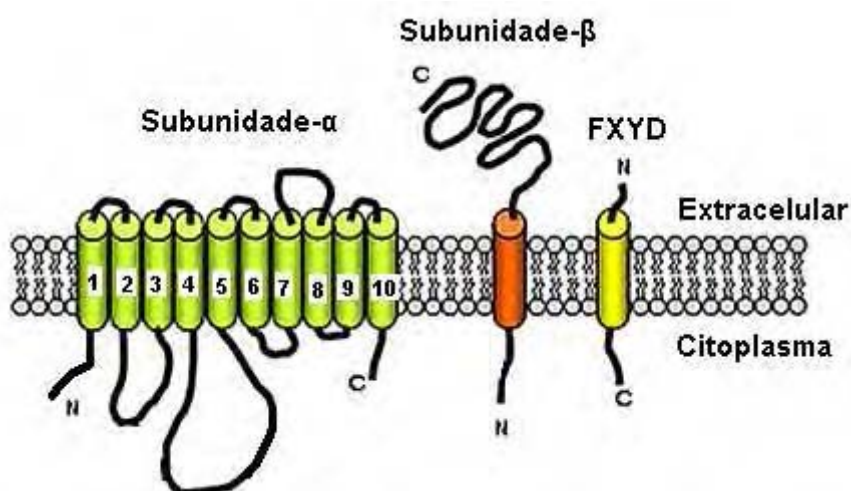


FIGURA 2: Esquema da estrutura da Na^+/K^+ ATPase. Estão representadas as subunidades α , β e γ (FXYP) da proteína. FONTE: modificada de RAJASEKARAN, RAJASEKARAN, 2009.

A unidade mínima funcional é composta por um heterodímero que contém as subunidades α e β (JORGENSEN, ANDERSEN, 1988), ligadas de modo não covalente. Estas subunidades podem ser co-expressas associada a outros pequenos reguladores de transporte de íons como os da família FXYP (KUSTER *et al.*, 2000; SWEADNER, RAELE, 2000). A proteína FXYP é expressa em alguns tecidos a exemplo do rim, cérebro e coração (THERIEN *et al.*, 1997; FESCHENKO *et al.*, 2003; SWEADNER *et al.*, 2003; SWEADNER, 2005).

FXYP foi proposta por Crambert e colaboradores (CRAMBERT, GEERING, 2003) e está associada a uma família de proteínas composta por sete membros (FXYP1 – FXYP7). Apresenta peso molecular variando de 7 a 17-KDa e é caracterizada por uma região conservada FXYP na porção N-terminal que possui dois resíduos de glicina internos e um resíduo de serina no final do domínio transmembrana. Foi inicialmente identificada no rim (FXYP2 ou subunidade γ) e apresenta um importante papel regulatório na função (Na^+/K^+) -ATPásica, uma vez que pode modular a afinidade ao Na^+ , K^+ e ATP (MERCER *et al.*, 1993; BEGUIN *et al.*, 1997; GEERING, 2008), além de desempenhar um papel crucial no ancoramento da enzima na membrana (CORNELIUS, MAHMMOUD, 2003) e na modulação da ligação da Ouabaína (FONTES *et al.*, 1999).

A subunidade α é uma proteína que possui 4 isoformas distintas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$). Essa proteína possui em torno de dez segmentos em alfa-hélice transmembrana e dois domínios extracelulares (sítios de ligação a ATP e Ouabaína). Na região intracelular estão localizados o sítio de fosforilação e associação a nucleotídeos (GLYNN, 1993; PRESSLEY, 1996, BLANCO, MERCER, 1998).

Cada uma das subunidades α , são expressas em diferentes proporções a depender do tecido. A isoforma $\alpha 1$ é ubíqua. A isoforma $\alpha 2$ é mais intensamente expressa em músculos esquelético, cardíaco, cérebro, adipócitos, músculo liso vascular e olhos, bem como em outros tecidos. A isoforma $\alpha 3$ é mais frequentemente encontrada em neurônios e células ovarianas, podendo ser localizada em algumas espécies também no coração e leucócitos, a exemplo de humanos (SHAMRAJ, MELVIN, LINGREL, 1991; STENGELIN, HOFFMAN, 1997). A isoforma $\alpha 4$ é a que apresenta menor homologia em relação a $\alpha 1$ (78%). A diferença estrutural reflete-se em sua especificidade. Essa subunidade é expressa apenas em espermatozóides em estágios específicos, a exemplo de quando é necessário que a célula tenha motilidade (SHAMRAJ, LINGREL, 1994; WOO, JAMES, LINGREL, 2000).

A subunidade β é uma glicoproteína que possui diferentes níveis de glicosilação a depender do tecido. Apresenta-se em uma única hélice transmembrana e um domínio extracelular. Parece estar relacionada com a oclusão de K^+ e modulação da afinidade da enzima pelos cátions. Além disso, funciona como uma “chaperona” molecular em ATPases do tipo “P”, estabilizando o polipeptídeo α e facilitando sua distribuição e inserção na membrana plasmática (McDONOUGH, GEERING, FARLEY, 1990; CHOW, FORTE, 1995; GEERING, 2001). Esta subunidade parece ter grande relação fisiológica na indução da polaridade celular e na formação de “tight junctions” e desmossomos oncogênica (GEERING, 2008).

As isoformas β também possuem distribuição tecido-específica. A isoforma $\beta 2$ é encontrada em músculos esqueléticos (LAVOIE *et al.*, 1997), glândula pineal (SHYJAN *et al.*, 1990) e tecidos nervosos (PENG *et al.*, 1997), enquanto que a $\beta 3$ está presente em testículo, retina, fígado e pulmões (MALIK *et al.*, 1996).

Durante sua atividade, a Na^+/K^+ -ATPase adquire mudanças conformacionais, o que é denominado de ciclo catalítico dessa enzima. O mecanismo de transporte da Na^+/K^+ -ATPase é desencadeado quando há a ligação de 3 íons Na^+ na subunidade α da proteína através de sítios de ligação de alta afinidade. É também nessa subunidade que há o sítio de ligação ao ATP. A referida proteína trata-se de uma bomba de cátions do tipo P. A designação tipo- P refere-se à característica peculiar que estas enzimas possuem, de fosforilar transitoriamente um resíduo de aspartato durante o ciclo catalítico. É através desse

processo de fosforilação e desfosforilação que ATPases do tipo P ligam, ocluem e transportam íons pela ligação cíclica de diferentes cátions, dependentes de transformações chamadas E1 e E2 (SACHS, MUNSON, 1991; REPKE, SCHON, 1992; SKOU, ESMANN, 1992).

Quando há a fosforilação da proteína (1) há uma modificação em sua conformação (2), que faz com que a mesma diminua a afinidade pelos íons Na^+ e isso faz com que os mesmos sejam liberados na face extracelular. Imediatamente há a ligação de 2 íons K^+ na mesma subunidade com alta afinidade (3) e, em seguida, a desfosforilação da enzima, o que faz com que haja uma diminuição da afinidade pelos íons K^+ e liberação dos íons no interior da célula (DEVLIN, 2007) (Figura 3).

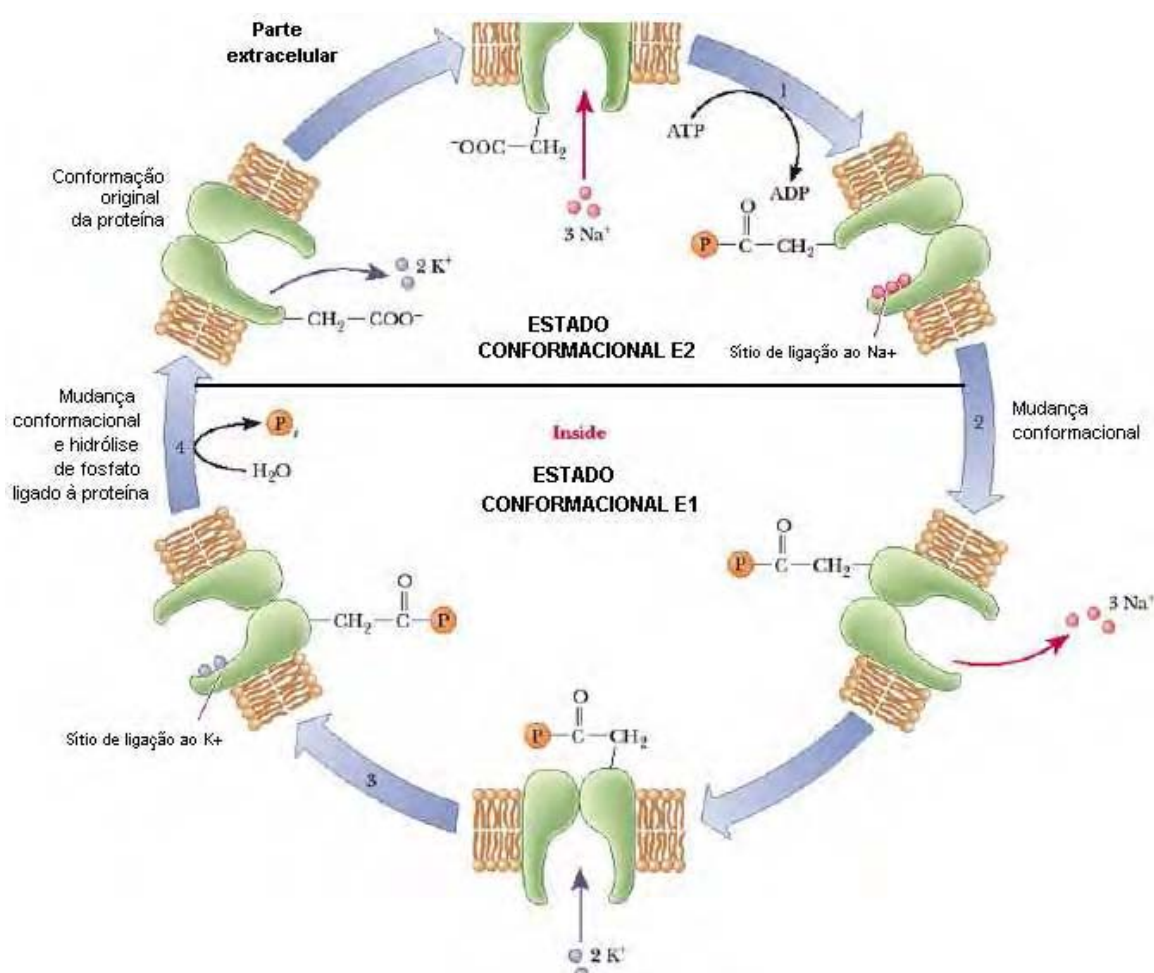


FIGURA 3: Ciclo catalítico da proteína transportadora Na^+/K^+ -ATPase. FONTE: adaptado de DEVLIN, 2007.

Alguns eventos relacionados à atividade da Na^+/K^+ -ATPase foram percebidos como não sendo exclusivamente resultado da modificação dos níveis iônicos na célula. Um exemplo esclarecedor para esse processo foi o estudo inicial sobre a regulação gênica causada pelo digitálico Ouabaína, na hipertrofia de miócitos cardíacos (PENG *et al.*, 1996;

HUANG, LI, XIE, 1997). Foi percebido que apenas a modificação nos níveis do Ca^{2+} intracelular não era suficiente, apesar de imprescindível, para promover a regulação gênica causada pela Ouabaína. Sugeriu-se então que existiam outras interações protéicas e enzimáticas envolvidas nesse processo (HAAS, ASKARI, 2000; LIU *et al.* 2000).

Nos últimos anos têm-se demonstrado que essas interações e regulações de diversas vias pela Na^+/K^+ -ATPase existem e envolvem a interação entre proteínas, sendo capazes de regular a proliferação e o crescimento celular (XIE, ASKARI, 2002, APERIA, 2007). Foi demonstrado que pequenas concentrações de Ouabaína são capazes de promover diferentes cascatas de sinalização, sem modificações nos níveis de eletrólitos intracelulares. Sugere-se então que a Ouabaína seja o ligante e a Na^+/K^+ -ATPase, e esse seu receptor propicie o desencadear de diversas cascatas celulares (SCHEINER-BOBIS, SCHONES, 2001).

Estudos demonstram que a Na^+/K^+ -ATPase interage com a membrana de células vizinhas e desencadeia cascatas de proteínas e segundos mensageiros, incluindo ativação da Src-quinase, ativação da Ras e p42/44 (mitógenos ativadores de quinases) e aumenta espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. As respostas desencadeadas também estão relacionadas à transcrição de fatores de ativação, em miócitos cardíacos, como AP-1 e NFkB (Figura 4) (XIE, ASKARI, 2002).

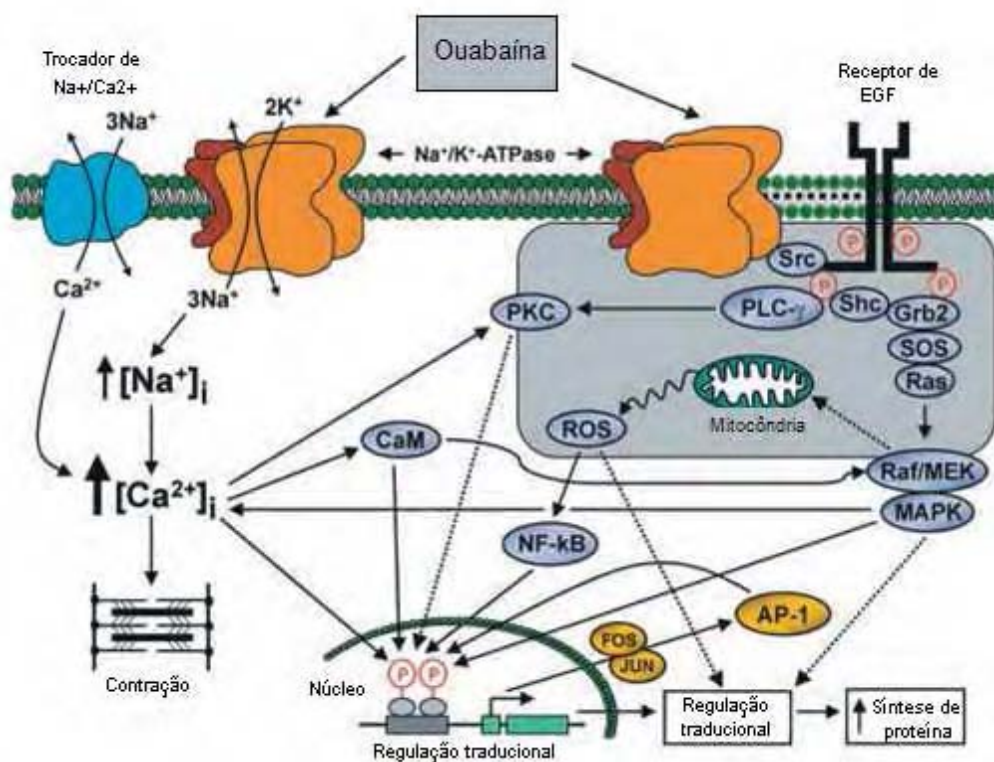


FIGURA 4: A transdução de sinal da Na^+/K^+ -ATPase, desencadeada pela sua inibição parcial pela Ouabaína, e suas conseqüências em miócitos cardíacos. FONTE: adaptado de XIE, ASKARI, 2002.

1.3. Atuação fisiopatológica da Ouabaína

Atualmente sabe-se que diversos eventos tanto fisiológicos quanto patológicos podem interferir nos níveis endógenos da Ouabaína (SCHONER, 2002). São encontrados níveis elevados de Ouabaína em pacientes hipertensos (SCHONER, 2000), bem como em diferentes modelos de ratos com hipertensão (HUANG, LEENEN, 1996).

Conhece-se também o envolvimento da Ouabaína no estresse agudo. Sabe-se que o exercício físico é capaz de aumentar os níveis de Ouabaína em ratos, cachorros e seres humanos alguns minutos após o início da atividade física (GOTO *et al*, 1995; BAUER *et al*, 2005). Este fenômeno parece ser regulado pela secreção de norepinefrina e de angiotensina, visto que o uso de β bloqueadores ou de inibidores da enzima conversora de angiotensina são capazes de inibir esse efeito (BAUER *et al*, 2005). Estímulos patológicos como hipóxia e isquemia também são capazes de aumentar a síntese de Ouabaína (de ANGELIS; HAUPERT, 1998). Esses dados sugerem que a Ouabaína poderia funcionar como um hormônio relacionado ao estresse.

Estudos revelam que a Ouabaína atua como neuromodulador central (SNC), estimulando a atividade neuronal simpática em ratos (de WARDENER, 2001). Adicionalmente, a Ouabaína, a nível central pode estimular ou inibir a apoptose, a depender da concentração utilizada. Isso é evidenciado através de estudos de regeneração da retina de “zebrafish”. Essas pesquisas demonstram que em concentrações micromolares, a Ouabaína induz destruição da bicamada lipídica e da membrana nuclear interna de células ganglionares, promovendo uma apoptose maciça dessas células, porém, não afeta células fotorreceptoras (FIMBEL *et al.*, 2007). De modo distinto, concentrações nanomolares (1-3nM) protegem as células ganglionares da apoptose (de REZENDE-CORREA *et al.*, 2005).

A Ouabaína também tem sido relacionada à distúrbios psíquicos, como o distúrbio bipolar. A injeção intracerebral da substância em ratos demonstra aumentar a expressão da isoforma da Na^+/K^+ ATPase, α -2, na ganglia basal e α -3, em neurônios do córtex pré-frontal (HAMID, 2009). Esses achados são compatíveis com achados pós- morte em indivíduos com distúrbio bipolar. De modo semelhante, o fenótipo maníaco é desencadeado em animais com injeção intracerebral da substância e sugere-se que este fenômeno esteja relacionado à fosforilação de Akt (HYUN-SOOK *et al.*, 2010).

O papel fisiológico da Ouabaína não é bem conhecido. Alguns grupos sugerem que essa substância poderia funcionar como hormônio natriurético (BLAUSTEIN, 1993; FERRANDI *et al*, 1997) e outros trabalhos a apontam como tendo um papel importante no crescimento, diferenciação e morte celular por apoptose (HUANG, LI, XIE, 1997; KOMETIANI *et al*, 1998; LICHTSTEIN *et al*, 2000; ISAEV *et al*, 2000). Um estudo recente mostra que células renais em desenvolvimento quando submetidas a determinadas privações sofrem má- formação, com futuros prejuízos à função renal. Esse efeito é revertido, em células embrionárias de ratos, através da exposição à Ouabaína, demonstrando o desenvolvimento normal dessas células mesmo em condições adversas (LI *et al.*, 2010).

Vários trabalhos evidenciaram que a Ouabaína é capaz de ativar diferentes vias de sinalização (Figura 5). Em miócitos cardíacos, a inibição parcial da Na^+/K^+ ATPase pela Ouabaína estimula a hipertrofia celular e regula a transcrição de diversos genes (LINGREL; KUNTZWEILER, 1994). Estes efeitos da Ouabaína envolvem a ativação de múltiplas vias, incluindo a ativação da cinase Src e a fosforilação em resíduos de tirosina do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), fenômeno esse que precede a ativação da cascata de sinalização que envolve RAS, RAF, MEK e ERK. Além disso, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) também está envolvida na sinalização desencadeada por essa substância (HAAS, ASKARI, XIE 2000). Nesse mesmo modelo foi descrito o aumento dos níveis do RNA mensageiro de c-jun e c-fos e do fator de transcrição AP-1 pela Ouabaína (PENG *et al*, 1996).

De modo distinto, doses não-tóxicas de Ouabaína aplicadas cronicamente promovem a morte por apoptose de células cardíacas de ratos que envolvem a via da CaMKII (SAPIA *et al.*, 2010). Sabe-se que as oscilações de Ca^{2+} da membrana plasmática sinalizam através da membrana e resultam na translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo e ativação da transcrição gênica (SCHEINER-BOBIS, SCHONER, 2001).

por outros autores em células Jurkat (ORLOV *et al.*, 1999), e em linfócitos do sangue periférico, sendo desencadeada pela forma hipotalâmica da substância (ANNER *et al.*, 1994). Estudos demonstram também que em linfócitos estimulados com o mitógeno PHA, a Ouabaína induz um aumento da expressão do proto-oncogen *c-myc*, levando parte dessa população à morte por apoptose e esse fenômeno não está relacionado com a expressão da molécula CD95/Fas (OLEJ *et al.*, 1998; ESTEVES *et al.*, 2005).

Sabe-se que a Ouabaína é capaz de induzir a expressão de CD69, uma molécula presente na maturação dos linfócitos T, em timócitos murinos, mediante o influxo de cálcio do meio extracelular (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2003). Pesquisas mostram também que baixas concentrações de Ouabaína são capazes de aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular (ECHEVARRIA-LIMA *et al.*, 2003). Nestas células este digitálico é capaz de inibir a proliferação desencadeada pelo mitógeno CoNA (SZAMEL *et al.*, 1981), sendo este efeito relacionado possivelmente a sua capacidade de reduzir a atividade da MAPK p38 e os níveis de NFATc1, culminando com a redução na expressão do receptor de IL-2, uma citocina importante para a proliferação linfocitária (RODRIGUES- MASCARENHAS *et al.*, 2008).

A inibição da Na^+/K^+ - ATPase através de concentrações elevadas de Ouabaína causa despolarização da membrana plasmática de linfócitos *in vitro* e potencializa a morte induzida por glicocorticóides (MANN *et al.*, 2001). Em estudos com camundongos tratados com Ouabaína, verificou-se uma exacerbação dos efeitos imunossupressores produzidos pela hidrocortisona, associado à morte dos timócitos por apoptose (RODRIGUES MASCARENHAS, DOS SANTOS, RUMJANEK, 2006). A redução dos níveis de K^+ intracelular promovida pela Ouabaína pode estar relacionada a apoptose, visto que o K^+ é capaz de inibir a atividade das caspases (BORTNER, HUGHES, CIDLOWSKI, 1997).

Percebe-se também a modificação nos padrões de secreção de diversas citocinas, a exemplo do aumento de produção de IL-1- β por macrófagos tratados com o glicosídeo (DORNAND *et al.*, 1984). Esta citocina está relacionada à indução da via das caspases, IL-1- α (MATSUMORI *et al.*, 2000) e TNF- α (FOEY, CRAWFORD, HALL, 1997; MATSUMORI A. *et al.*, 1997), moléculas que também podem se encontrar modificadas, independentes desta via. Em contrapartida, em outros modelos, a Ouabaína mostra-se capaz de inibir, *in vitro* e *in vivo*, a produção de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do TNF- α e da IL-6 (MATSUMORI *et al.*, 1997).

Sabe-se também que *in vitro* a Ouabaína modifica a maturação de células dendríticas, alterando o padrão de expressão de suas moléculas de membrana (CD83).

Essa modificação inclui moléculas essenciais à sua ativação, porém é independente de estímulos ativadores (NASCIMENTO, 2009).

Estudos reportam que a Ouabaína diminui a expressão do CD14 (mCD14) (VALENTE *et al.*, 2009), uma glicoproteína presente na linhagem mielóide responsável pela eliminação de patógenos bacterianos e fúngicos, que ativa receptor Toll-like. Essa molécula desencadeia a resposta inflamatória contra diversos patógenos, e também está envolvido no reconhecimento da fosfatidilserina em células apoptóticas e conseqüente promoção da fagocitose (GREGORY, 2000; LANDMANN, MULLER, ZIMMER, 2000; DOBROVOLSKAIA, VOGEL, 2002).

Estudos recentes mostram que a Ouabaína diminui o número total de células da medula óssea, sendo este um reflexo da diminuição das células (B220high-IgMhigh), marcação referentes aos linfócitos B maduros. Os resultados de diminuição de células B maduras repetem-se no baço e no sangue periférico. Sugere-se que esse efeito seja devido ao sinergismo da Ouabaína com glicocorticóides, impedindo a maturação de células B, já que *in vitro* os mesmos resultados não foram observados (de PAIVA *et al.*, 2011).

Apesar de todas as investigações sobre a atuação da Ouabaína no sistema imunológico e a demonstração de efeitos imunossupressores, pouco se sabe sobre o efeito da Ouabaína em processos inflamatórios e nociceptivos.

1.4. Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma resposta protetora, desencadeada por injúria tecidual que serve para destruir e diluir o agente lesivo, restaurando assim o tecido injuriado (MARIOTTI, 2004). A resposta inflamatória envolve a atuação de diversos mediadores e tipos celulares tanto da resposta imune inata quanto adaptativa.

A resposta imune inata está relacionada a componentes celulares a exemplo dos macrófagos, células dendríticas, NK, neutrófilos e alguns mediadores como proteínas do complemento e elementos da cascata de coagulação. A resposta imune adaptativa é uma resposta direcionada, e envolve a atuação de linfócitos e imunidade celular e humoral. A inflamação pode ser classificada duas maneiras: inflamação aguda e inflamação crônica, dependendo dos componentes celulares envolvidos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação aguda é um processo de curta duração (horas a meses), e envolve mediadores como prostanóides e NO, substâncias que provocam os sinais clássicos iniciais

do processo inflamatório (dor, calor, rubor e edema, acompanhados ou não da perda de função do tecido do órgão afetado) (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985). A inflamação aguda pode ser finalizada com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY *et al.*, 2004; ADEREM; SMITH, 2004).

Caso o processo inflamatório progrida, há o desenvolvimento de uma inflamação crônica, que pode durar de semanas a anos, e caracteriza-se por um infiltrado de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Durante a inflamação crônica, geralmente há a presença de um processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual e conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose (GILROY *et al.*, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A inflamação crônica é envolvida em diversas patologias a exemplo da artrite reumatóide, aterosclerose, entre outras.

1.4.1. Inflamação aguda

A palavra inflamação, deriva do grego “phlogosis” e do latim “flamma”, significa fogo, área em chamas. As primeiras descrições desse processo datam de aproximadamente 3000 a.C. em papiros egípcios. Celsius, um escritor romano descreve detalhadamente os sinais da inflamação aguda caracterizados pelo aumento no fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos (*rubor*), aumento da permeabilidade vascular (*tumor*), com conseqüente aumento na temperatura do local (*calor*). Adicionalmente era descrita a passagem de leucócitos para o sítio inflamatório, o que ocasionava, associado aos outros fatores, a dor (*dolor*). Virchow cita, posteriormente, o último sinal da inflamação como sendo a perda de função (*functio laesa*). John Hunter, um cirurgião escocês, relatou no ano de 1793, que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta sem especificidade, com objetivos salutarres ao hospedeiro (CASTARDO, 2007).

Atualmente existe uma caracterização microscópica e histológica da resposta inflamatória aguda. Sabe-se que é representada, por uma série de eventos que incluem dilatação de arteríolas, capilares e vênulas promovendo um aumento da permeabilidade e fluxo sanguíneo. Esse aumento da permeabilidade ocasiona a formação do edema, resultado do efluxo vascular de fluido rico em proteínas (plasma) a partir dos compartimentos intersticiais. Este fato deve-se a liberação de diversos fatores, como histamina, bradicinina, leucotrienos, substância P e PAF (ALI *et al.*, 1997; FRANGOIANNIS *et al.*, 2000; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre também a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento, a exemplo dos fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas (como a IL-8) e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o foco inflamatório (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; ADEREM; SMITH, 2004).

O endotélio ativado permite o extravasamento seletivo de células, a exemplo de neutrófilos e macrófagos. Essa seletividade é promovida pela ligação dessas células ao endotélio, através da expressão de selectinas e integrinas e receptores de quimiocinas, bem como da formação de espaços extravasculares (MEDZHITOV, 2008). Essas proteínas de adesão dão origem a um processo encadeado, necessário para migração de leucócitos para o sítio inflamado: marginação, adesão e diapedese. As células que inicialmente dirigem-se ao foco inflamatório são os neutrófilos, devido ao seu baixo peso molecular (Figura 6) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O reparo tecidual ocorre durante a inflamação quando há um recrutamento e proliferação de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, bem como a angiogênese (formação de novos vasos) revascularizando o tecido recém-formado (tecido de granulação) (RITTNER, BRACK, STEIN, 2008; XU *et al.*, 2010, REN, DUBNER, 2010).

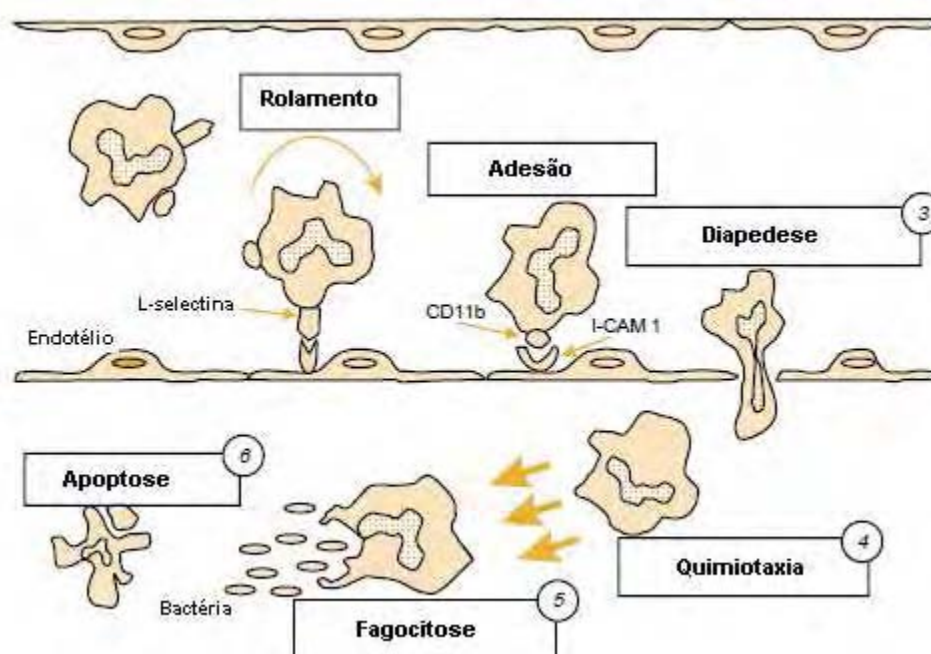


FIGURA 6: Mecanismos de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia de neutrófilos. As interações dessas células com o endotélio são mediadas por selectinas e seus ligantes que facilitam o rolamento. A interação com integrinas e moléculas de adesão intercelular (ICAM), facilitam a migração para o foco inflamatório. Essas células são levadas ao local exato através de moléculas

quimioatrativas a exemplo das quimiocinas e produtos bacterianos. FONTE: (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A resposta inflamatória representa um processo biológico e bioquímico complexo que envolve o sistema imunológico e inúmeras outras proteínas. A comunicação célula-a-célula e as moléculas de comunicação, a exemplo das citocinas, são extremamente importantes para o desencadeamento do processo inflamatório (RANKIN, 2004).

1.4.1.1. Componentes envolvidos na resposta inflamatória aguda

1.4.1.1.1. “Sinais de perigo” e receptores Toll like

A inflamação pode ser desencadeada via estímulos infecciosos, através dos padrões moleculares associados à patógenos (do inglês- PAMPs), porém a resposta inflamatória também pode ser desencadeada em condições estéreis. Nesse contexto, o desenvolvimento do processo inflamatório está relacionado a moléculas endógenas, chamadas de padrões moleculares associados a danos (do inglês – DAMPs).

Esse conjunto de padrões (DAMPs) inclui várias moléculas liberadas por células (ativadas ou necróticas) ou componentes da matriz extracelular, que têm sua expressão aumentada durante a injúria tecidual. Em pequenas quantidades, essas substâncias são essenciais na resposta imune e restauração da homeostase (JANEWAY JR & MEDZHITOV, 2002; GORDON, 2002; BIANCHI, 2007; BEUTLER, 2007).

Dentre as DAMPs destacam-se proteínas do choque térmico (HSP70, Gp96, HSP22, HSP72) (ASEA *et al.*, 2002; VABULAS, *et al.*, 2002; ROELOFS *et al.*, 2006; WHEELER *et al.* 2009); moléculas da matriz extracelular como bioglicano (SCHAEFER *et al.*, 2005), tenascina-C (MIDWOOD *et al.*, 2009), versicana (KIM *et al.*, 2009), fragmentos da MEC, como os oligossacarídeos de ácido hialurônico (TERMEER *et al.*, 2002) e sulfato de heparina (JOHNSON *et al.*, 2002). Outras moléculas também podem ser consideradas DAMPs, a exemplo de ácidos nucleicos próprios, como RNA mensageiro (KARIK’O *et al.*, 2004), RNA de fita simples (VOLLMER *et al.*, 2005); complexos de cromatina de IgG (LEADBETTER *et al.*, 2002), anticorpos anti-fosfolípidos (HURST *et al.*, 2009) dentre outras.

A resposta a esses fatores envolvem a produção e liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, genes de reparo e, em alguns tipos celulares, como as células dendríticas, promove a superexpressão de MHC e moléculas co-estimulatórias o que promove a

maturação dessas células e produção de citocinas imunoestimulatórias (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Dentre os receptores que respondem aos DAMPs, destacam-se os receptores Toll-like, os quais promovem o desencadeamento de diferentes cascatas de sinalização. Dentre essas vias, a melhor descrita é a via do NFkB, a qual culmina com a expressão de diversos genes, envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória (GHOSH *et al.*, 1998; ADEREM & ULEVITCH, 2000; AKIRA *et al.*, 2001; JANEWAY JR & MEDZHITOV, 2002).

1.4.1.1.2. Mediadores envolvidos na resposta inflamatória

Vários são os mediadores envolvidos no início e manutenção do processo inflamatório. Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos ou células presentes no local. Alguns mediadores, como a histamina e a serotonina, podem ser estocados em granulócitos, mastócitos, basófilos e plaquetas. Outros mediadores podem ser circulantes no plasma como precursores inativos ou ser produzidos em resposta a algum sinal inflamatório. Podemos dividir esses mediadores, classificando-os em grupos distintos, a depender de algumas propriedades bioquímicas peculiares a cada um (KUMAR, COTRAN, ROBBINS, 2003).

1.4.1.1.2.1. Aminas vasoativas

São produzidas quando há degranulação de mastócitos ou plaquetas. Causam efeitos complexos na vasculatura, como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação ou vasoconstrição a depender do contexto. Estão envolvidas na formação de edema e prurido, bem como em processos nociceptivos causados por condições inflamatórias (KAY, 2001). Dentre essas aminas vasoativas, destacam-se a serotonina e a histamina.

A serotonina é liberada majoritariamente por plaquetas, mastócitos e células enterocromafins (GERSHON, TACK, 2007), e em menor proporção pelas células neuro-endoteliais do pulmão e no núcleo da rafe, no cérebro (LINDER *et al.*, 2007). Essa substância contribui para a iniciação da inflamação através da ativação direta de células endoteliais de capilares locais, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células T efectoras para mediar a inflamação cutânea (FANBURG, LEE, 1997; CAZZOLA, MATERA, 2000; BARNES, 2001). Promove também o aumento da expressão de TNF- α e

síntese e indução de fatores quimiotáticos para neutrófilos (STERNEBERG, TRIAL, PARKER, 1986; ARZT *et al*, 1991).

A serotonina está envolvida na formação do edema provavelmente por uma via Ca^{+2} -dependente no músculo liso. É envolvida também na nocicepção periférica (KAYSER *et al.*, 2007), porém o agonismo dos seus receptores demonstraram antinocicepção a nível central (SASAKI *et al.*, 2003).

1.4.1.1.2.1.1. Histamina

A histamina foi descoberta em 1910, por Dale e Laidlaw, como estimulante uterino, do músculo liso e vasodepressor. Além disso, foi demonstrado que a histamina estava envolvida na fisiopatologia da anafilaxia (DALE, LAIDLAW, 1911). Atualmente, sabe-se que a histamina é produzida por diversas células incluindo neurônios do sistema nervoso central, células semelhantes à enterocromafins, células hematopoiéticas, macrófagos, linfócitos, e especialmente pelos mastócitos e basófilos (JUTEL, BLASER, AKDIS, 2005)

A histamina é uma proteína de baixo peso molecular, sintetizada através da descarboxilação da L-histidina, pela histidina descarboxilase (MOYA-GARCIA, MEDINA, SANCHEZ-JIMENEZ, 2005) e está envolvida em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Esses eventos envolvem proliferação e diferenciação celular, hematopoese, desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, cognição, memória, ciclo circadiano, energia e homeostase endócrina (HIGUCHI, 2000; YOKOVAMA, 2001; JUTEL *et al*, 2002; MACGLASHAN, 2003; HASS, PANULA, 2003; DY, SCHENEIDER, 2004).

Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores: HR1, HR2, HR3 e HR4 (JUTEL, BBLASER, AKDIS, 2005). Todos esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. A ativação do HR1 estimula as vias sinalizadoras do fosfolípideo inositol, culminando na formação do IP_3 e do DAG, levando ao aumento do cálcio intracelular. Além disso, o HR1, quando estimulado, pode ativar outras vias de sinalização intracelular, tais como a via da fosfolipase D e a da fosfolipase A. Demonstrou-se também que o estímulo do HR1 pode levar a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B, estando ambos envolvidos nas doenças alérgicas (Figura 7) (HILL *et al*, 1997). O receptor H2 liga-se a proteína Gs ativando a via da adenilato ciclase, enquanto que o H3 e H4 acoplam a proteínas Gi e inibem essa via (Figura 8) (CRIADO *et al*, 2010).

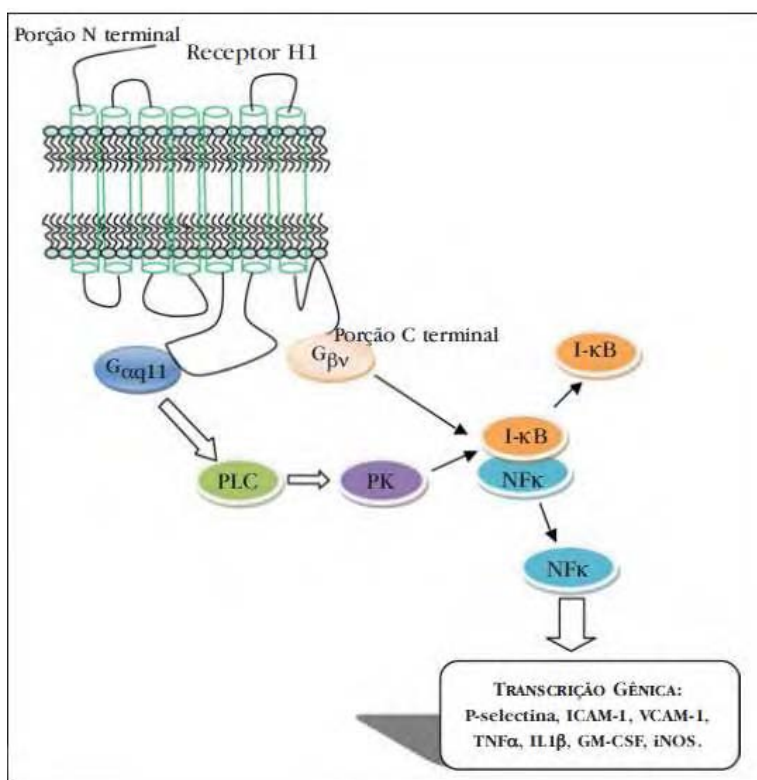


FIGURA 7: Receptores H1 e sua ação na transcrição gênica de mediadores inflamatórios. Quando a histamina se liga aos receptores H1 (HR1) ocorre um estímulo e mudança conformacional desses receptores que determina a ativação de duas vias: (i) a da fosfolipase C (PLC), ativando a proteína quinase C (PKC), que impede a separação do dímero formado pelo I-κB e pelo NFκB, o que resulta na liberação desse último, que adentra o núcleo celular e atua estimulando a ativação dos genes codificadores dos mediadores inflamatórios. Fonte: CRIADO *et al.* 2010.

Sabe-se que a histamina associada a outros mediadores é uma das principais responsáveis pelo extravasamento de líquido para o espaço intersticial e conseqüente formação do edema (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004). Um dos motivos desse extravasamento de líquido é a fosforilação da tirosina da VE-caderina e catetina, promovendo uma dissociação da VE-caderina do citoesqueleto (ANDRIOPOULOU, P. *et al.* 1999).

A expressão dos receptores H1 e H2 no endotélio promove ao aumento de moléculas de adesão intracelular e vascular como a ICAM-1 e a V-CAM1, além da P-selectina, o que facilita a migração dos leucócitos para o sítio (LO, FAN, 1987; KUBES, KANWAR, 1994; YAMAKI *et al.*, 1998). Adicionalmente a histamina atua no amadurecimento de células dendríticas, aumentando sua capacidade de apresentação de antígenos e modifica a via do NFκB (SZEBERENYI *et al.*, 2001; BAKKER *et al.* 2001). Todos esses mecanismos fazem com que a histamina promova seu efeito pró-inflamatório.

QUADRO 1: Diferentes receptores da histamina

Receptor de histamina	Expressão em células/tecidos	Sinais intracelulares de ativação	Proteínas G
HR1	Células neurais, músculo liso vascular e vias aéreas, endotélio, hepatócitos, células epiteliais, neutrófilos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, LT e LB.	Principal sinalizador: aumento do Ca^{2+} . Outros: PhLC, PhLD, GMPC, PhLA, NFkB	Gq/11
HR2	Células neurais, músculo liso vascular e vias aéreas, endotélio, hepatócitos, condrócitos, células epiteliais, neutrófilos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, LT e LB.	Principal sinalizador: aumento do AMPc. Outros: adenilciclase, c-Fos, c-Jun, PKC, p70S6K.	G $\pm$ S
HR3	Neurônios histaminérgicos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, baixa expressão nos tecidos periféricos. Inibe a liberação e síntese da histamina.	Principal sinalizador: inibição do AMPc. Outros: aumento do Ca^{2+} , MAP kinase.	Gi/o
HR4	Alta expressão na medula óssea e células hematopoiéticas periféricas, eos., neutrófilos, dendrócitos, LT, basófilos, mastócitos; baixa expressão em tecidos periféricos, hepatócitos, baço, timo, pulmões, intestino e coração. Estimula quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos.	Aumento Ca^{2+} , inibição do AMPc	Gi/o

Eos., eosinófilo; LB, linfócito B; LT, linfócito T; PKC, proteína quinase C; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; PhLC, fosfolipase C; PhLD, fosfolipase D; PhLA, fosfolipase A; NFkB, fator nuclear de transcrição kappa
 Fonte adaptada: Jutel M, et al.¹

FIGURA 8: Tabela dos receptores de histamina, expressão tecidual, respectivas vias de sinalização e tipo de proteína G acoplada. Fonte: CRIADO *et al.* 2010.

1.4.1.1.2.2. Eicosanóides

Os eicosanóides são mediadores lipídicos formados por uma cadeia de 20 carbonos (do grego *eikosi* =vinte). São moléculas biologicamente ativas, em condições fisiológicas e patológicas, pois sua interação com receptores ocasiona a ativação de vias de transdução de sinal específicas, que conseqüentemente conduzem a respostas celulares. Estas respostas são inerentes ao processo inflamatório e correspondem a sinais e sintomas como dor, febre, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia de leucócitos, especialmente neutrófilos (MILLER, 2006).

Essas moléculas são derivadas de fosfolipídeos presentes na membrana interna da célula. São formados a partir da via do ácido aracdônico, logo após a ativação celular através dos íons Ca^{2+} . Nesse contexto, a fosfolipase A2 gera ácido aracdônico e ácido lisofosfatídico. Existem duas vias essenciais para a produção dos eicosanóides: a via da ciclooxygenase (que origina as prostaglandinas) e a via da lipoxigenase (que origina os leucotrienos) (MILLER, 2006).

Na via da ciclooxygenase, o ácido aracdônico é metabolizado para formar os eicosanóides, através da enzima ciclooxygenase (COX), que pode ser a forma constitutiva (COX1) ou a forma indutiva (COX2) ou a COX-3, uma isoforma específica, presente em tecidos como cérebro e coração (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; MILLER, 2006).

Estudos demonstram que os sítios ativos dessas enzimas diferem estruturalmente, devido a algumas peculiaridades genéticas e estruturais (MORITA *et al.*, 1995; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Fisiologicamente, a COX-1 é expressa constitutivamente em altos níveis por células e tecidos a exemplo de células endoteliais, monócitos, plaquetas, túbulos coletores renais e vesículas seminais e atua de forma ubíqua (SMITH, DeWITT, 1996) possuindo papel regulador de diversos aspectos fisiológicos a exemplo da citoproteção, hemostasia primária gástrica, homeostase vascular e hemodinâmica renal. Existem controvérsias acerca da atuação da COX-1 no processo inflamatório, visto que estudos demonstram que os níveis de RNA mensageiro (mRNA) em tecidos inflamados e normais não se alteram (SMITH, DeWITT, GARAVITO, 2000), enquanto outros modelos evidenciam sua necessidade no desencadeamento e manutenção do processo inflamatório (GOULET *et al.*, 2004).

A COX-2 é a isoforma que geralmente é induzida. A região promotora de seu gene é responsiva a diversos fatores de transcrição ativados por fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , e LPS), o que explica sua indução pelo processo inflamatório (HEMPEL, MONICK, HUNNINGHAKE, 1994; GENG *et al.* 1995; SATO *et al.*, 1996; BLAIN *et al.*, 2000). Apesar disso, a COX-2 é expressa de modo basal em alguns tecidos, a exemplo do cérebro e da próstata e este fenômeno parece estar envolvido em funções específicas da reprodução, fisiologia renal e reabsorção óssea (De WITT, KRAIG, 1995; LIM *et al.*, 1997; BREDER, PILBEAM *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1999). A isoforma COX-3 parece estar mais relacionada ao desencadeamento de dor e febre, do que à própria promoção da inflamação (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Essas ciclooxygenases (COX-1; COX-2 e COX-3), formam os precursores PGG₂ e PGH₂. Prostaglandinas sintases ou isomerases convertem PGH₂ em prostaglandinas metabolicamente ativas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂ [prostaciclina]) e TXA₂, chamados coletivamente de prostanóides. Esses prostanóides exercem funções majoritariamente na via semelhante à rodopsina, atuando através de receptores acoplados a proteínas- G que diferem em seletividade, distribuição tecidual e vias de transdução de sinais. As substâncias geradas são prostaglandinas e tromboxanos. Essas prostaglandinas, a exemplo da PGE₂ e PGI₂, provocam vasodilatação e hiperalgesia, bem como agem como potentes indutores da febre. Se a via for através da lipoxigenase, há a geração de leucotrienos e lipoxinas. As lipoxinas (resolvinas e protectinas) inibem a inflamação e promovem o feedback negativo para sua resolução (MEDZHITOV, 2008)(Figura 9).

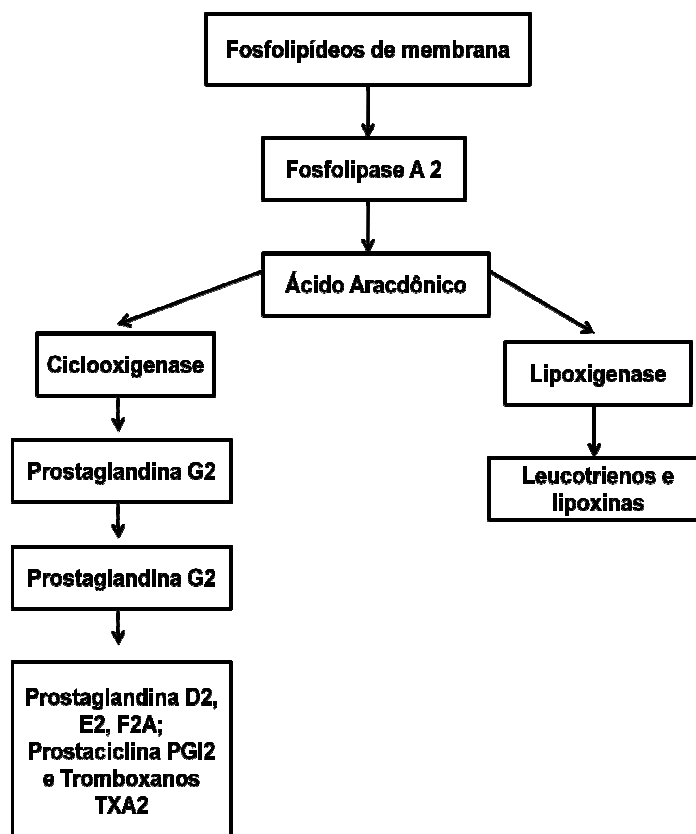


FIGURA 9: Esquema representativo do metabolismo do ácido aracdônico pela via da ciclooxygenase e lipoxigenase.

1.4.1.1.2.2.1. Prostaglandinas

Prostaglandinas são pequenas moléculas lipídicas que regulam numerosos processos do corpo incluindo a função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e modulação da respostas imune. São produzidas através da via do ácido aracdônico pelas enzimas ciclooxygenases (Figura 10) (PHIPPS *et al* 1991; GOETZL *et al.*, 1995). Todas as células, com exceção das hemácias têm capacidade de produzi-las (MILLER, 2006).

Prostaglandina sintases, são enzimas celulares específicas que convertem o produto da COX, o PGH2 em uma série de outras prostaglandinas (PGI2, PGF2, PGD2 e PGE2). Atualmente sabe-se que prostagladina sintases são induzidas por estímulos inflamatórios (FILION *et al.*, 2001). Quando há a produção das prostaglandinas, pelas prostagladinas sintase, essas são liberadas e rapidamente atuam em células vizinhas através da ligação a receptores específicos de alta afinidade na membrana plasmática (NARUMIYA, 1994).

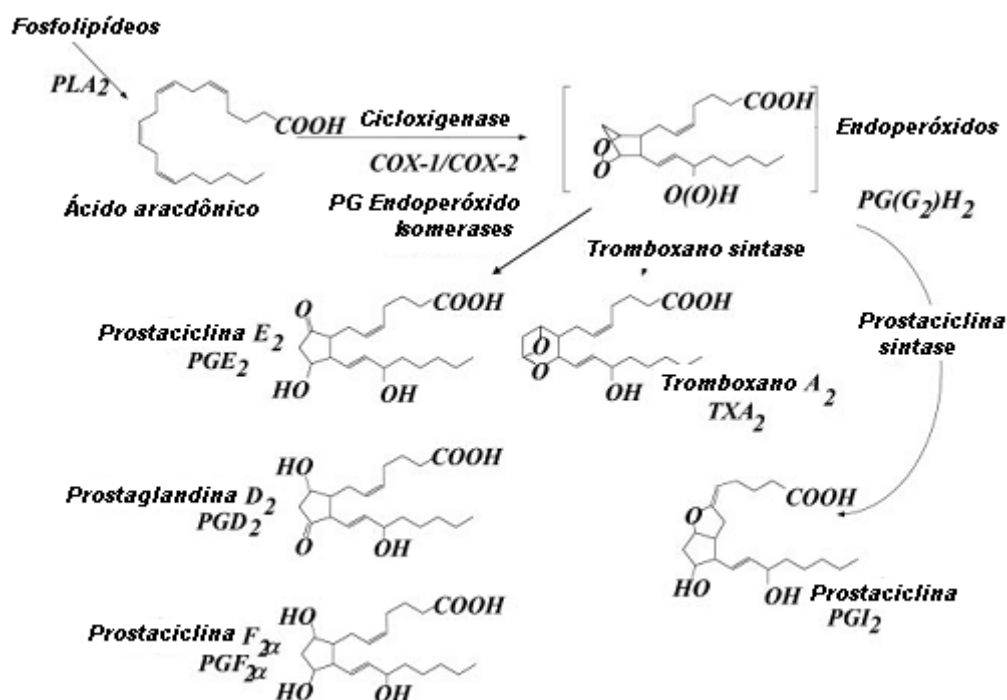


FIGURA 10: Produção das prostaglandinas através da via da cicloxigenase. FONTE: modificado de FOLCO, MURPHY, 2006.

As prostaglandinas ligam a receptores acoplados a proteínas G na superfície celular. Vários tipos desses receptores foram descritos, a exemplo dos DP, EP, FP, IP e TP (COLEMAN, SMITH, NARUMIYA, 1994; NARUMIYA, SUGIMOTO, USHIKUBI, 1999). PGE₂ é uma importante prostaglandina relacionada à inflamação e à nocicepção. A PGE₂ liga-se a receptores EP e, em altas concentrações, liga-se também a receptores IP. Essa prostaglandina é produzida por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos e alguns tipos de células cancerosas, exercendo ação em um ou em vários dos seus 4 subtipos de receptores EP (EP1, EP2, EP3 e EP4) (Figura 11). Todos esses receptores são do tipo rodopsina, com sete domínios transmembrana e acoplados a proteínas G, produzindo diferentes segundos mensageiros (BREYER *et al.* 2001). O subtipo EP3 é diversificado tanto em camundongos (α, β, γ) quanto em humanos (sete subtipos).

A expressão desses receptores está intimamente relacionada a agentes inflamatórios e a própria PGE2 pode afetar essa expressão (NARUMIYA, 1994; BREYER. *et al.*, 2001; WEINREB *et al.*, 2001). Esses receptores modulam a transcrição de diversos fatores, incluindo genes que codificam a iNOS (BOIE *et al.*, 1994). Adicionalmente tanto os receptores EP quanto os IP são importantes mediadores da dor inflamatória (BLEY *et al.*, 1998). Quando ligada a esses receptores, a PGE2 aumenta a liberação de diversos fatores como substância P e calcitonina, na inflamação neurogênica. Juntos, a PGE2 e esses mediadores atuam

sinergicamente com a bradicinina e para induzir hiperálgia (DRAY, 1995; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001; RICHARDSON, VASKO, 2002).

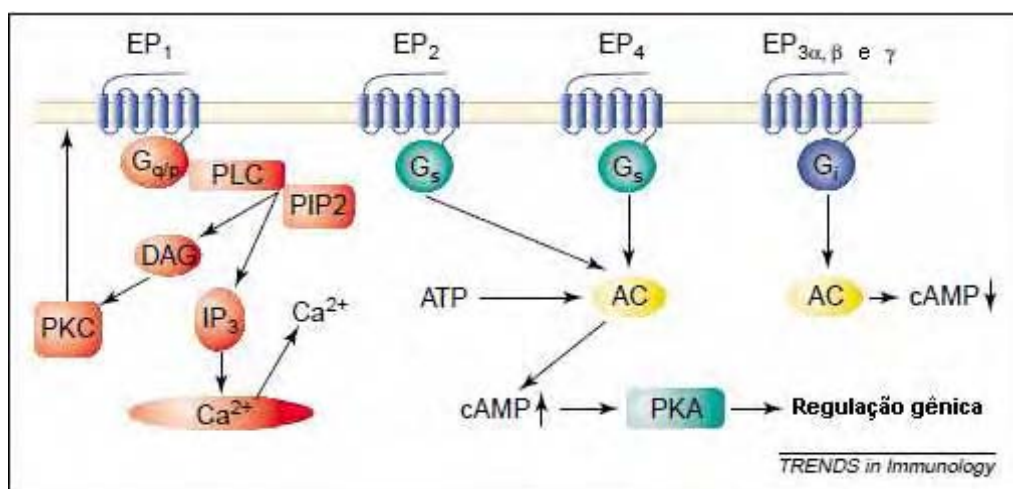


FIGURA 11: Receptores de PGE₂ e suas vias de sinalização. FONTE: modificado de HARRIS *et al.*, 2002.

1.4.1.1.2.3. Cininas

Cininas são substâncias extremamente importantes no desencadeamento da inflamação. Exercem efeitos na liberação de prostanóides, citocinas e radicais livres, por uma variedade de células. Adicionalmente as cininas são hábeis em degranular mastócitos causando a liberação de vários mediadores inflamatórios, especialmente a histamina que causam aumento da permeabilidade vascular (HALL, GEPPETTI, 1995).

As cininas também atuam estimulando neurônios simpáticos pós-ganglionares e atuam como substâncias algogênicas através da estimulação direta de nociceptores. As cininas agem sinergizando com outras substâncias a exemplo das prostaglandinas, serotonina e substância P (RANG, BEVAN, DRAY, 1994).

A produção das cininas pode ocorrer tanto no sangue (bradicinina) como nos tecidos (kalidina). Ambos agem através dos receptores B1 e B2. Tanto a bradicinina quanto a kalidina são bastante hábeis estimuladores do receptor B2 (STERANKA *et al.*, 1988; DRAY, PERKINS, 1993; HALL, 1992; PERKINS, CAMPBELL, DRAY, 1993; MENKE *et al.*, 1994).

1.4.1.1.2.3.1. Bradicinina

Bradicinina é a substância endógena importante na produção da dor (DRAY, PERKINS, 1993; MIZUMURA *et al.* 2009). É um peptídeo de 9 aminoácidos, formado através da clivagem de um precursor de 110 kDa denominado cininogênio por uma caliceína serina protease. A caliceína é formada através da pré-caliceína, sendo esse fator acelerado pelo Fator XII (fator de Hageman) produzido em tecidos danificados (Figura 13). Quando formada, a bradicinina fica retida nos tecidos e atua como mediador local na resposta inflamatória e em processos nociceptivos (MOREAU *et al.*, 2005). Sabe-se que a bradicinina provoca seus efeitos nociceptivos principalmente através dos receptores B2.



FIGURA 12: Via de produção da bradicinina. FONTE: modificado de BROWN; PASSMORE, 2010.

Esses receptores estão presentes em neurônios sensitivos e são acoplados à proteínas G, estimulando a via da fosfolipase C e gerando segundos mensageiros, a exemplos do IP₃ e do DAG. O IP₃ estimula a abertura de canais intracelulares para liberação de Ca²⁺, enquanto o DAG fosforila a proteína quinase C (PKC), que fosforila outros receptores de membrana e canais de íons. Sabe-se que a via da PKC é essencial para desencadear a excitação de fibras aferentes induzida por bradicinina e o aumento da permeabilidade da membrana a íons a exemplo do Na⁺. Essa despolarização causa o influxo de cálcio promovendo a liberação de outras substâncias da via do ácido aracdônico e substância P (THAYER *et al.*, 1988; RANG, BEVAN, DRAY, 1994).

1.4.1.1.2.4. Citocinas pró-inflamatórias

Citocinas são pequenas proteínas com peso molecular que variam entre 8 e 40 dáltons, não relacionadas estruturalmente, mas fisiologicamente estão envolvidas nas repostas à infecções e injúria tecidual. Inicialmente essa classe de proteínas foi denominada linfocinas e/ou monocinas, dependendo de sua célula produtora (DINARELO, 2000).

As citocinas são compostas por duas classes principais: as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ , IL-1, IL-6, entre outras) e as citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL10 e IL-13). Esse conceito é baseado na síntese de pequenas moléculas mediadoras que regulam positivamente a inflamação, a exemplo da fosfolipase A2, cicloxigenase (COX-2) e iNOs. A indução desses genes promove a síntese de várias enzimas inflamatórias, a exemplo do PAF, LTs, prostanóides e NO. As ditas citocinas anti-inflamatórias, são aquelas hábeis em suprimir genes de citocinas pró-inflamatórias. Alguns exemplos de citocinas anti-inflamatórias são a IL-4, IL10 e IL-13 (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

As citocinas pró-inflamatórias são produzidas por diversos tipos celulares, principalmente por macrófagos e mastócitos e possuem efeito pleiotrópico e redundante. Essas citocinas têm importante atuação na inflamação, incluindo ativação do endotélio e recrutamento de leucócitos na fase aguda da inflamação. Na via imunológica essas proteínas estão associadas com proliferação diferenciação e modificação na expressão gênica, bem como são essenciais para a síntese de proteínas da matriz e crescimento celular para o reparo tecidual (LMAUVIEL, 1993; MEDZHITOV, 2008). O envolvimento dessas citocinas está relacionado à resposta imune precoce a infecção e injúria tecidual através do recrutamento de leucócitos e ativação das mesmas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias destacamos: o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que atua como fator ativador de leucócitos e fator de crescimento (DINARELLO, 2009); o Interferon- γ (IFN- γ) que atua tanto na resposta celular (quimiotaxia de macrófagos) quanto humoral (troca do isotipo para IgG) (VARMA, 2002) e induz a síntese de TNF; a Interleucina-1 (IL-1) que pertence a uma família de interleucinas relacionadas a modificações nos linfócitos, produção de outras citocinas pró-inflamatórias e atuante na resposta humoral. Um importante papel da IL-1 é induzir a expressão de genes da COX-2; fosfolipase A2; iNOS bem como outras citocinas pró- inflamatórias a exemplo da Interleucina-6 (IL-6), essencial para o desencadeamento do processo inflamatório agudo (ANTONI *et al.*, 1986; NAKAE *et al.*, 2001).

Essas citocinas agem sinergicamente e com redundância. Temos como exemplo a capacidade da IL-1 e IL-6 induzirem a síntese de prostanóides, bem como a capacidade do TNF- α e IL-1, produzir a febre, estimular a produção de citocinas de fase aguda no fígado e causar lesão endotelial através de ativação celular (Figura 13) (ANTONI *et al.*, 1986; NAKAE *et al.*, 2001; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

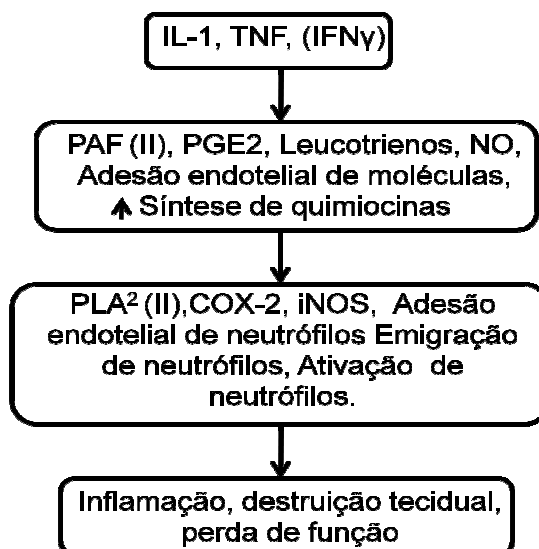


FIGURA 13: A cascata inflamatória desencadeada por IL-1 e TNF. FONTE: modificado de DINARELLO, 2009.

1.4.1.1.2.5. Citocinas quimiotáticas ou quimiocinas

Quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular (7–9 kd) e podem ser divididas em quatro subfamílias (C, CC, CXC, CX3C), baseada em sua estrutura primária (WANG *et al.*, 1998). Os receptores de quimiocinas são acoplados a proteína G e possuem estrutura similar, porém sua funcionalidade é diversa. Eles desenvolvem ligantes e especificidade de leucócitos para então determinar as características do infiltrado inflamatório.

Injúria ou invasão tecidual é caracterizada pelo aumento da produção de quimiocinas no local, causando um recrutamento seletivo de leucócitos para o sítio (D'AMBROSIO, PANINA-BORDIGNON, SINIGAGLIA, 2003). Essas citocinas quimiotáticas estão envolvidas em processos de maturação de linfócitos, angiogênese, crescimento tumoral (MILLER, COHEN, MATTHAY, 1996; BAGGIOLINI, DEWALD, MOSER, 1997) e em diversas patologias que envolvem inflamação aguda (MATSUMOTO *et al.*, 1997;) e infecções por vírus e protozoários (HADLEY, PEIPER, 1997).

1.4.1.1.2.6. Outros mediadores

Existem ainda outras classes e mediadores como o sistema complemento, o óxido nítrico, as enzimas proteolíticas e os peptídeos vasoativos.

O sistema complemento representa um conjunto de proteínas ativadas por microorganismos ou injúria tecidual que servem para promover a inflamação e destruir o microorganismo invasor (CLEMENZA *et al.*, 2003). Essa cascata pode ser ativada através da via clássica (dependente de anticorpos IgM e IgG), da via alternativa (união de suas proteínas diretamente na superfície do microorganismo) e através via da ativação de lectinas (ligação lectina ligadora de manose com as glicoproteínas e glicolipídeos do microorganismo invasor).

Em todas essas vias, o C3 é clivado em C3a e C3b. C3a é um quimioatrativo de neutrófilos, enquanto o C3b serve para ligar na superfície dos microorganismos e facilitar seu reconhecimento por fagócitos (FISHELSON, 1991). Adicionalmente o C3b cliva o C5 em C5a e C5b, que além de serem quimioatrativos para neutrófilos alteram a permeabilidade vascular no sítio inflamatório (PANGBURN, RAWAL, 2002). C5b facilita a formação do complexo de ataque (C6, C7, C8 e C9) que ocasiona rompimento da membrana celular do microorganismo e consequente a morte do mesmo (COLE, MORGAN, 2003).

O óxido nítrico (NO) trata-se de um gás solúvel, produzido por diversos tipos celulares (PALMER, ASHTON, MONCADA, 1988; WIESINGER, 2001). Esse gás é sintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina através de três isoformas da sintase de óxido nítrico (NOS): a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzida (iNOS). Fisiologicamente sabe-se que o NO tem importante papel no endotélio vascular atuando como relaxante de músculo liso (DRAY, 1995) por uma via dependente do GMPcíclico (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991).

Durante a inflamação ou injúria do nervo ocorre uma indução de iNOS por uma via cálcio-independente (VERGE *et al.*, 1992). Sabe-se que a indução de iNOS tem um envolvimento na síntese de prostanóides (SALVEMINI *et al.*, 1993) e que o NO modifica a atividade sensorial de neurônio a substâncias inflamatórias a exemplo da bradicinina (DRAY, 1992; RUEFF *et al.*, 1994).

As enzimas proteolíticas possuem diversas ações no processo inflamatório, desde a degradação da matriz extracelular, defesa do hospedeiro, remodelamento tecidual e migração de leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

Os peptídeos vasoativos podem ser estocados de forma ativa (por exemplo, substância P) ou ser ativados de modo proteolítico, por precursores inativos (cininas, fibrinopeptídeo A e B e produtos da degradação da fibrina). Esses fatores causam vasodilação e aumento da permeabilidade vascular, podendo ser inclusive pela indução da degranulação dos mastócitos e liberação de histamina. Esses fatores são essenciais também para indução da dor em tecidos lesados (MEDZHITOV, 2008).

1.4.1.1.3. Formação do edema inflamatório

O endotélio é uma barreira que mantém a diferença de ambiente entre o interior e o exterior do vaso, através da regulação do extravasamento de solutos, macromoléculas e células entre os dois ambientes. Mas, essa barreira é suscetível às modificações ocasionadas pelos estímulos tanto fisiológicos quanto patológicos (van HINSBERGH, AMERONGEN, 2002; SURAPISITCHAT *et al.*, 2007).

Em situações de inflamação, essa barreira torna-se mais permeável para prover o acesso de leucócitos e isso é acompanhado do extravasamento de fluidos para o espaço intersticial (BOGATCHEVA, VERIN, 2009). Sabe-se que o endotélio torna-se mais permeável, graças à formação de espaços muito pequenos entre as células no local da injúria (Figura 14) (van HINSBERGH, AMERONGEN, 2002).

Estudos demonstram que a descontinuidade da integridade da camada simplificada das células endoteliais ocorre em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios e produtos de neutrófilos ativados, resultando na formação de pequenas aberturas (BOUEIZ, HASSOUN, 2009). Alguns exemplos de mediadores que interferem na permeabilidade vascular são: bradicinina, histamina, serotonina e citocinas (MICHEL, CURRY, 1999).

Acredita-se que a célula seja mantida em seu formato normal por atuação de forças semelhantes a forças centrípetas e centrífugas. Sugere-se que a “força centrípeta”, dependa do resultado da contração da actina-miosina. A “força centrífuga” está relacionada a vários elementos do citoesqueleto. Tanto a “via centrípeta” quanto a “centrífuga” podem ser reguladas por diversas vias de sinalização (LEE, GOTLIEB, 2003; MEHTA; MALIK, 2006; JACOBSON; GARCIA, 2007).

Uma das vias envolvidas nesse processo é a fosforilação da miosina quinase de cadeia leve (MLC quinase), regulada pela cálcio-calmodulina (BOGATCHEVA; VERIN, 2009). Sabe-se que essa via é dependente do aumento do cálcio no citosol e que esse segundo mensageiro é envolvido no aumento da permeabilidade vascular de alguns mediadores inflamatórios por ativar diversas vias bioquímicas (TIRUPPATHI *et al.*, 2003).

Apesar de o aumento da permeabilidade vascular ser essencial para a o extravasamento de leucócitos e proteínas, a pressão hidrostática aumentada nos capilares é um fator imprescindível para a formação e manutenção do edema (BOGATCHEVA, VERIN, 2009.).

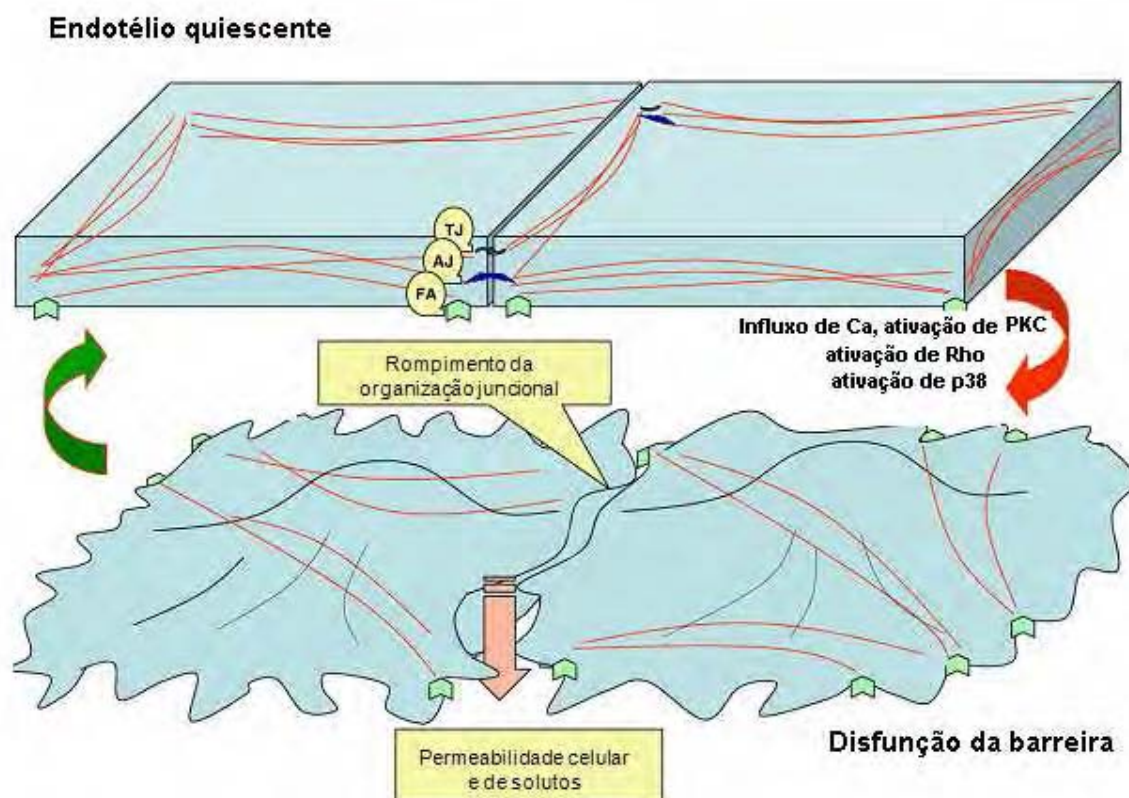


FIGURA 14: Representação esquemática do rearranjo do citoesqueleto celular, promovendo o aumento da permeabilidade vascular (TJ: junção estreita; AJ: junção aderente; FA: adesão focal)
 FONTE: Adaptado de BOGATCHEVA & VERIN, 2009.

1.5. Dor e nocicepção

O conceito de dor envolve tanto aspectos físicos, quanto cognitivos e emocionais, sendo necessário além do estímulo nódico o processamento do cérebro para a definição da dor (JULIUS; BASBAUM, 2001). Deste modo a “International Association for the Study of Pain” - IASP, conceituou a dor como “uma experiência sensorial e emocional, em geral desagradável, associada com dano tissular real ou potencial, ou descrita em termos deste dano” (VILELA-FILHO, 1998 apud OLIVEIRA, 2009).

Ao componente fisiológico da dor denomina-se nocicepção, que corresponde ao estímulo das fibras aferentes primárias. Portanto, a nocicepção, refere-se apenas as manifestações neurofisiológicas do estímulo álgico. Neste sentido, em animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental evidenciada, desta maneira, modelos animais de dor são de fato modelos de nocicepção (TJØLSEN; HOLE, 1997 apud SAVEGNAGO, 2007).

1.5.1. Classificação da dor

A dor pode ser classificada de diversas maneiras. Dentre elas podemos citar a classificação em transitória, aguda e crônica. A dor transitória é causada por uma ativação de nociceptores na ausência de dano tecidual, desempenhando uma função protetora ao organismo. A dor aguda é uma resposta de ativação dos receptores nociceptivos a uma lesão local, desaparecendo após o reestabelecimento do tecido, tem curta duração e caráter protetor. A dor crônica não desaparece mesmo com a resolução da lesão inicial e geralmente está relacionada a patologias, podendo durar meses ou até mesmo anos (LOESER E MELZACK, 1999).

Apesar da diferença temporal a dor aguda distingue-se da crônica pela capacidade do organismo de restaurar a lesão e de promover alterações adaptativas a exemplo da neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso (LOESER, 2000).

Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor: a “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; a “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central; a “dor neuropática”, que ocorre devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos e a “dor psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

1.5.2. Mecanismo de transmissão da dor

O reconhecimento da dor se dá através de três etapas básicas: a transdução, a transmissão e a modulação. A transdução refere-se ao fenômeno de ativação dos nociceptores, ou seja, a modificação de um estímulo mecânico, térmico, dentre outros, em estímulo elétrico (KOO, 2003).

Durante o fenômeno de transdução, ocorre uma amplificação da sensação de dor, ocasionada pela liberação de diversas substâncias químicas, chamadas de algogênicas, que surgem nos organismos durante processos traumáticos, isquêmicos ou inflamatórios. Dentre estas substâncias podemos citar a serotonina, a bradicinina, a noradrenalina, a histamina, as citocinas, as prostaglandinas, os leucotrienos e a substância P (ALMEIDA *et al*, 2004).

Receptores nociceptivos são terminações nervosas livres presentes nas fibras mielínicas finas A δ e amielínicas C. De acordo com os estímulos que os acionam, são classificados como termomecânicos, químicos e polimodais inespecíficos (Figura 18).

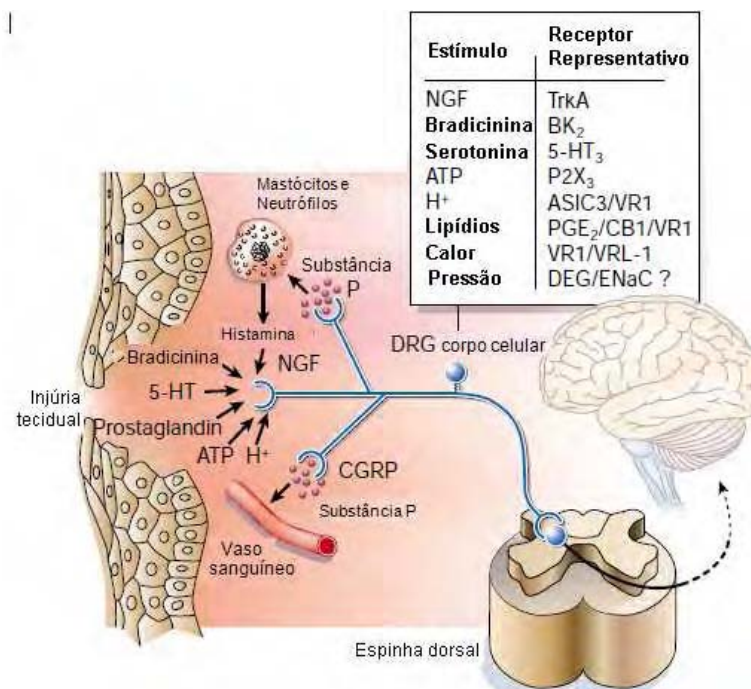


FIGURA 15: Sensibilização de nociceptores periféricos a partir de mediadores químicos liberados em virtude de uma lesão tecidual. FONTE: modificado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

A sensibilização desses receptores pode ocorrer de diversas formas:

- 1) Sensibilização de receptores silenciosos: em condições normais tais receptores não são ativados, mas sua ativação acontece em processos inflamatórios (relacionados a fibras C);
- 2) Redução do limiar de geração de potenciais: esta sensibilização está relacionada à substâncias algogênicas, incluindo a bradicinina, a acetilcolina, as prostaglandinas, a histamina, a serotonina, os leucotrienos, a tromboxano, o fator de ativação plaquetário, os radicais ácidos e os íons potássio, entre outros. Tais receptores são responsáveis pela hiperalgesia termo-mecânica primária e pela vasodilatação observada em lesões traumáticas, inflamatórias e isquêmicas;
- 3) Inflamação neurogênica: sensibilização atribuída a substâncias relacionadas à inflamação, liberadas ou produzidas por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, fibroblastos entre outras. Podemos citar a substância P, a neuroquinina A e B e o peptídeo relacionado geneticamente à calcitonina (CPGR) como fatores que geram vasodilatação e instalam a inflamação neurogênica (SEDIVEC *et al.*, 1983).

4) Atividade do sistema neurovegetativo simpático (SNNVS): libera noradrenalina e prostaglandinas que auxiliam na sensibilização dos nociceptores.

Esses nociceptores são distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. O tecido que recebe a maior parte dos estímulos nociceptivos é a pele. É a pele que fornece a maioria das informações nociceptivas periféricas ao SNC (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A transmissão da mensagem da periferia até a medula espinhal é feita através de fibras nervosas, envolvidas na nocicepção. Quando há a estimulação dos nociceptores periféricos, a informação nociceptiva é levada através das fibras aferentes primárias ao sistema nervoso central (SNC). Essas fibras são classificadas, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução, em três tipos: fibras C: finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s); fibras A δ : médias (2 a 6 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s) e fibras A β : espessas (mais de 10 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s) (ALMEIDA *et al*, 2004).

As fibras A β respondem somente ao toque, vibração, pressão e outros tipos de estimulação sensorial que não sejam nociceptivos, como estímulos mecânicos de baixa intensidade (MILLAN, 1999). As fibras A δ , por sua vez, são conhecidas como mecanotermnociceptores, ou seja, fibras responsivas às estimulações nociceptivas mecânicas e térmicas. A maioria das fibras C são polimodais, isto é, são ativadas por estímulos nocivos mecânicos ou térmicos e ainda por estímulos nocivos de origem química (Figura 16) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Axônios aferentes primários

FIGURA 16: Diferentes nociceptores detectam diferentes tipos de dor. Nervos periféricos de pequeno diâmetro (Aδ) a médio a largo (Aαβ), fibras aferentes mielinizadas e fibras aferentes não mielinizadas (C). FONTE: Adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

A modulação é um processo em que a dor é modificada por diversas vias que inibem sua transmissão. Alguns mediadores como norepinefrina e serotonina podem estar envolvidos nessa via. Analgésicos opióides atuam por esse mecanismo, alterando a liberação de neurotransmissores e modulando a intensidade da dor (Figura 17) (ZIMMERMANN, 2001; VIKMAN *et al*, 2001; MILLAN, 2002; TOBITA *et al*, 2003; GUENOT *et al.*, 2003).

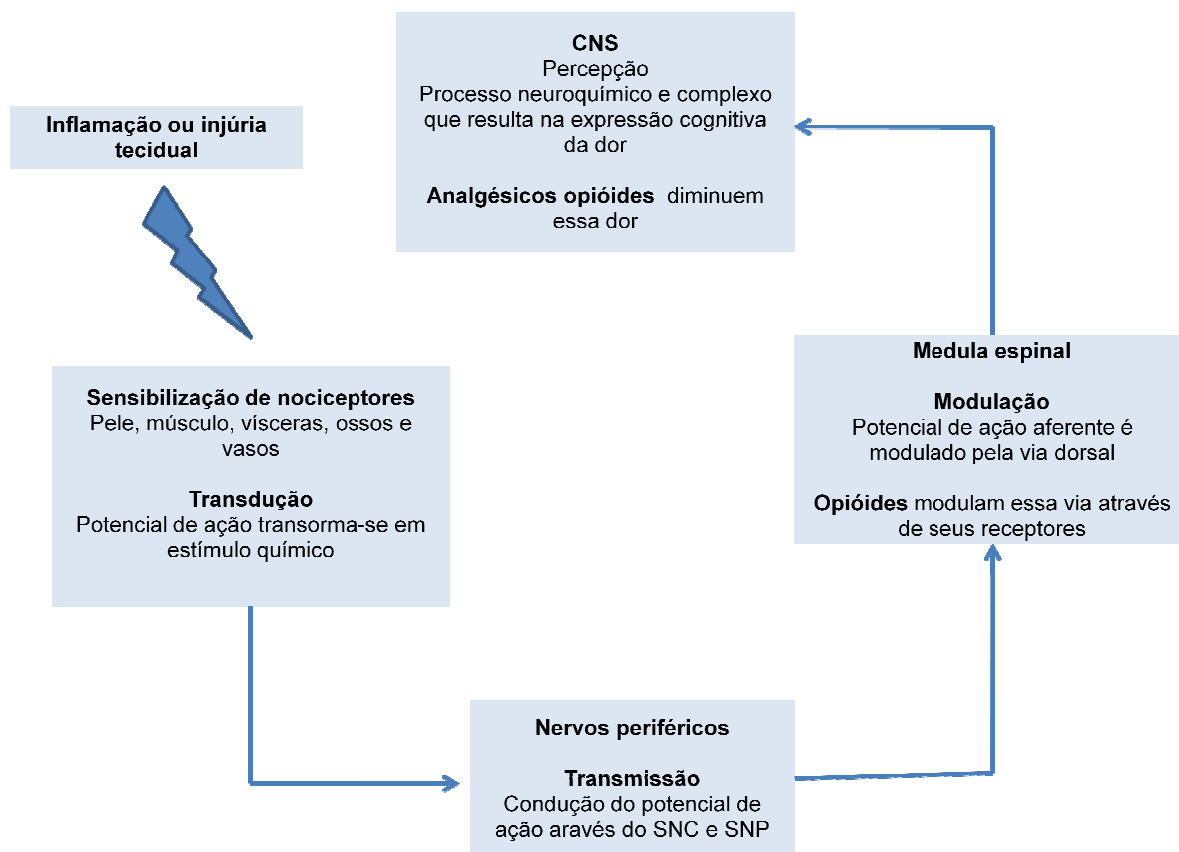


Figura 17: Mecanismos de transmissão da dor aguda. FONTE: Modificado de KOO 2003.

1.5.3. Processamento central da dor e sistema opióide

Após a liberação dos mediadores químicos, a informação nociceptiva é enviada através das fibras aferentes até o SNC e este processa e responde adequadamente a cada estímulo. Essas fibras aferentes levam os estímulos inicialmente através da medula espinal para o corno dorsal, que é uma estrutura dividida em lâminas caracterizadas pelo tipo de informação sensorial que recebe (Figura 18) (COGGESHALL, CARLTON, 1997). Estudos demonstram que as fibras associadas à nocicepção terminam na lâmina I (zona marginal) e II (substância gelatinosa). Sabe-se que as fibras aferentes primárias C e A δ provocam liberação de vários neurotransmissores e possuem terminações tanto em lâminas superficiais como profundas do corno dorsal (BESSON, CHAOUCH, 1987).

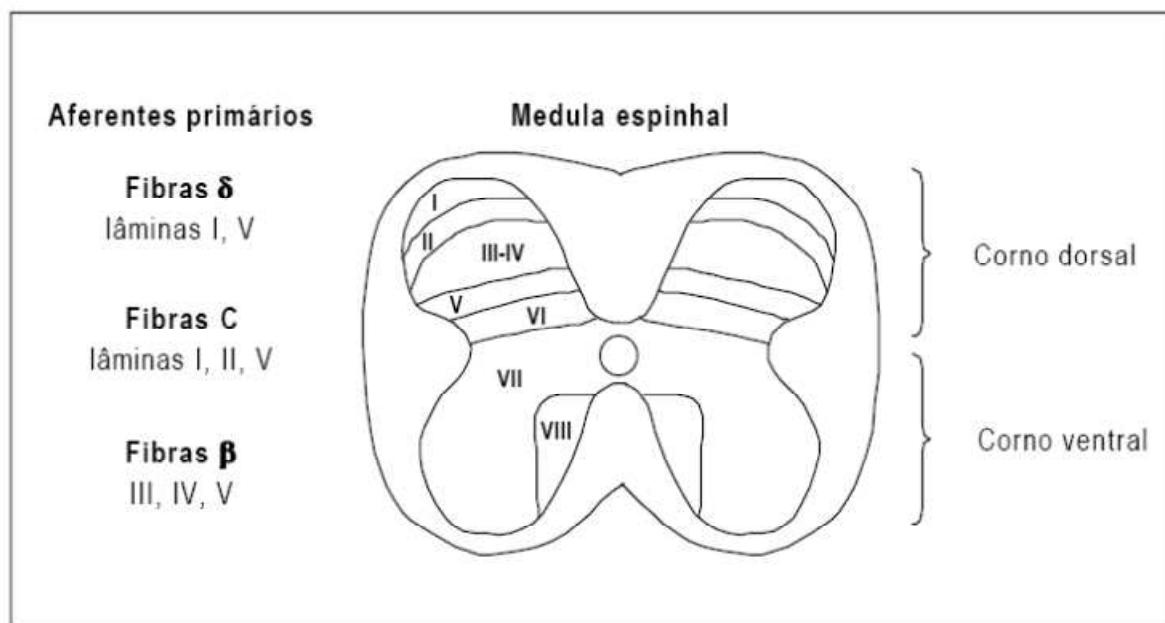


Figura 18: Desenho esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal. Esta estrutura recebe as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes. FONTE: SAVEGNAGO, 2007 adaptado de CRAIG e DOSTROVSKY *et al.*, 1999.

Quando os estímulos chegam ao corno dorsal, elas são integradas e podem envolver diferentes estruturas corticais e supra-corticais a exemplo dos feixes espinotalâmico, espinoreticular, espinotalâmico, entre outras, a partir da integração dos impulsos no corno dorsal e as vias nociceptivas (ALMEIDA *et al.*, 2004).

O organismo possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor. Após o estímulo de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas estruturas cerebrais, onde há a integração entre o contexto presente e passados e a resposta adequada é enviada à medula espinhal através dos neurônios descendentes (MILLAN, 1999). Portanto, percebe-se que as estruturas supra-espinhais estão envolvidas na modulação de circuitos ascendentes e descendentes de controle da nocicepção.

Sabe-se que neurônios presentes nas lâminas (I, II e IV-VI) da medula espinhal estão sujeitos à modulação por estruturas supra-espinhais (WALL, 1967). A modulação e integração descendente da informação nociceptiva é processada nesse circuito pelas vias descendentes que se originam no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM) (MILLAN, 1999; VANEGAS, SCHAIBLE, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras primárias aferentes, bem como em neurônios

do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 1999, 2002).

Essa modulação da dor pelos mecanismos descendentes pode induzir ou inibir a transmissão da dor, através de células que “ligam” (células-*on*) ou “desligam” (células-*off*) a transmissão nociceptiva (LIEBESKIND *et al.*, 1973; URBAN, NAGY, 1997; PORRECA, OSSIPOV, GEBHART, 2002). Sabe-se que quando há uma estimulação das células “desliga” há uma inibição da nocicepção nas vias. De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal deve excitar as “células-*off*” e inibir as “células-*on*” na medula rostroventromedial (FIELDS *et al.*, 1991). O balanço da ativação dessas células promove o resultado da transmissão nociceptiva. Nesse sistema de modulação descendente estão envolvidas também diversas outras estruturas cerebrais, além de sistemas neurotransmissores a exemplo dos sistemas neuropeptídérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, opióide canabinóides endógenos, entre outras substâncias (MILLAN, 2002).

Substâncias ditas opióides referem-se aquelas que possuem ação nociceptiva a partir da ligação à receptores opióides, semelhante à morfina, tanto no SNC quanto periférico. Os opióides endógenos incluem encefalinas, dinorfinas e endorfinas. Os opióides são conhecidos por modular o sistema endócrino (GENAZZANI, PETRAGLIA, 1989; SCHAFER, MARTIN, 1994; MAGGI *et al.*, 1995) e imunológico (BROWN, 1974; ROY, LOH, 1996). As pesquisas têm identificado três tipos distintos de receptores opióides μ (*mu*), σ (*sigma*) e κ (*kappa*), cada um com suas características farmacológicas e fisiológicas específicas (GOLDSTEIN, NAIDU, 1989; LOH, SMITH, 1990; WOLLEMAN, 1990; SIMON, 1991). Estudos farmacológicos ainda subdividem esses receptores nos subtipos: μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 , κ_1 , κ_2 e κ_3 .

Esses vários efeitos fisiológicos ocasionados pela ligação aos receptores opióides são mediados por diversas vias. Sabe-se que os receptores opióides são acoplados a proteínas G, (Gq, Gs, Gi e Gz/x) e suas ações inibitórias podem estar relacionadas a vias inibitórias a exemplo da Go e Gi ou estimulatórias a exemplo da proteína Gs estimulando a via da adenilato ciclase e por fim a Gq ativa a via da fosfolipase C e promove a liberação de Ca^{2+} no citosol (SMART, LAMBERT, 1996).

Diante do exposto, verifica-se que a Ouabaína é uma substância endógena envolvida em diversos processos tanto fisiológicos quanto patológicos. Destacamos sua capacidade de modular o sistema imunológico, exercendo majoritariamente efeitos imunossupressores. Apesar disso, pouco se sabe acerca do envolvimento da Ouabaína frente ao desencadamento imunológico da inflamação. A ênfase deste trabalho é avaliar a atuação

fisiológica, dessa substância endógena, no sistema imunológico, com foco no processo inflamatório. Como a dor é um fator intimamente relacionado à inflamação, sendo inclusive considerada como um sinal flogístico, é pertinente, portanto, associar a investigação da interferência da Ouabaína em processos álgicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a interferência da Ouabaína na inflamação aguda, bem como, sua atuação em processos álgicos e comportamentais.

2.2. Objetivos específicos

Em animais pré-tratados com Ouabaína por 3 dias:

1. Examinar a interferência da Ouabaína no processo inflamatório agudo, utilizando o modelo de teste cutâneo, induzido pelos compostos carragenina e 48/80;
2. Avaliar o papel dos mediadores histamina, PGE2 e bradicinina, no possível efeito modulador da Ouabaína na inflamação aguda;
3. Observar a influência da Ouabaína na nocicepção estimulada periféricamente, utilizando o teste de contorções abdominais estimuladas por ácido acético;
4. Analisar a atuação da Ouabaína na nocicepção estimulada a nível central, utilizando o teste de placa quente e associando um antagonista opióide, a fim de testar seu possível envolvimento opióide;
5. Averiguar se há efeito sedativo e/ ou diminuição da movimentação induzido pela injeção da Ouabaína, utilizando o modelo de labirinto de cruz elevada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Substâncias utilizadas

- **Ouabaína** (Sigma) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)
- **Carragenina** (Sigma) - Mantido à temperatura de 2-8°C
- **Composto 48/80** (Sigma) - Mantido à temperatura de - 20°C
- **Histamina** (Sigma) - Mantido à temperatura de 2-8°C
- **Prostaglandina E2** (Sigma) – Solução estoque 1 mg/Kg , mantido à temperatura de 2-8°C
- **Bradicinina** (Sigma) - Solução estoque 1 mg/Kg , mantido à temperatura de 2-8°C
- **Captopril** (Sigma) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)
- **Indometacina** (Sigma) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)
- **Dexametasona** (Mase) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)
- **Salbutamol** (Sigma) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)
- **Ácido acético glacial** (Reagen) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)
- **Cloridrato de morfina** (Merck) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C);
- **Naloxona** (Sigma) - Mantido à temperatura de 2-8°C
- **Cloreto de sódio** (Fluka) - Mantido à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C)

A preparação das substâncias a serem administradas, em diferentes concentrações, foi realizada minutos antes de sua utilização. Tais substâncias foram dissolvidas ou diluídas em água destilada ou PBS.

3.1.2. Aparelhos e equipamentos utilizados

- **Micrômetro digital** (Instrutemp 070393611)

- **Aparelho de placa quente** (modelo 7406 – LE)
- **Aparelhagem para o teste do labirinto em cruz elevado** (dois braços com paredes laterais e sem cobertura, que medem aproximadamente 30 cm de comprimento por 5 cm de largura e 25 cm de altura e dois braços abertos com o mesmo comprimento, largura e altura, similar ao modelo descrito por LISTER, 1987).
- **Balança de precisão** (Sartorius BP16S- Máx:61g)
- **Balança para animais** (GEHAKA BG 4001- Máx: 4200g)
- **Pipetas Analíticas** (Gilson)
- **Phmetro** (GEHAKA PG200)

3.2. Métodos

3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos fêmeas (*Mus musculus*), os quais foram fornecidos pelo Biotério Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram mantidos a temperatura de 22 ± 2 °C, no ciclo de luz de 12 horas, com livre acesso a água e ração do tipo *pellets* e manuseados conforme o Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF- UFPB. O número do protocolo de submissão do projeto ao CEPA foi: 0407/08.

Para os testes de nocicepção e comportamental, os camundongos foram previamente alojados em gaiolas de polietileno, contendo 4 ou 5 animais cada, com pelo menos 60 minutos de antecedência, no local da execução do experimento (ou no Biotério Prof. Dr. Thomas George ou no Laboratório de Imunofarmacologia Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, conforme o experimento). Essa atitude visou minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal decorrentes da mudança de ambiente, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação. Os animais foram privados de água e ração a partir desse momento.

3.2.2. Tratamento dos animais com ouabaína

Os camundongos foram pré-tratados com injeções intraperitoneais de Ouabaína (0,56mg/Kg) (n=6, 8 ou 10) por 3 dias consecutivos. A substância foi dissolvida e diluída em PBS. Os demais grupos, o controle negativo (correspondente ao grupo que foi pré-tratado uma hora antes da indução da inflamação ou nocicepção com PBS), e controle positivo (correspondente ao grupo que foi pré-tratado uma hora antes da indução da inflamação ou nocicepção com uma droga que reduz a inflamação ou a dor), foram tratados apenas com PBS nos 2 dias anteriores, a fim de sofrerem o mesmo estresse, ocasionado pela injeção, do grupo tratado com Ouabaína. Após uma hora do último tratamento os experimentos foram realizados.

3.2.3. Análise anti-inflamatória da Ouabaína

3.2.3.1. Avaliação da atividade da Ouabaína frente á inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos

O teste de edema de pata é um modelo de fácil manipulação e efetivo para testar substâncias com o potencial anti-inflamatório. O teste cutâneo foi induzido utilizando a carragenina (2,5%) (modificado de SUGISHITA, AMAGAYA, OGIHARA, 1981); o composto 48/80 (2µg/pata); a histamina (100µg/pata); a prostaglandina E2 (5µg/pata) e a bradicinina (6nmol/pata), dissolvidas em PBS. Foi administrado 20µl de uma solução contendo o agente inflamatório no coxim plantar da pata esquerda, e na pata direita, foi administrada a mesma quantidade de PBS, 1 hora após o último tratamento com Ouabaína, em animais pré-tratados conforme o protocolo. Para inibir a ação das enzimas que degradam as cininas (no caso da bradicinina) foi utilizado o captopril (5 mg/kg, s.c.), 1 hora antes da administração da bradicinina. Para cada teste inflamatório foi realizado um grupo controle negativo, com animais pré-tratados apenas com solução salina e em um grupo controle positivo, no qual foi administrada alguma droga conhecida por seu efeito anti-inflamatório, escolhida a depender cada modelo, a que melhor se adequava ao mecanismo desencadeado pelo teste. Esse tratamento foi feito 1 hora antes da injeção, a fim de demonstrar a confiabilidade do experimento. A formação do edema de pata (mm) foi mensurada entre 15 minutos e 24 horas após a injeção do agente flogístico, de acordo com o mecanismo de ação do agente

flogístico, com o auxílio de um micrômetro digital (Instrutemp 070393611) (CASTARDO *et al*, 2008). Os resultados plotados no gráfico são referentes à diferença entre a pata injetada com o agente inflamatório e a injetada apenas com o PBS.

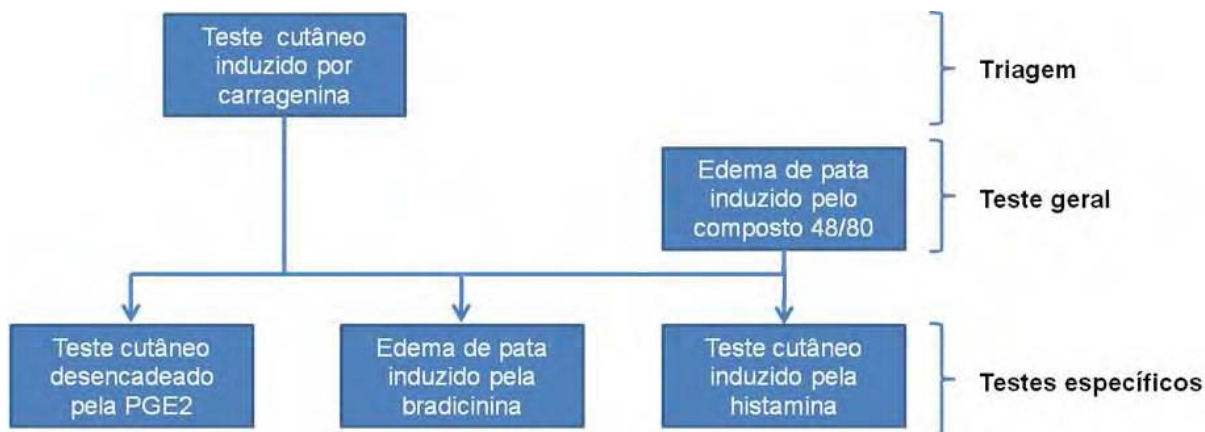


FIGURA 19: Resumo esquemático do estudo da atividade anti-inflamatória da Ouabaína através do teste de edema de pata com diferentes agentes flogísticos.

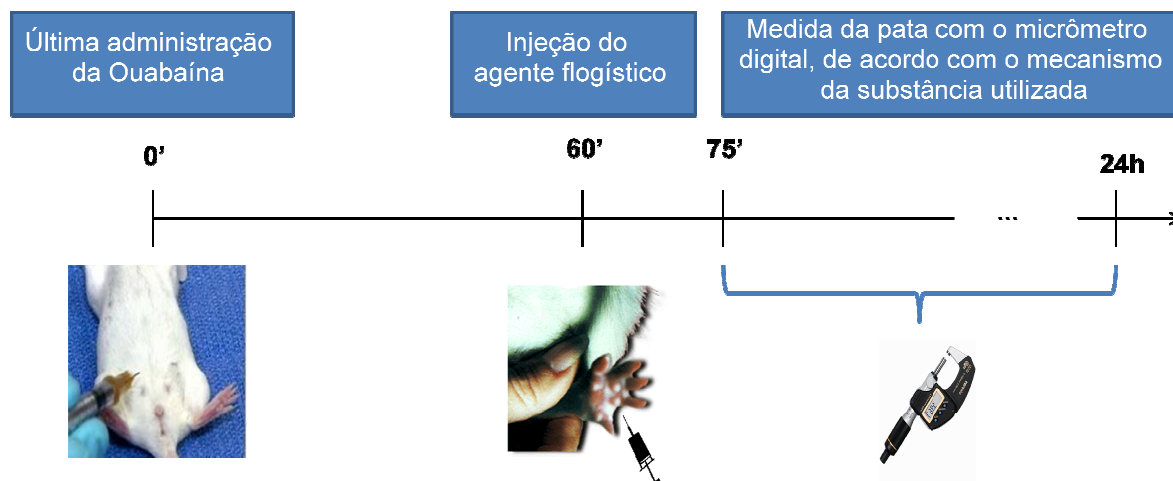


FIGURA 20: Resumo esquemático da metodologia aplicada no estudo da atividade anti-inflamatória da Ouabaína através do teste de edema de pata com diferentes agentes flogísticos.

3.2.4. Estudo da atividade antinociceptiva da Ouabaína

3.2.4.1. Interferência da Ouabaína no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Este teste baseou-se no fato de a administração de ácido acético provocar irritação e o resultado doloroso ocasionar contorções abdominais seguidas de extensão de membros posteriores (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959). Para realização do teste, os animais foram separados em caixas de polietileno individuais, e foi injetado ácido acético 0,8% (0,1mL/10g i.p.), 1 hora após o último tratamento com Ouabaína. Foram utilizados outros dois grupos, um tratado apenas com PBS e outro tratado com uma droga-padrão, a morfina (6mg/kg). As contorções foram medidas a partir de 10 minutos após a administração, por um período de 10 minutos. Uma redução significativa do número de contorções quando comparado ao grupo controle negativo foi considerado como uma resposta antinociceptiva (NARAYANAN *et al.*, 2000).

3.2.4.2. Influência da Ouabaína no teste de placa quente e possibilidade de envolvimento opióide

Este modelo consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico. Tem como parâmetro o momento em que o animal é colocado em uma placa quente, a aproximadamente 52 °C, até apresentar o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambear uma das patas, sendo essas respostas indicativas de nocicepção. Apesar de promover nocicepção, o animal não sofre nenhuma lesão durante a realização do teste. Foi descrito inicialmente Woolfe e MacDonald (1944) e modificado por Eddy e Leimback (1953). Os animais foram submetidos a uma seleção (resposta de até 15 s). Foi feita uma leitura basal e 30 minutos após o tratamento os animais foram colocados no aparelho de placa quente, sendo registrado o parâmetro supracitado. As avaliações foram procedidas antes (basal) e com 30, 60 e 120 minutos após o tratamento. Os animais permaneceram na placa por um tempo máximo de 30 segundos a fim de evitar dano tecidual (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). A avaliação do envolvimento opióide deu-se através da associação de um antagonista dos receptores opióides, a naloxona, na dose de 5mg/Kg s.c., 15 minutos antes da injeção da Ouabaína. Caso o efeito analgésico estivesse presente no teste, e fosse inibido pela naloxona, o mesmo seria devido à atuação opióide da substância.

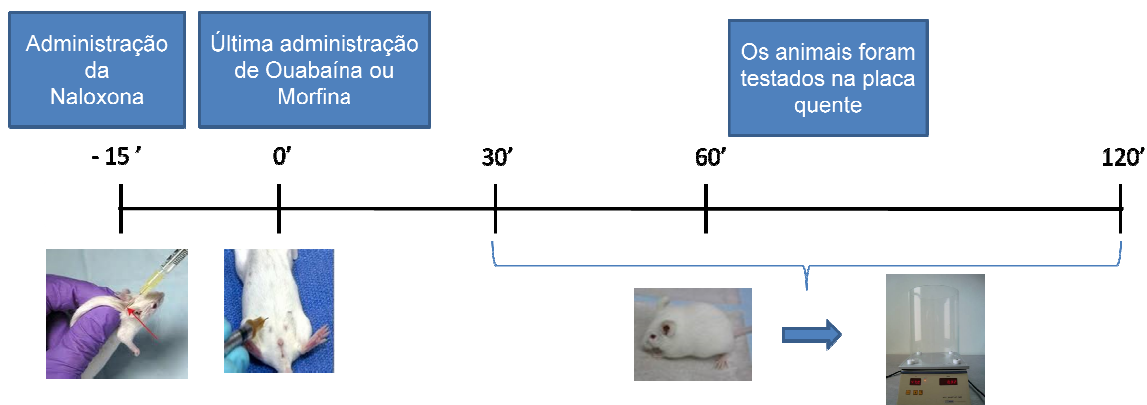


FIGURA 21: Resumo esquemático da metodologia aplicada no teste de placa quente e avaliação do possível efeito opióide da Ouabaína.

3.2.5. Avaliação da interferência da Ouabaína no comportamento

3.2.5.1. Análise do efeito da Ouabaína na sedação e movimentação

Uma hora após o tratamento com Ouabaína, os camundongos foram submetidos ao teste de Labirinto de Cruz Elevada, que avalia a capacidade sedativa e de interferência na capacidade motora de diversas drogas. Os animais foram colocados em um aparelho composto de dois braços abertos (35×5 cm) e dois braços fechados (30×5×15 cm) que partem de uma plataforma central (5 × 5 cm), levantados aproximadamente 30 cm do solo. Os camundongos foram postos na região central do aparelho supracitado e foram contabilizadas, em um intervalo de tempo de 5 minutos o número de entradas e saídas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo de permanência em cada um deles. Uma droga conhecida por seu efeito sedativo, o Diazepam foi utilizado como controle positivo, sendo administrado (i.p.) na dose de 0,5 mg/Kg, 30 minutos antes da realização do teste.

3.2.6. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados utilizando o programa Graph Pad Prism versão 4 ou 5, utilizando o one-way ANOVA (nonparametric) seguido do teste Dunnett's ou Mann Whitney teste ou Teste t de Student seguido do teste não pareado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito anti-inflamatório da ouabaína

4.1.1. Efeito da Ouabaína no teste cutâneo induzido por carragenina

A carragenina é uma substância bastante utilizada na triagem farmacológica de substâncias anti-inflamatórias, e quando injetada na pata, promove uma resposta inflamatória que envolve diversos mediadores como histamina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, NO, infiltração de leucócitos e hiperalgesia (DAMAS, REMACLE-VOLON, 1992; MEDEIROS *et al.*, 1995; VAZ *et al.* 1996; HANDY, MOORE, 1998).

A figura 22 mostra que a injeção de 20µL de uma solução de carragenina (2,5%) de modo subcutâneo na pata de camundongos, promoveu o aumento de seu volume, a partir de 30 minutos após sua administração, em comparação com o grupo injetado apenas com 20 µL de PBS. Os resultados indicaram que a administração da Ouabaína (0,56mg/Kg i.p.) reduziu significativamente o edema de pata desencadeado pela injeção da carragenina em 30 (54,9%), 60 (66,4%), 120 minutos (51, 0%) e 5 horas (51,9%). De modo distinto, a Ouabaína não interferiu no edema de pata ocasionado 24 horas após a administração desse agente flogístico. A indometacina (10mg/Kg s.c.), uma droga anti-inflamatória não esteroide, que inibe a enzima ciclooxigenase (BRUNE; HINZ, 2004) mostrou-se eficaz em modular o edema de pata desencadeado por carragenina (BUADONPRI *et al.*, 2009; UDEGBUNAM *et al.*, 2011). Essa substância foi utilizada como droga para o controle positivo, e demonstrou inibir o edema de pata provocado pela carragenina em todos os tempos estudados (aproximadamente 60%), confirmando a confiabilidade do experimento.

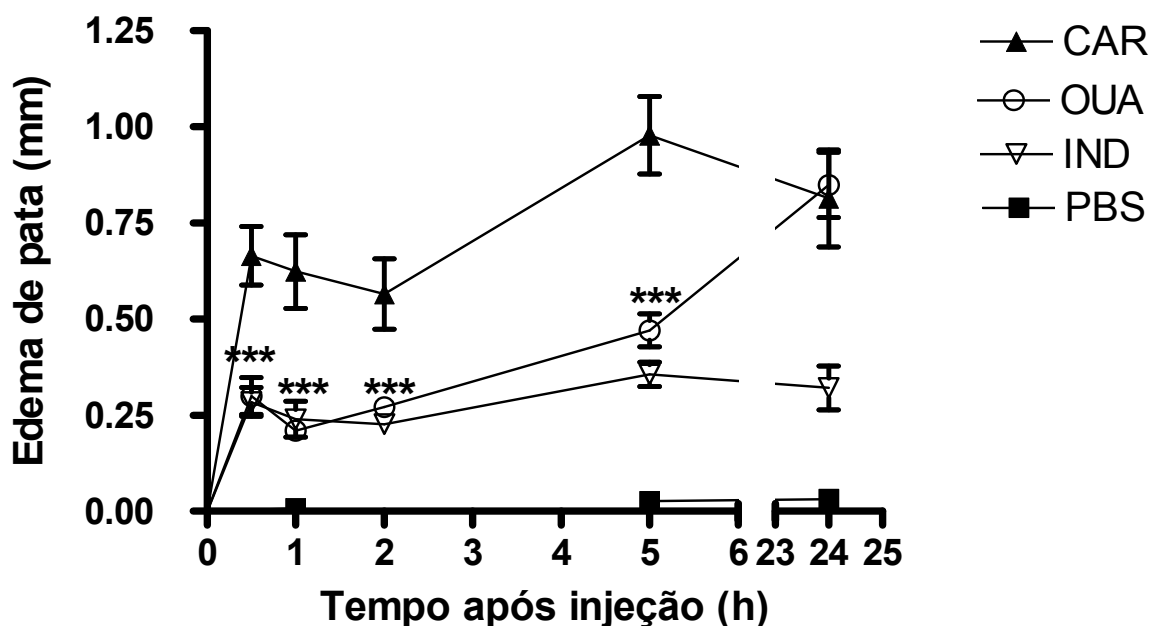


FIGURA 22: **Efeito da Ouabaína no edema de pata induzido por carragenina.** Camundongos foram pré-tratados i.p. com Ouabaína (OUA) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos receberam injeções intraplantares de carragenina (CAR) (2,5%), em 20 µl de PBS na pata esquerda e apenas 20 µl de PBS na pata direita, com exceção do grupo PBS que só recebeu PBS. Cada ponto representa uma média de 8 animais. A indometacina (IND) (10mg/kg s.c.) foi utilizada como droga para controle positivo e administrada 1 hora antes do desafio intraplantar com o agente flogístico. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo. Os dados foram expressos com média± S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando o teste T de Student seguido do teste não-pareado. *** p<0,001.

4.1.2. Efeito da Ouabaína no edema de pata desencadeado pelo composto 48/80

O composto 48/80 é conhecido por causar degranulação massiva de mastócitos através de mecanismos não-imunológicos, pela estimulação de proteínas G (DATTI *et al.*, 2002). Os mastócitos são células importantes no desenvolvimento da inflamação aguda, pelo fato de sua degranulação liberar mediadores pré-sintetizados, a exemplo da histamina, serotonina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas bem como uma variedade de citocinas que provocam edema e infiltrado celular (COUSSENS, WERB, 2002).

Os resultados demonstraram que a injeção intraplantar de 20µL de uma solução do composto 48/80 (2µg/ pata), promoveu o aumento do volume da pata, a partir de 30 minutos após sua administração, em comparação com o grupo injetado apenas com 20µL de PBS. A administração da Ouabaína (0,56mg/Kg i.p.) inibiu significativamente o edema de pata ocasionado pela injeção do composto 48/80 em 30 (69,1%), 60 (79,7%), e 120 minutos (49,7%). O controle positivo, salbutamol, uma substância conhecida por estabilizar a membrana dos mastócitos e inibir sua degranulação em modelos murinos de edema de pata (MOHD, LEWIS, 1984; MALFAIT *et al.*, 1999), foi utilizado (10mg/Kg s.c) e inibiu o edema desencadeado pelo 48/80 (mais de 90%) demonstrando a funcionalidade do modelo (Figura 23).

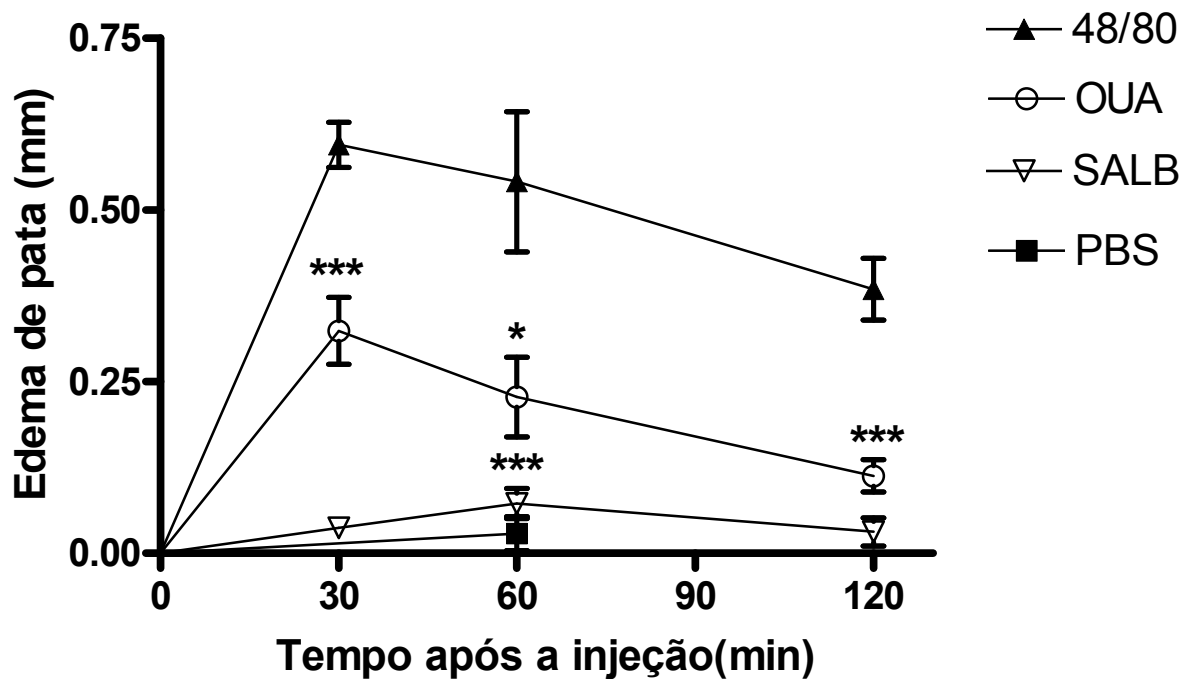


FIGURA 23: **Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado por 48/80.** Camundongos foram pré-tratados i.p. com Ouabaína (OUA) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos receberam injeções intraplantares de 48/80 (48/80) (2µg/ pata), em 20 µl de PBS na pata esquerda e apenas 20 µl de PBS na pata direita, com exceção do grupo PBS que só recebeu PBS. Cada ponto representa uma média de 8 animais. O salbultamol (SALB) (10mg/kg s.c.) foi utilizado como droga para controle positivo e administrado 1 hora antes do desafio intraplantar com o agente flogístico. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo. Os dados foram expressos com média ± S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando o teste T de Student seguido do teste não-pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.3. Efeito da Ouabaína no teste cutâneo provocado pela histamina

Sabe-se que a histamina atua através da ligação nos receptores H1 e H2 provocando o aumento da permeabilidade vascular e consequentemente a formação do edema (NATHAN, 2002; GUZIK, KORBUT, ADAMEK-GUZIKT, 2003; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; ALLER *et al.*, 2006).

Os resultados demonstraram que a injeção subcutânea de 20µL histamina (100µg/pata), provocou um edema na pata a partir de 30 minutos após sua injeção, em comparação com o grupo injetado apenas com 20µL de PBS. A administração da Ouabaína não interferiu no edema de pata desencadeado por histamina. A dexametasona é uma droga clássica utilizada para inibir o edema de pata desencadeado por diversos agentes flogísticos (modificado de CASTARDO *et al.*, 2008). Trata-se de um anti-inflamatório esteroide e foi utilizada como droga para o controle positivo (0,5 mg/Kg i.p.), demonstrando inibir significativamente o edema (aproximadamente 47%) confirmando a confiabilidade dos dados (Figura 24).

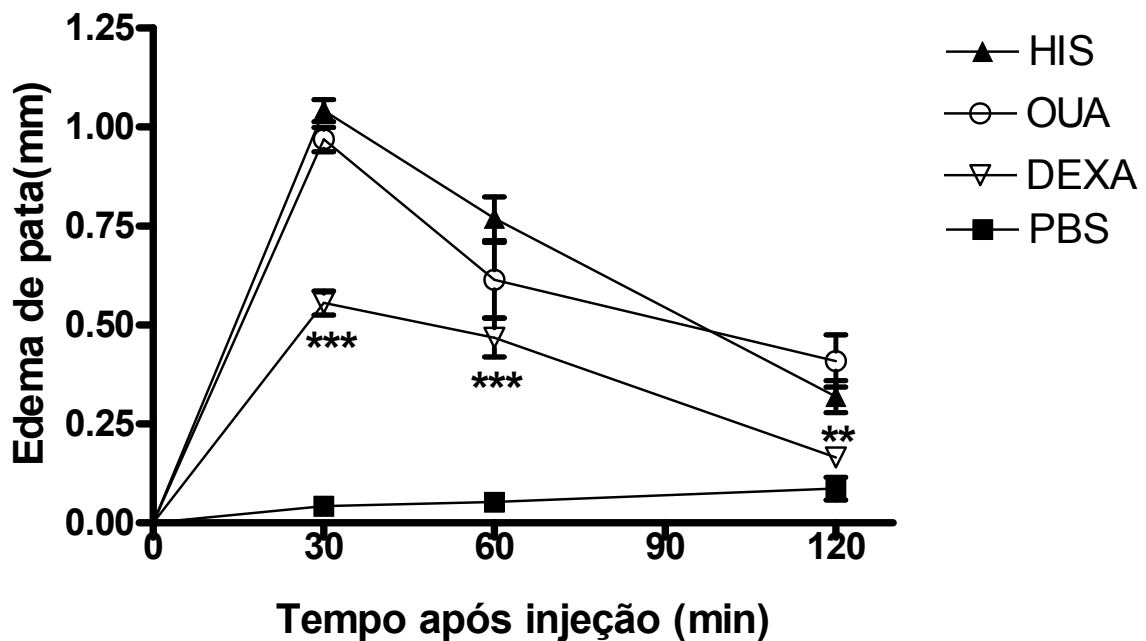


FIGURA 24: **Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado por histamina.** Camundongos foram pré-tratados i.p. com Ouabaína (OUA) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos receberam injeções intraplantares de histamina (HIS) (100µg/ pata), em 20 µl de PBS na pata esquerda e apenas 20 µl de PBS na pata direita, com exceção do grupo PBS que só recebeu PBS. Cada ponto representa uma média de 8 animais. Dexametasona (DEXA) (0,5 mg/kg s.c.) foi utilizada como droga para controle positivo e administrada 1 hora antes do desafio intraplantar com o agente flogístico. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo. Os dados foram expressos com média $\pm$ S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando o teste T de Student seguido do teste não-pareado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.4. Efeito da Ouabaína no edema de pata desencadeado pela prostaglandina E2 (PGE2)

A PGE2 interage com receptores EP e IP, receptores acoplados a proteínas G e modulam a transcrição de vários fatores pró-inflamatórios (incluindo genes que codificam a iNOS), além de sinergizar com outros mediadores para promoção da dor (BOIE *et al.*, 1994; DRAY, 1995; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001; RICHARDSON, VASKO, 2002).

Os resultados relativos ao mediador inflamatório, PGE2, demonstraram que houve um aumento do volume da pata a partir de 15 minutos após sua injeção (5µg/ pata), em comparação com o grupo injetado apenas com 20µL de PBS. A injeção da Ouabaína demonstrou uma inibição significativa do edema de pata desencadeado por PGE2 em todos os tempos estudados (15, 30 e 60 minutos de aproximadamente 79,8%, 82,1% e 96%, respectivamente). A dexametasona (0,5 mg/Kg i.p.), um anti-inflamatório esteroide, foi utilizada como droga para o controle positivo (modificado de CASTARDO *et. al.*, 2008) e inibiu significativamente o edema (cerca de 90%), mostrando a funcionalidade do modelo (Figura 25).

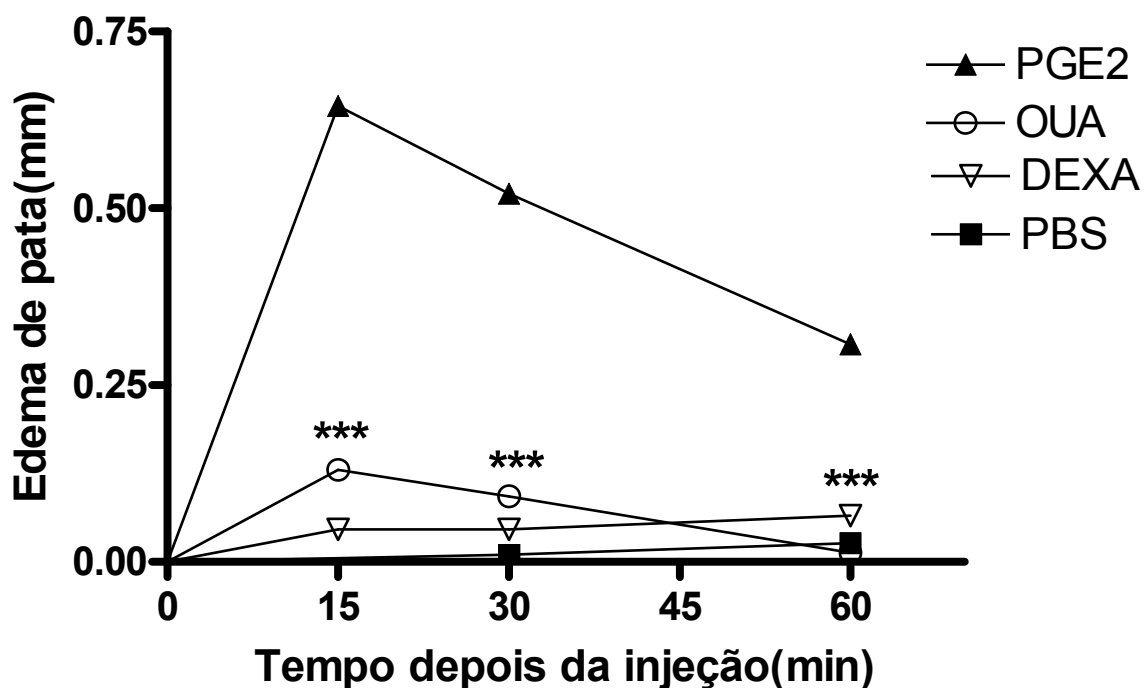


FIGURA 25: **Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado por PGE2.** Camundongos foram pré-tratados i.p. com Ouabaína (OUA) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos receberam injeções intraplantares de PGE2 (PGE2) (5µg/ pata) em 20 µl de PBS na pata esquerda e apenas 20 µl de PBS na pata direita, com exceção do grupo PBS que só recebeu PBS. Cada ponto representa uma média de 8 animais. A dexametasona (DEXA) (0,5 mg/Kg i.p.) foi utilizada como droga para controle positivo administradas 1 hora antes do desafio intraplantar com o agente flogístico. Asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo. Os dados foram expressos com média± S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando o teste T de Student seguido do teste não-pareado. *** p<0,001.

4.1.5. Efeito da Ouabaína no edema de pata induzido pela bradicinina

A bradicinina induz o extravasamento de plasma, contração do músculo liso, broncoconstrição e nocicepção. Além disso, sinergiza com outras substâncias, como a PGE₂, na promoção desses eventos (BHOOLA, FIGUEROA, WORTHY, 1992; DRAY, PERKINS, 1993; DRAY 1995).

Os resultados demonstraram que houve a formação do edema na pata de camundongos injetados com 20µL de uma solução de bradicinina (6nmol/pata), a partir de 15 minutos após sua injeção, em comparação com o grupo injetado apenas com 20µL de PBS. A injeção de Ouabaína (0,56mg/Kg i.p.) reduziu o edema desencadeado por bradicinina no tempo de 15 minutos (34%), mas não em tempos mais tardios (30 minutos). A dexametasona (0,5 mg/Kg i.p.), um anti-inflamatório esteroide, foi utilizada como droga para o controle positivo (modificado de CASTARDO *et. al.*, 2008) e inibiu significativamente o edema (cerca de 46%), mostrando a efetividade do modelo (Figura 26).

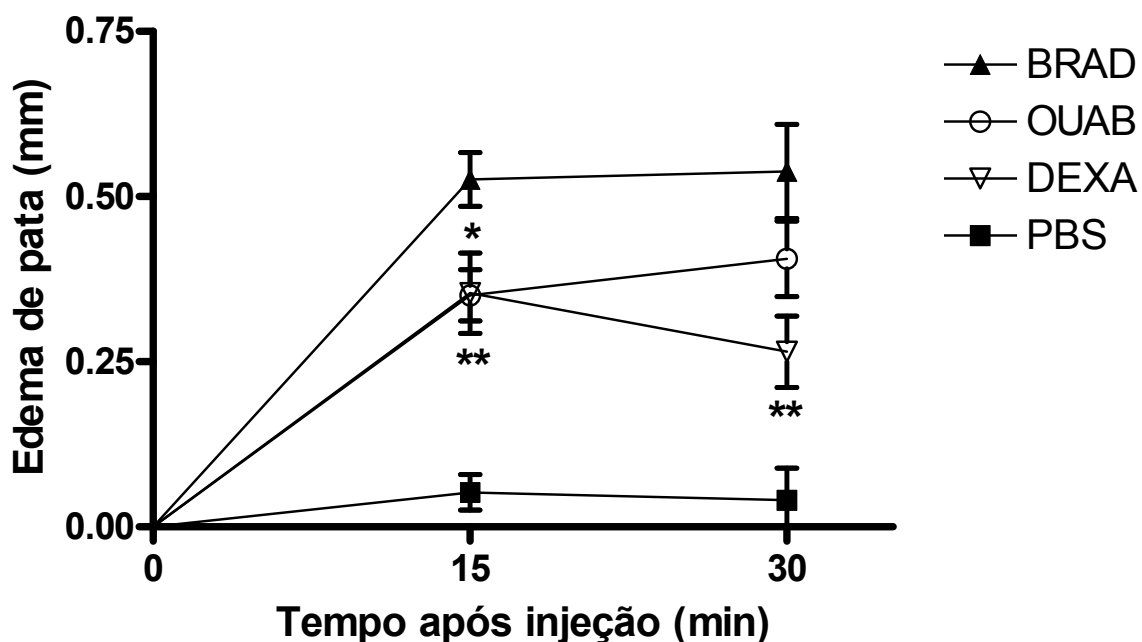


FIGURA 26: **Efeito da Ouabaína no edema de pata ocasionado pela bradicinina.** Camundongos foram pré-tratados i.p. com Ouabaína (OUA) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos receberam injeções intraplantares de bradicinina (BRAD) (6nmol/pata) em 20 µl de PBS na pata esquerda e apenas 20 µl de PBS na pata direita, com exceção do grupo PBS que só recebeu PBS. Cada ponto representa uma média de 8 animais. A dexametasona (DEXA) (0,5 mg/Kg i.p.) foi utilizada como droga para controle positivo administrada 1 hora antes do desafio intraplantar com o agente flogístico. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo. Os dados foram expressos com média ± S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando o teste T de Student seguido do teste não-pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2. Efeito anti-nociceptivo da Ouabaína

4.2.1. Efeito da Ouabaína no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um procedimento muito sensível para determinar substâncias com potencial anti-nociceptivo, que atuam periféricamente. Porém, esse modelo, corresponde a um modelo inespecífico, por provocar a liberação indireta de diversos mediadores nociceptivos (COLLIER *et al*, 1968; TAKAHASHI, PAZ, 1987).

Conforme esperado, os resultados demonstraram que a injeção de ácido acético provocou um grande número de contorções abdominais. No grupo em que houve a injeção da Ouabaína esse efeito foi reduzido (45%) quando comparado com o grupo controle. A morfina (6 mg/Kg i.p.), um analgésico opióide que demonstrou-se efetivo na inibição das contorções abdominais estimuladas por este teste (BENTLEY, NEWTON, STARR, 1981), e foi utilizado como controle positivo em nosso modelo. Essa droga padrão inibiu significativamente (aproximadamente 78%) o número de contorções em relação ao grupo controle (Figura 27).

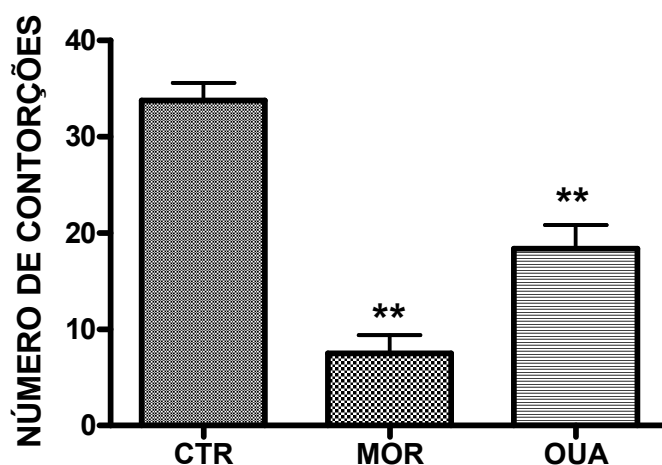


FIGURA 27: **Efeito da Ouabaína no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.** Camundongos foram pré-tratados com Ouabaína (OUA) (i.p.) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos receberam injeções intraperitoneais de ácido acético 8%. Cada barra representa uma média de 10 animais. A morfina (MOR) (6 mg/Kg) foi utilizada como droga para controle positivo e administrada meia hora antes do desafio com ácido acético. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo, pré-tratado apenas com PBS. Os dados foram expressos com média $\pm$ S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando ANOVA seguido do *Dunnett's test*. ** $p < 0,01$. CTR: grupo pré-tratado com PBS; MOR: grupo pré-tratado com morfina. Todos esses grupos foram posteriormente desafiados com ácido acético.

4.2.2. Efeito da Ouabaína no teste de placa quente e possível envolvimento opióide

O teste de placa quente reflete o envolvimento de mecanismos centrais, visto que apenas substâncias que atuam de forma central são capazes de interferir na dor desencadeada neste modelo. Adicionalmente, o modelo indica que compostos que promovam anti-nocicepção, no teste, possuem envolvimento narcótico (PINI *et al.* 1997 ; HOSSEINZADEH, YOUNESSI, 2002). Esse fato é confirmado com a adição de grupos pré-tratados com um antagonista inespecífico dos receptores opióides, a naloxona.

Os resultados revelaram que os camundongos administrados com PBS e submetidos ao teste de placa quente, conseguem permanecer um tempo muito curto (alguns poucos segundos) na placa, ou seja, possuem um tempo de latência pequeno, em todos os tempos estudados. A injeção do antagonista opióide, naloxona, associada ao PBS não interfere nessa condição em nenhum dos tempos estudados. Em contrapartida, no grupo que foi administrado com a Ouabaína, houve um aumento do tempo de latência (74%) no teste, após 30 minutos da injeção da substância. Esse efeito foi revertido (aproximadamente 77%) quando houve o pré-tratamento com a naloxona (5mg/kg s.c.) (PRZEWŁOCKI, PRZEWŁOCKA, 2001). Nos tempos mais tardios, de 60 e 120 minutos, a injeção de Ouabaína não interferiu na nocicepção desencadeada pelo teste. A morfina, um analgésico opióide, foi utilizado como controle positivo e provocou um aumento do tempo de latência (mais de 70%) em todos os tempos avaliados, efeito esse foi revertido (em aproximadamente 70%) pelo pré-tratamento com o antagonista opióide, naloxona, o que demonstra que o modelo utilizado é funcional (Figura 28).

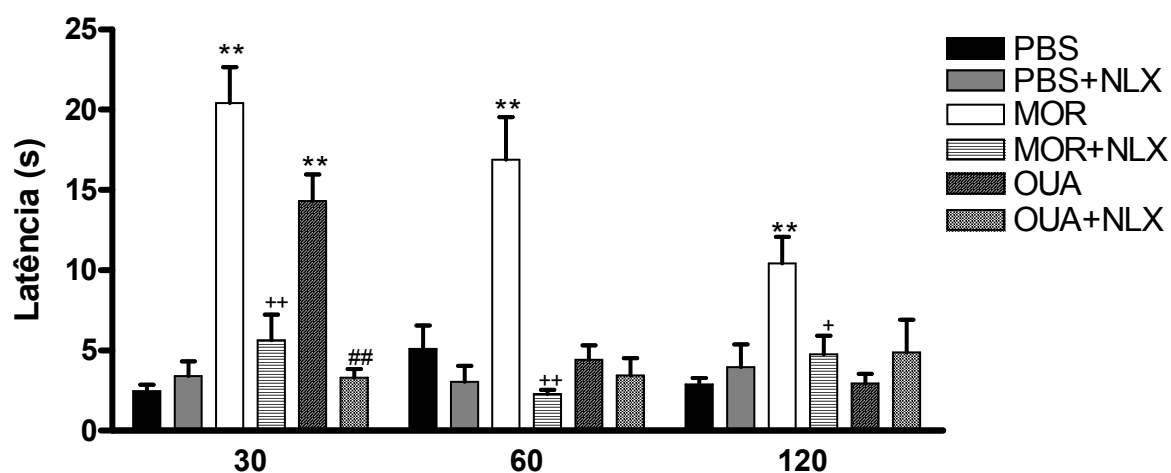


FIGURA 28. **Efeito da Ouabaína no teste de placa quente.** Camundongos foram pré-tratados com Ouabaína (OUA) (i.p.) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos foram colocados, por no máximo 30 segundos, num aparelho de placa quente e a latência foi registrada. Cada barra representa uma média de 6 animais. A morfina (MOR) (10 mg/Kg) foi utilizada como droga controle positivo e administrada meia hora antes do desafio na placa quente. Nos grupos com o antagonista opióide, naloxona (NLX) (5mg/Kg s.c.) o pré-tratamento foi realizado 15 minutos antes do tratamento com PBS (PBS+ NLX), Ouabaína (OUA+ NLX) ou morfina (MOR+ NLX). Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados com o grupo controle negativo (CTR), símbolos de + comparam com o grupo morfina e # comparam com o grupo Ouabaína. Os dados foram expressos com média± S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando ANOVA seguido do *Dunnett's test*. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.3. Interferência da Ouabaína no comportamento

4.3.1. Análise do efeito da Ouabaína na sedação e movimentação

O teste de labirinto de cruz elevada é baseado na capacidade natural de medo e evitação de lugares abertos por camundongos e ratos. O teste contabiliza o número de entradas e saídas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo dispendido em ambos, sendo seu resultado um reflexo do nível de ansiedade e da capacidade motora dos animais. Esse teste demonstra modificações comportamentais frente à administração de diversas substâncias que atuem especificamente nesses mecanismos fisiológicos (MONTGOMERY, 1955; BORSY, CSANYI, LAZAR, 1960; PELLOW *et al.* 1985; TREIT, MENARD, ROYAN, 1993; RODGERS, JOHNSON, 1995).

Os resultados revelaram que a administração da Ouabaína não interferiu no número de entradas, porém aumentou o tempo dispendido nos braços abertos. A substância também não interferiu no número de visitas nos braços fechados, mas provocou um decréscimo do tempo dispendido nesses braços. A Ouabaína não interferiu no número total de entradas. O controle positivo, Diazepam (0,5mg/Kg), aumentou o número total de entradas o tempo dispendido nos braços abertos, bem como decresceu o tempo dispendido nos braços fechados, efeito esperado por sua atividade ansiolítica e sedativa comprovadas (Figura 29).

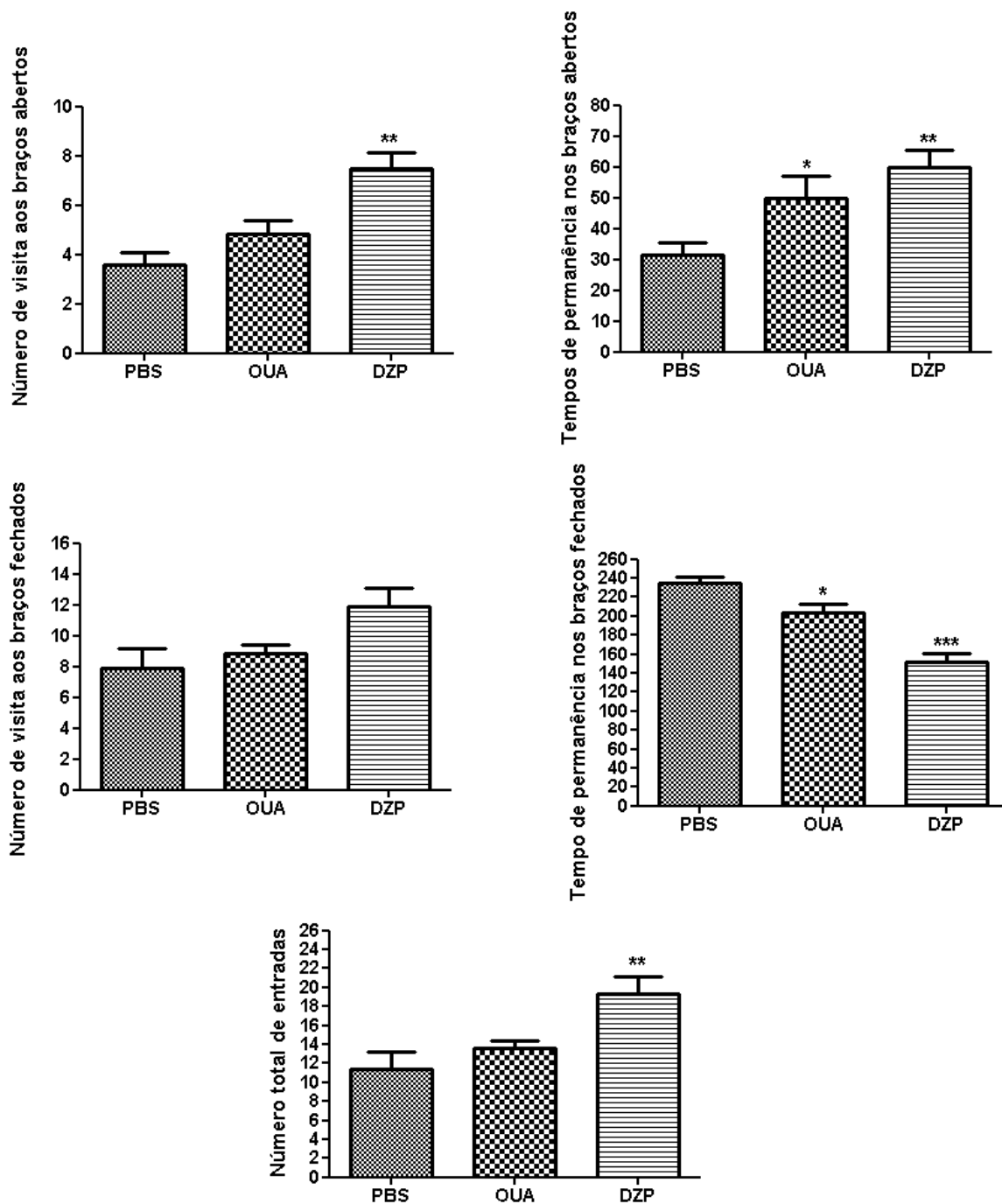


FIGURA 29. **Efeito da Ouabaína no teste de labirinto de cruz elevada.** Camundongos foram pré-tratados com Ouabaína (OUA) (i.p.) na dose de 0,56mg/Kg por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento com Ouabaína os camundongos foram colocados no labirinto e avaliados durante 5 minutos. Foi registrado o número de visitas aos braços abertos e fechados, bem como o tempo de latência em cada um deles. Cada barra representa uma média de 7 ou 8 animais. O diazepam (DZP) (0,5 mg/Kg) foi utilizado como droga controle positivo e administrado meia hora antes do experimento. Os dados foram expressos com média $\pm$ S.E.M. e analisadas pelo programa Graphpad Prism usando ANOVA seguido do MannWhitney test* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; p *** $< 0,001$.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a atividade da Ouabaína em processos inflamatórios e nociceptivos. Para a realização dos testes relacionados à inflamação foi utilizado um dos sinais clássicos do processo inflamatório, o edema, amparados por um modelo simples e de fácil manipulação, bastante efetivo para testar substâncias com o potencial antiinflamatório, o modelo de edema de pata ou teste cutâneo.

Inicialmente, foi realizada uma curva dose-resposta, a fim de saber qual a melhor concentração e a quantidade de dias de injeção necessários para que a Ouabaína apresentasse efeito no processo inflamatório (dados não demonstrados, mas presentes no artigo anexo). A dose efetiva para todos os testes, realizados *in vivo*, foi 0,56 mg/Kg, injetada intraperitonealmente, por 3 dias consecutivos. Estes resultados estão de acordo com o artigo de Rodrigues-Mascarenhas, dos Santos e Rumjanek (2006) e um artigo publicado recentemente do mesmo grupo (de PAIVA *et al.*, 2011). Essa dose promove uma concentração plasmática similar a atingida com o tratamento farmacológico e em situações de estresse (10^{-7} M) (BAUER *et al.*, 2005), porém sabe-se que as concentrações basais fisiológicas da Ouabaína, encontradas no plasma, estão entre 10^{-11} e 10^{-9} M (HANSEN, 2003).

O estudo da Ouabaína na inflamação iniciou-se com o teste cutâneo induzido pela carragenina, uma substância colóide obtida por extração em fase aquosa de variedades naturais de algas das famílias *Gigartinaceae*, *Solieriaceae*, *Hypneaecae* e *Furcellariaceae* da classe Rhodophyceae (algas vermelhas) (CASTARDO, 2007). Esse composto é amplamente utilizado na triagem farmacológica de diversas drogas com atividades anti-inflamatória (VINEGAR *et al.*, 1969; CRUNKHORN, MEACOCK, 1971; POSADAS *et al.*, 2004; ARYA, KUMAR, 2005).

A injeção da carragenina na pata induz a formação de uma resposta inflamatória que provoca o aumento do volume da pata (edema), infiltrado neutrofílico e hiperalgesia (HANDY, MOORE, 1998). Esse modelo foi descrito inicialmente em 1962 em ratos (WINTER, RISLEY, NUSS, 1962), e em 1969 foi adaptado para camundongos (LEVY, 1969).

A primeira fase da resposta desencadeada pela carragenina corresponde as primeiras 6 horas e é caracterizada por um pequeno edema. A fase mais precoce (as primeiras duas horas) é principalmente mediada por histamina, serotonina e um aumento da bradicinina e da síntese de prostaglandinas nos tecidos circunvizinhos. Entre 3 e 4 horas inicia-se a emigração de leucócitos para o sítio inflamado, havendo liberação de enzimas proteolíticas, o que promove aumento da geração de prostaglandinas no local (WILLIS, 1969; ANDERSON, BROCKALEHURST, WILLIS, 1971).

Os estudos sugerem que são as prostaglandinas, em especial a PGE₂, a partir desse momento, que mantêm o aumento da permeabilidade vascular e liberação de outros mediadores inflamatórios. Estudos recentes demonstram que a partir da quarta hora há um aumento significativo da expressão da iNOS e conseqüentemente grande produção de NO, substância que parece auxiliar a PGE₂ na manutenção do edema. Nesse contexto também parecem estar envolvidas várias citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do TNF- α , IFN- γ e IL-2, que provocam um feedback positivo para um aumento da produção de NO (IANARO *et al.*, 1994; OMOTE *et al.*, 2001; POSADAS, *et al.* 2004). A fase mais tardia, que se inicia a partir das 24 horas, é sustentada pela liberação de prostaglandinas (BRITO, ANTONIO, 1998).

Os resultados demonstraram que a administração de Ouabaína promoveu um efeito anti-inflamatório na fase inicial do edema de pata provocado pela carragenina (entre 30 minutos e 5 horas), porém não interferiu na fase tardia (a partir de 24 horas). Esses dados demonstram pela primeira vez o efeito anti-inflamatório da Ouabaína, porém não direciona seu mecanismo de ação. Esse efeito pode estar associado à inibição da via da histamina, prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-6 e TNF- α (MATSUMORI *et al.*, 1997) ou pelo bloqueio da via de sinalização do TNF- α /NF- κ B, mecanismo de ação desencadeado por diversos outros glicosídeos (YANG *et al.*, 2005).

Para melhor entender a atuação da Ouabaína na inflamação um segundo composto inflamatório, o 48/80, foi testado. O composto 48/80 (uma mistura de polímeros derivados do *N*-metil-*p*-metoxi-feniletilamina), foi descrito como uma substância que estimula diretamente proteínas G e promove a mudança de GDP para GTP e conseqüente dissociação das subunidades α e $\beta\gamma$ (TOMITA *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 1998). Nos mastócitos esse composto penetra parcialmente na membrana plasmática e ativam a atividade GTPase estimulando a via da fosfolipase C, levando a uma rápida exocitose do conteúdo dos grânulos, incluindo a histamina (NAKAMURA, UI, 1985; MOUSLI *et al.*, 1990; SENYSHYN, BAUMGARTNER, BEAVEN, 1998).

Os resultados demonstraram que a injeção da Ouabaína promoveu uma inibição do edema de pata ocasionado pelo composto 48/80 em todos os tempos estudados (30, 60 e 120 minutos), confirmando assim a atividade anti-inflamatória da Ouabaína. Existem controvérsias acerca da atuação da Ouabaína na degranulação de mastócitos, foram reportados efeitos inibitórios, estimulatórios e até mesmo ausência de efeito (OKAZAKI *et al.*, 1976; LAGO *et al.*, 2001; SENOL *et al.* 2007). Através dos resultados obtidos podemos postular alguns mecanismos de inibição da inflamação pela Ouabaína nesse modelo, dentre os quais são destacados os seguintes: (1) via inibição da liberação das aminas biogênicas presentes nos mastócitos residentes, ou seja, inibição da degranulação do mastócito, ou (2)

através da inibição de ligação dos mediadores em seus receptores específicos, incluindo as aminas vasoativas.

Para melhor entender a via envolvida na inibição da inflamação pela Ouabaína, foi iniciado um estudo da atuação da Ouabaína frente à inflamação desencadeada por mediadores inflamatórios específicos. Inicialmente foi feita a avaliação do edema de pata desencadeado por histamina. Essa amina vasoativa está envolvida nas fases mais precoces do edema de pata ocasionado pela carragenina e no edema gerado pela degranulação de mastócito, na inflamação desencadeada pelo composto 48/80, ambos inibidos pela Ouabaína.

Os resultados demonstraram que a administração da Ouabaína não interferiu no edema de pata desencadeado por histamina em nenhum dos tempos estudados (30, 60 e 120 minutos). Juntos, esses dados sugerem que a atuação da Ouabaína frente à inflamação é independente da via da histamina. Uma hipótese é que a Ouabaína, nesse modelo de inflamação, através da injeção do composto 48/80, possa ligar-se a açúcares ou glicoconjugados na superfície do mastócito e então estabilizar a membrana do mastócito prevenindo a liberação de seu conteúdo e consequentemente, inibindo o desencadear do processo inflamatório.

O segundo mediador utilizado foi a prostaglandina E2, envolvida tanto na primeira quanto na segunda fase do edema desencadeado pela carragenina. Os resultados demonstraram que o processo inflamatório desencadeado por PGE2 é inibido pela injeção de Ouabaína em todos os tempos estudados (15, 30 e 60 minutos).

Estudos com linhagens de células de rim canino demonstram que as prostaglandinas podem modular a atividade da Na^+/K^+ ATPase, tanto positiva quanto negativamente, e esta modulação parece interferir na ligação com a Ouabaína. Um estudo mostra que a PGE2 inibe a Na^+/K^+ ATPase, e sua pré-incubação com essas células reduz o número de sítios de ligação com a Ouabaína (COHEN-LURIA; RIMON; MORAN, 1993). Outro estudo, com o mesmo tipo de célula, demonstra o aumento da transcrição de genes da Na^+/K^+ ATPase, pela PGE2, culminando com um maior número de sítios de ligação para Ouabaína (TAUB *et al*, 1992). Esta modulação está relacionada aos receptores de prostaglandinas.

Alguns modelos demonstram que há o aumento da atividade da bomba em processos inflamatórios, estando esse fenômeno também relacionado à nocicepção (CZAPLINSKI, ABAD, EBLEN-ZAJJUR, 2005). Outros mostram-se divergentes em relação à atividade da Na^+/K^+ ATPase e inflamação. Propõem que inibidores da Na^+/K^+ -ATPase estimulam a COX-2, propiciando o desencadeamento da inflamação, porém aumentam

outras substâncias que estabilizam o mRNA da COX-2, o que abre perspectivas para que essas substâncias atuem como inibidores da inflamação (SU *et al.*, 2011).

Diante do exposto, nesse modelo, pode ocorrer um aumento da atividade da Na^+/K^+ ATPase induzida pela PGE2, o que poderia auxiliar a desencadear o processo inflamatório, acompanhado dos mecanismos já bem conhecidos, com envolvimento dos receptores EP2 e EP3. Associadamente pode haver um aumento do número de sítios de ligação à Ouabaína. A inibição da Na^+/K^+ ATPase pela Ouabaína, poderia reverter a estimulação da Na^+/K^+ ATPase desencadeada pela PGE2, em especial se os sítios estiverem em números aumentados, e isso conseqüentemente diminuiria a inflamação.

Outra possibilidade seria a indução, pela Ouabaína, da síntese de substâncias que atuem como inibidoras da inflamação, a exemplo das supracitadas, que estabilizam RNAs de fatores pró-inflamatórios propiciando uma ação anti-inflamatória. Isso poderia ocorrer através da ligação à Na^+/K^+ ATPase ou através de outras vias. Essas hipóteses poderiam explicar o mecanismo utilizado pela Ouabaína para promover seu efeito anti-inflamatório dependente da via da PGE2.

Outro mediador utilizado foi a bradicinina, um importante mediador envolvido no processo inflamatório desencadeado pela carragenina. Os resultados demonstraram que o edema desencadeado por bradicinina só é inibido pela Ouabaína em tempos precoces (15 minutos) (34%), mas não em tempos mais tardios (30 minutos).

Sinteticamente os resultados até o momento, demonstraram que a Ouabaína apresenta efeito anti-inflamatório. Esse efeito parece ser devido à inibição da degranulação de mastócitos, e modulação na via da PGE2 e da bradicinina, porém o mecanismo é independente da via da histamina. Esses resultados sugerem várias possibilidades de ação para a substância em questão. Essas suposições vão desde a estabilização de carboidratos na membrana de mastócitos até a possível relação da modificação da atividade da Na^+/K^+ ATPase e modificação dos receptores de prostaglandinas. Além destes, outros mecanismos ainda desconhecidos, como a própria entrada da substância na célula promovendo modificações fisiológicas, não podem ser descartadas.

Todos os resultados anti-inflamatórios apresentados pela substância em questão, sugerem que a mesma pode apresentar efeito anti-nociceptivo. Sabe-se que as prostaglandinas são potentes agentes sensibilizantes hábeis em modular múltiplas vias nociceptivas (BURIAN, GEISLINGER, 2005), e que PGE2 e PGI2 aumentam a liberação de peptídeos como substância P e o gene da calcitonina na inflamação neurogênica, atuando sinergicamente com a bradicinina (BK) na indução da dor. Esses mediadores estão entre os mais importantes indutores da hiperalgesia inflamatória. Devido a esses fatos foi avaliado o efeito da Ouabaína na nocicepção.

O teste nociceptivo realizado inicialmente foi o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959). Este teste é bastante sensível em detectar atividade anti-nociceptiva periférica de compostos, porém não corresponde a um modelo específico (TAKAHASHI, PAZ, 1987). A administração desse agente irrita a membrana serosa levando a liberação de substâncias como prostaglandinas, serotonina, cininas, H⁺, K⁺, entre outras, que promovem a estimulação de nociceptores localizados na superfície peritoneal (BENTLEY *et al.*, 1983; FORTH, MARTIN; PETER, 1986).

Esse mecanismo provoca um comportamento caracterizado por contrações abdominais, movimentos do corpo e uma distorção dos músculos dorso-abdominais, bem como a redução da atividade motora e coordenação (BARS *et al.*, 2001). O mecanismo de contorções abdominais induzidas por ácido acético pode estar relacionado à sensibilização de receptores nociceptivos por prostaglandinas ou por envolvimento da via opióide (COLLIER *et al.*, 1968).

Os resultados demonstraram que a Ouabaína reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O resultado analgésico, desse modelo, pode ser um reflexo da inibição das vias da PGE2 e da bradicinina, evidenciada nos modelos de inflamação. Outros trabalhos demonstram que a Ouabaína inibe a Na⁺/K⁺ ATPase em neurônios centrais e periféricos e modifica a liberação de diversos neurotransmissores envolvidos na transmissão da dor (YAKSH, WILSON, 1979; VYAS, MARCHBANKS, 1981; SATOH, NAKAZATO, 1992; DOHI, 1996). Esse efeito também pode estar relacionado à ligação de receptores opióides periféricos pela substância.

Foi descrito que a administração local de opióides endógenos, como a β -encefalina, promove efeitos anti-nociceptivos na dor inflamatória, e isso se dá através de receptores opióides μ e δ (STEIN, GRAMSCH, HERZL, 1990). Isso confirma que uma ação opióide periférica da Ouabaína pode estar presente na inibição da nocicepção, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Para melhor esclarecer o efeito da Ouabaína na dor foi utilizado o teste de placa quente. As patas dos camundongos são muito sensíveis a aumento de temperaturas que não danificam o tecido. O teste de placa quente desencadeia uma dor que possui envolvimento narcótico, sendo o mesmo específico para identificar agentes anti-nociceptivos que atuam de forma central (PINI *et al.*, 1997). A administração de substâncias que atuem em nível supra-espinal prolonga o tempo de reação no teste (FRANÇA *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.* 2002). Apesar de compostos que possuam atividade sedativa e relaxante muscular atue nesse teste, a resposta anti-nociceptiva, nesse modelo, é considerado

seletiva para compostos semelhantes à opióides (WOOLFE, MACDONALD, 1944; EDDY, LEIMBACK, 1953; JANSSEN, NIEMEMEGERE, DONY, 1963).

Os resultados obtidos evidenciam que a injeção da Ouabaína provoca a inibição da dor no teste de placa quente apenas em tempos precoces (30 minutos), evento demonstrado pelo aumento do tempo de latência nesse período. Nos tempos mais tardios (60 e 120 minutos) a substância não possui efeito no teste. Para verificar se a atuação da substância se dava pela via opióide, foi utilizado um antagonista inespecífico de receptores opióides, a naloxona. A administração dessa droga inibiu o efeito da Ouabaína frente à dor central. Isso indica que o efeito analgésico central da Ouabaína é desencadeado pela sua atuação na via opióide.

Outros grupos já haviam descrito a tendência da Ouabaína em promover anti-nocicepção, através de um modelo de injeção intratecal da substância em ratos. Em um desses estudos, foi evidenciado o sinergismo da Ouabaína com a morfina (ZENG, *et al.*, 1999; ZENG, CHEN, DOHI, 2007). Pesquisas demonstram a relação entre receptores opióides e a Na^+/K^+ ATPase e comprovam que a expressão de receptores de opióides do tipo δ inibem a atividade da bomba. Este estudo sugere que a atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase, em diferentes modelos, afeta a atividade neural diretamente além de interagir com os receptores opióides δ e afetar sua funcionalidade modulando a transmissão da dor (DENG *et al.*, 2009).

Esse mesmo estudo mostra que essa inibição parcial da Na^+/K^+ ATPase promove um aumento da sensibilidade agonista desses receptores opióides. A efetividade na anti-nocicepção ocorre através do aumento de opióides endógenos a exemplo das endorfinas (DENG *et al.*, 2009). Esses dados permitem sugerir que a Ouabaína, inibe a bomba de Na^+/K^+ e interage com receptores opióides, desencadeando seu efeito anti-nociceptivo.

Conceitua-se opióide como todas as substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas que reagem com os receptores opióides, quer como agonista quer como antagonista (MARTIN, 1983).

Por ser uma substância endógena, e interagir com receptores opióides, como agonista, a Ouabaína pode ser considerada uma potente endorfina por ter uma redução da dor semelhante à morfina. Sabe-se que os efeitos tanto fisiológicos quanto patológicos das endorfinas são rapidamente revertidos pela administração da naloxona (FADEN, HOLADAY, 1980).

A sugestão da substância se tratar de uma endorfina deve-se também as similaridades fisiológicas que ela possui com os opióides endógenos. Além de possuir atividade anti-nociceptiva central e periférica, demonstradas neste trabalho, sabe-se que a

Ouabaína pode ser produzida por elementos do eixo HPA (adrenal, hipotálamo e hipófise) (HAMLYN *et al.*, 1991; LAREDO, HAMILTON, HAMLYN, 1994; FERRANDI *et al.*, 1997) e liberada de modo dependente a outros hormônios a exemplo do hormônio ACTH (LAREDO, HAMILTON, HAMLYN, 1994; BECK *et al.* 1996; HINSON, HARWOOD, DAWNAY, 1998; SOPHOCLEOUS, ELMATZOGLOU, SOUVATZOGLOU, 2003) e angiotensina II (LAREDO *et al.* 1997; SHAH *et al.*, 1998), sendo sua liberação em circunstâncias similares às aquelas onde há secreção de corticóides.

Adicionalmente a Ouabaína possui seus níveis aumentados após o exercício físico (GOTO *et al.*, 1995; BAUER *et al.*, 2005). Sua administração aumenta a liberação de neurotransmissores no cérebro a exemplo da noradrenalina (GARCIA, KIRPEKAR, 1975), serotonina (CARMICHAEL; ISRAEL, 1975), ácido gama-amino-butírico (BENJAMIN, QUASTEL, 1972) e acetilcolina (ZENG, CHEN, DOHI, 2007). Ademais, a Ouabaína modula aspectos fisiológicos como o sistema imunológico (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2009) e endócrino (FLEISCHER *et al.*, 1972; GARDNER, BROWN, AURBACH, 1983) semelhantes à opióides endógenos (HILEMAN, JACKSON, 1999; JAMALIA *et al.*, 2007). Todos esses fatores assemelham a Ouabaína a uma endorfina e corroboram para a afirmação que a substância em questão pode funcionar como um opióide endógeno.

Talvez a atuação apenas em tempos precoces, nesse modelo, se dá porque apenas uma pequena quantidade da substância consiga ultrapassar a barreira hemato-encefálica e chegar ao SNC, sendo degradada rapidamente.

Para descartar a possibilidade de um falso-resultado analgésico da substância, desencadeado por sedação e/ou diminuição da movimentação do animal, realizamos um teste que avaliou a sedação e a movimentação dos animais, o labirinto de cruz elevada. Este modelo é baseado na capacidade de medo de lugares abertos por ratos e camundongos e evitação desses ambientes, estando a maior parte do tempo em lugares fechados (MONTGOMERY, 1955; LISTER, 1987; TREIT, MENARD, ROYAN, 1993).

Sabe-se que o percentual de entrada nos braços abertos e o tempo dispendido nesses braços é um parâmetro clássico utilizado para avaliar o estado de ansiedade após o tratamento com diversas drogas. O número total de entradas é o parâmetro utilizado para indicar a atividade motora em camundongos (LISTER, 1987) e ratos (BORSY, CSANYI, LAZAR, 1960). Então é correto utilizar o número total de entradas para avaliar a atividade motora de camundongos, por ser uma medida relativa da atividade locomotora (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS, JOHNSON, 1996). Outro parâmetro utilizado pode ser o número de entrada nos braços fechados, que também é definido como atividade locomotora (BORSY, CSANYI, LAZAR, 1960; RODGERS, JOHNSON, 1996).

Os dados demonstram que a Ouabaína não interfere no comportamento de ansiedade nem na função motora comparados com o grupo controle. Esses resultados sugerem que o efeito anti-nociceptivo da Ouabaína não está relacionado à atividade sedativa ou a função motora.

Desta forma, com os resultados obtidos durante a realização deste trabalho, verificou-se que a Ouabaína possui atividade anti-inflamatória, e esse efeito é dependente da inibição da degranulação de mastócitos e da modulação das vias de mediadores inflamatórios. A Ouabaína demonstrou também possuir atividade anti-nociceptiva periférica e central. Esse efeito é vinculado à modulação dessas vias de mediadores inflamatórios e a mecanismos opióides. Adicionalmente verificou-se que a Ouabaína não provoca sedação ou modificação na atividade motora, podendo-se, portanto, afirmar que a atividade antinociceptiva da substância independe da modificação de padrões comportamentais.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho mostra pela primeira vez, o potencial anti-inflamatório e anti-nociceptivo da Ouabaína em modelos murinos, *in vivo*. A ouabaína possui potencial anti-inflamatório diante da inflamação aguda desencadeada por diferentes agentes flogísticos, a exemplo da carragenina e do composto 48/80.

Esse potencial anti-inflamatório da substância pareceu estar relacionado ao bloqueio da degranulação de mastócitos, bem como à inibição da via de mediadores inflamatórios, a exemplo da PGE2 e da bradicinina porém é independente da via da histamina.

Em relação à anti-nocicepção, a Ouabaína possuiu ação tanto central quanto periférica. A inibição da dor periférica pode ser devido à inibição da ação dos mediadores inflamatórios supracitados. Associado a esses efeitos a Ouabaína possui atuação na via opióide, o que desencadeia sua analgesia central, em tempos precoces, e pode colaborar na analgesia periférica.

A anti-nocicepção desencadeada pela Ouabaína independe da modificação de mecanismos comportamentais. A injeção da substância não provoca sedação ou diminuição da capacidade motora dos animais.

Diante de todas as evidências de liberação e as similaridades fisiológicas que ela possui com os opióides endógenos, o estudo sugere que a Ouabaína seja uma endorfina.

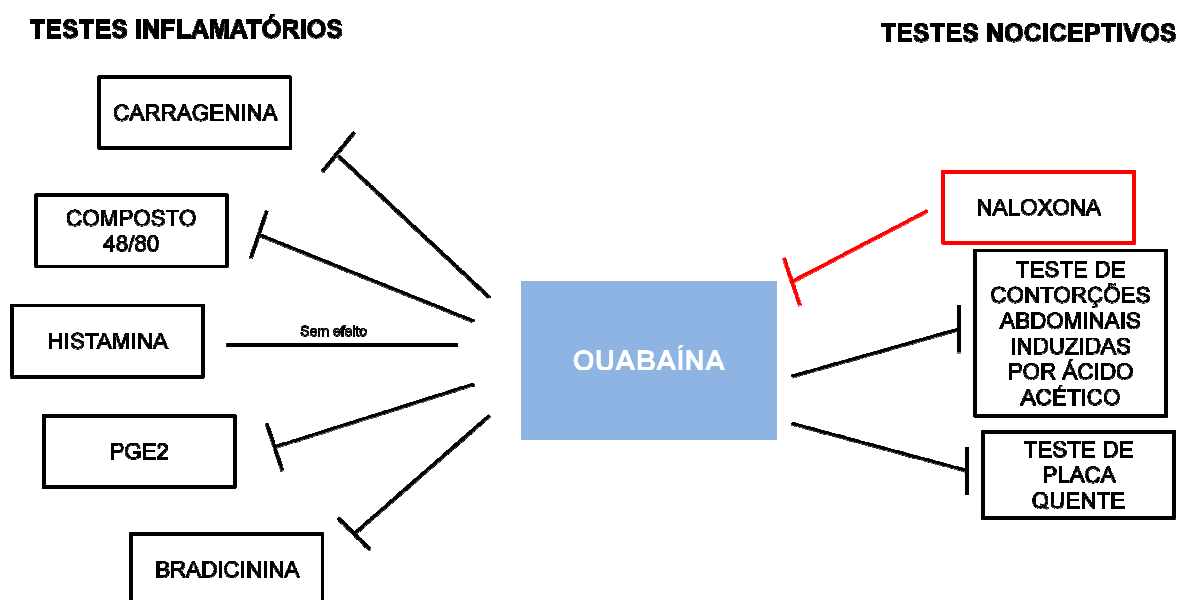


Figura 30: Resumo esquemático do efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo da Ouabaína.

7. REFERÊNCIAS

ADEREM, A., SMITH, K.D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **SEMINARS IN IMMUNOLOGY**, v.16, p. 55 – 67, 2004.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782–787, 2000.

AKIRA, S. *et al.* Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 675–680, 2001.

ALLER, M.A. *et al.* The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v.12, p. 225 – 234, 2006.

ALI, H. *et al.* Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Medical Clinics of North America**, v.81, p.1-28, 1997.

ALMEIDA, T.F., ROIZENBLATT, S., TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, 2004. p.40 – 56.

ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 179-188.

ANDERSON, A.J., BROCKALEHURST, W.E., WILLIS, A.L. Evidence for the role of lysosomes in the formation of prostaglandins during carrageenin-induced inflammation in the rat. **Pharmacological Research Communications**, v.3, p. 13-20, 1971.

ANDRIOPOULOU, P. *et al.* Adherens Junctions Histamine Induces Tyrosine Phosphorylation of Endothelial Cell-to-Cell. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, p.2286-2297, 1999.

ANNER, B.M. *et al.* Interaction of hypothalamic Na,K-ATPase inhibitor with isolated human peripheral blood mononuclear cells. **Bioscience Reports**, v. 14, p. 231-242, 1994.

ANTONI, G. *et al.* A short synthetic peptide fragment of human interleukin 1 with immunostimulatory but not inflammatory activity. **The Journal of Immunology**, v.137, p.3201–3204, 1986.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **Journal of Internal Medicine**, v.261, p.44-52, 2007.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of látex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228 – 232, 2005.

ARZT, E. *et al.* Serotonin inhibition of tumor necrosis factor- α synthesis by human monocytes. **Life Sciences**, 48, p. 2557–2562, 1991.

ASEA, A. *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15028–15034, 2002.

BAGGIOLINI, M., DEWALD, B., MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annual Review of Immunology**, v.15, p. 675–705, 1997.

BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, p.245–252, 1998.

BAUER, N. *et al.* Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs - Effects of β -Blockade and Angiotensin- Converting Enzyme Inhibition . **Hypertension**, v. 45, p.1024-1028, 2005.

BARNES, P.J. Histamine and serotonin. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics** v.14, p. 329–339, 2001.

BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597–652, 2001.

BAUER, N. *et al.* Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs—effects of blockade and angiotensin converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v.45, p. 1024–1028, 2005.

BECK, M. *et al.* Production of ouabain by rat adrenocortical cells. **Endocrine Research**, v.22, p.845-849, 1996.

BEGUIN, P. *et al.* The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. **The Embo Journal**, v.16, p.4250- 4260, 1997.

BENJAMIN, A.M.; QUASTEL. J.H. Location of amino acids in brain slices from the rat. **The Journal of Biochemistry**, v. 28, p. 631-646, 1972.

BENTLEY, G.A. *et al.* Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **British Journal of Pharmacology**, v.73, p. 325-332, 1981.

BENTLEY, G.A. *et al.* Studies on the antinociceptive action of a agonist drugs and their interaction with opioid mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v.79, p. 125-134, 1983.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v. 67, p. 67 – 85, 1987.

BHoola, K.D., FIGUEROA, C.D., WORTHY, K. Biorregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological Reviews**, v. 44, p. 1- 180, 1992.

BLAIN, H. *et al.* Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. **La Revue de médecine interne**, v, 21, p.978-988, 2000.

BLANCO, G.; MERCER R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. 633-650, 1998.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca⁺⁺ stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, v.264: p.C1367-C1387, 1993.

BEUTLER, B. Neo-ligands for innate immune receptors and the etiology of sterile inflammatory disease. **Immunological Reviews**, v. 220, p. 113–128, 2007.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 1–5, 2007.

BLEY, K.R. *et al.* The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. **TIPS**, v. 19, p.141-147, 1998.

BOIE, Y.*et al.* Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.12173-12178, 1994.

BOGATCHEVA, N. V.; VERIN, A. D. Reprint of “The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function” [Microvascular Research 76 (2008) 202–207]. **Microvascular Research**, v. 77, p. 64–69, 2009.

BORSY, J.; CSANYI, E., LAZAR I. A method of assaying tranquilizing drugs based on the inhibition of orientational hypermotility. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 124, p. 180–190, 1960.

BOUEIZ, A.; HASSOUN, P. M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. **Microvascular Research**, v. 77, p. 26- 34, 2009.

BORTNER, C.D., HUGHES, F.M. JR.; CIDLOWSKI, J.A. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**. v.19, p. 32436-32442,1997.

BROWN, S. *et al.* Immunologic dysfunction in heroin addicts. **Archives of Internal Medicine**, v. 134, p. 1001-1014; 1974.

BROWN, D.A.; PASSMORE G.M. Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p.1380–1383, 2010.

BREDER, C. D.; DEWITT; D. L.; KRAIG. R. P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 355, p. 296-315, 1995.

BREYER, R.M. *et al.* Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 661-690, 2001.

BRITO, A.R.M.S., ANTONIO, M.A. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 215-228, 1998.

BRUNE, K.; HINZ, B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. **Arthritis & Rheumatism**, v.8, p. 2391-9, 2004.

BUADONPRI, W. *et al.* SYNTHETIC CURCUMIN INHIBITS CARRAGEENAN-INDUCED PAW EDEMA IN RATS. **International Journal of Health Research**, v. 23, p. 11-16, 2009.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p.139 – 154, 2005.

CAMPOS, A.R. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, p. 116—210, 2002.

CARMICHAEL, F.J., ISRAEL, Y. Effects of ethanol of neurotransmitter release by brain cortical slices. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 193, p. 824-834, 1975.

CASTARDO, J.C. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DA *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM CAMUNDONGOS**. CURITIBA, 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 137p.

CASTARDO, J. C. *et al.* Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema, **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p. 405-411, 2008.

CAZZOLA, I.; MATERA, M.G. 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.21, p.13–16, 2000.

CHANDRASEKHARAN, N. V. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 13926- 13931, 2002.

CHENG, H. F. *et al.* Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v.103, p. 953-961, 1999.

CHOW, D. C.; FORTE, J. G.. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v.198, p.1-17, 1995.

CLEMENZA, L. *et al.* Research on complement: old issues revisited and a novel sphere of influence. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 292–296, 2003.

COGGESHALL, R.E., CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Reviews**, v. 24, p. 28 – 66, 1997.

COHEN-LURIA, R. ; RIMON, G. ; MORAN, A. PGE2 inhibits Na-K-ATPase activity and ouabain binding in MDCK cells. **American Journal of Physiology**, v.264, F61-F65, 1993.

COLE, H. W. *et al.* Serotonin-induced Paw Edema in the Rat: Pharmacological Profile. **General Pharmacology**, v. 26, p. 431- 436, 1995.

COLE, D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clinical Science**, v.104, p.455–466, 2003.

COLEMAN, R.A., SMITH, W.L., NARUMIYA, S. VIII. International Union of Pharmacology. Classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**, v.46, p.205-229, 1994.

COLLIER, H.O.J. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology Chemotherapy**, v. 3, p. 295–310, 1968.

COUSSENS, L.M., WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

CRAIG, A.D., DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, 1999. p. 1 - 8.

CRAMBERT, G.; K. GEERING. FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase. **Science's STKE**, v.2003, p.RE1, 2003.

CRIADO, P.R. *et al.* Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, p. 195-210, 2010.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 392 – 402, 1971.

CZAPLINSKI, M.; ABAD, C.; EBLEN-ZAJJUR. A. Normarel expression and inflammation-induced changes of Na and Na/K ATPase activity in spinal dorsal horn of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 374, p.147-151, 2005.

DALE, H.H., LAIDLAW, P.P. Further observations on the action of β -imidazolyethylamine. **The Journal of Physiology**, v. 43, p. 182–195, 1911.

DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G., Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v.211, p. 81–86, 1992.

D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 27, p. 3-13, 2003.

DATTI, F. *et al.* Influence of chronic unpredictable stress on the allergic responses in rats. **Physiology & Behavior**, v.77, p. 79–83, 2002.

de ANGELIS, C.; HAUPERT, G.T. JR. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase from midbrain and adrenal. **American Journal of Physiology**, v. 274, p.182-188, 1998.

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

de PAIVA, L.S., *et al.*, Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology** (In print), 2011.

de WARDENER, H.E. The hypothalamus and hypertension. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 1599– 1658, 2001.

DENG, H. *et al.* Interactions of Na⁺,K⁺-ATPase and co-expressed d-opioid receptor. **Neuroscience Research**, v. 65 , 222–227, 2009.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2007.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 519–550, 2009.

DOBROVOLSKAIA, M.A., VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 903–914, 2002.

DOHI, S. Spinal antinociception. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 9, p. 404-409, 1996.

DORING, Y. *et al.* Human antiphospholipid antibodies induce TNF α in monocytes via Toll-like receptor 8. **Immunobiology**, v. 215, p. 230–241, 2010.

DORNAND, J. *et al.* Paradoxical production of mouse thymocyte activating factor by ouabain-treated human mononuclear cells. **Cellular Immunology**, v. 83, p. 351-359, 1984.

DRAY, A. Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p.611-615, 1992.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosciences**, v.16, p. 99 - 104,1993.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.75, p.125 –131, 1995.

ECHEVARRIA-LIMA, J. *et al.* Ca²⁺ mobilization induced by ouabain in thymocytes involves intracellular and extracellular Ca²⁺ pools. **Hypertension**, v. 41, p.1386-1392, 2003.

ESTEVEZ, M. B. *et al.* Ouabain exacerbates activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p. 281-292, 2005.

FANBURG, B.L.; LEE, S.L. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. **American Journal of Physiology**, v.272, p. L795–806, 1997.

FADEN, A. I.; HOLADAY, J. W. Experimental endotoxin shock: the pathophysiologic function of endorphins and treatment with opiate antagonists. **The Journal of Infectious Diseases**, v.142, p. 229-238, 1980.

FERRANDI, M. *et al.* Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. **Hypertension**, v.30, p. 886-896, 1997.

FESCHENKO, M.S. *et al.* Phospholemman, a single-span membrane protein, is an accessory protein of Na,K-ATPase in cerebellum and choroid plexus. **Journal of Neuroscience**, v.23, p. 2161–2169, 2003.

FIELDS, H.L., HEINRICHER, M.M., MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**, v. 14, p. 219 – 245, 1991.

FILION, F. *et al.* Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 34323–34330, 2001.

FIMBEL, S. M. *et al.* Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p. 1712–1724, 2007.

FISHELSON, Z. Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. **Molecular Immunology**, v.28, p. 545–552, 1991.

FLEISCHER, N. *et al.* Stimulation of Adrenocorticotropin (ACTH) and Growth Hormone (GH) Release by Ouabain: Relationship to Calcium. **Endocrinology**, v. 91, 1436-1441, 1972.

FOEY, A.D., CRAWFORD, A. e HALL, N.D. Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na, K-ATPase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 355, p. 43-49, 1997.

FOLCO, G.; MURPHY, R. C. Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 375- 388, 2006.

FONTES, C. *et al.* Stimulation of ouabain binding to Na,K-ATPase in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na,K-ATPase preparations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 366, p.215-223. 1999.

FORTH, W.; MARTIN; PETER, K. The relief of pain. **Hoechst medication Up-Date**. Munich: Hoechst, 1986.p. 6- 107.

FRANGOIANNIS, N.G. *et al.* IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 2798-2808, 2000.

GARCIA, A.G., KIRPEKAR, S.M. Inhibition of Na, K-activated ATPase and release of neurotransmitters. **Nature**, v. 257, 722, 1975.

GARDNER, D.G.; BROWN, E.M.; AURBACH, G.D. Inhibition of parathyroid hormone release from dispersed bovine cells by ouabain. **Metabolism**, v. 32, 355-358, 1983.

GEERING, K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.33, p.425-438, 2001.

GEERING, K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v.17, p.526-32, 2008.

GENAZZANI, A; PETRAGLIA, F. Opioid control of teutinizing hormone secretion in humans. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 33, p. 751-755, 1989.

GENG, Y. *et al.* Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. **The Journal of Immunology**, v.155, p.796–801, 1995.

GERSHON, M. D.; TACK, J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. **Gastroenterology**, v. 132, p. 397- 414, 2007.

GHOSH, S. *et al.* NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Reviews Immunology**, v. 16, p. 225–260, 1998.

GILROY, D. W. *et al.* Inflammatory solution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews**, v.3, p.104 – 416, 2004.

GLYNN, I. M. Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. **The Journal of physiology**, v.462, p.1-30, 1993.

GOLDSTEIN, A; NAIDU, A. Multiple opioid receptors: Ligand selectivity profiles and binding site signatures. **Molecular Pharmacology**, v. 36, p. 265-272, 1989.

GOETZL, E.J. *et al.* Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. **The FASEB Journal**, v.9, p.1051–1058, 1995.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, p. 927–930, 2002.

GOTO, A *et al.* Stress-induced elevation of ouabain like compound in rat plasma and adrenal. **Hypertension**, v. 26, p.1173–1176, 1995.

GOULET, J. L. *et al.* E-Prostanoid-3 Receptors Mediate the Proinflammatory Actions of Prostaglandin E2 in Acute Cutaneous Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 1321- 1326, 2004.

GUENOT, M. *et al.* Single-unit analysis of the spinal dorsal horn in patients with neuropathic pain. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v.20:143-150, 2003.

GUZIK, T.J.; KORBUT. R.; ADAMEK-GUZIKT. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 469-487, 2003.

GREGORY, C.D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v.12, p. 27–34, 2000.

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

HAAS, H.; PANULA P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, p. 121– 130, 2003.

HADLEY, T.J.; PEIPER, S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v. 89, p. 3077–3091, 1997.

HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacology and Therapeutics**, v.56, p.131-190, 1992.

HALL, J.M.; GEPPETTI, P. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 26, p. 17-26, 1995.

HAMID, H. *et al.* Effect of ouabain on sodium pump alpha-isoform expression in an animal model of mania. v. 33, p.1103-1106, 2009.

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

HAMLYN, J.M. *et al.* 11-hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: multiple implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 685-93, 2003.

HANDY, R.L.; MOORE, P.K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **British Journal of Pharmacology**, v.123, p. 1119–1126, 1998.

HANSEN, O. No evidence for a role in signal-transduction of Na⁺/K⁺ ATPase interaction with putative endogenous ouabain. **European Journal of Biochemistry**, v.270, p. 1916–1919, 2003.

HARRIS, S.G. *et al.* Prostaglandins as modulators of immunity. **TRENDS in Immunology**, v.23 p.144-150, 2002.

HEMPEL, S.L., MONICK, M.M HUNNINGHAKE, G.W. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.93, p.391–396, 1994.

HINSON, J. P., DAWNAY, B. e RAVEU, P. W. Why we should give a qualified welcome to ouabain: a whole new family of adrenal steroid hormones? **Journal of Endocrinology**. 146: 369-372, 1995.

HINSON, J. P.; HARWOOD, S.; DAWNAY, A. B. Release of ouabain-like compound (OLC) from the intact perfused rat adrenal gland. **Endocrine Research**, v.24, p.721-724, 1998.

HARWOOD, S.; YAQOUB, M.M. OUABAIN-INDUCED CELL SIGNALING. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 2011-2017, 2005.

HILEMAN, S.M., JACKSON, G.L. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone secretion by testosterone in male sheep. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v.54, 231-242. 1999.

HILL, S.J. *et al.* International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 49:253-78, 1997.

HINSON, J. P.; DAWNAY, B.; RAVEU, P. W. Why we should give a qualified welcome to ouabain: a whole new family of adrenal steroid hormones? **Journal of Endocrinology**. v.146, p. 369-372, 1995.

HOFFMAN, J. F. The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. **American Journal of Medicine**, v. 41, p.666-680, 1966.

HOSSEINZADEH, H., YOUNESSI, H.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. **BMC Pharmacology**, v. 430, p. 2- 7, 2002.

HUANG, B.S.; LEENEN, F.H. Brain "Ouabain" and Angiotensin II in Salt-Sensitive Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 28, p.2005-2012,1996.

HUANG, L., LI, H., XIE, Z. Ouabain-Induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expressions of several late response genes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, p. 429-437, 1997.

HURST *et al.* TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1 β and caspase-1 in monocytes and dendritic cells. **Immunobiology**, v. 214, p. 683–691, 2009.

HYUN-SOOK, Y. *et al.* Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: A rat model for mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, 888–894, 2010.

IANARO, A. *et al.* A nitric oxide inhibitor reduces inflammation, down regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. **Immunology**, v. 82, p. 370–375, 1994.

ISAEV, N.K., *et al.* Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. **Neuroscience Letters**, v. 31, p. 41-44, 2000.

JACOBSON, J.R., GARCIA, J.G. Novel therapies for microvascular permeability in sepsis. **Current Drug Targets**, v. 8, p.509–514, 2007.

JANEWAY, C.A., JR ; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review Immunology**, v. 20, 197–216, 2002.

JAMALIA, A. *et al.* Naloxone, an opioid receptor antagonist, enhances induction of protective immunity against HSV-1 infection in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v.43 p. 217–223, 2007.

JANSSEN, P.A.J., NIEMEMEGEREERS, C.J.E., DONY, G.H. The inhibitory effects of fentanyl and other morphine-like analgesic on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats, **Arzneimittel Forschung - Drug Research**, v. 13, p. 502–507, 1963.

JOHNSON, G. B. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 5233–5239, 2002.

JORGENSEN, P.L., ANDERSEN, J.P. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. **The Journal of Membrane Biology**, v. 103, p. 95–120, 1988.

JORGENSEN, P.L.; HÅKANSSON, K.O.; KARLISH, S.J.D. Structure and mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 817-849, 2003.

JULIUS, D., BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203 – 210, 2001.

JUTEL, M. *et al.* Immune regulation by histamine. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p.735–740, 2002.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Histamine in chronic allergic responses. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.15, p.1-8, 2005.

KARIK' O, K. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 12542–12550, 2004.

KAPLAN J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 511 535, 2002.

KAY, A.B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 30–37, 2001.

KAYSER, V. *et al.* Mechanical, Thermal and Formalin-induced Nociception is Differentially Altered in 5-HT1A^{-/-}, 5-HT1B^{-/-}, 5-HT2A^{-/-}, 5-HT3^{-/-} and 5-HT^{-/-} Knock-out Male Mice. **Pain**, v. 130, p. 235- 248, 2007.

KIM, S. *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. **Nature**, v. 457, p. 102–106, 2009.

KOO, P.J.S. Acute Pain Management. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 16, p. 4:231–248, 2003.

KOMETIANI, P. *et al.* Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p.15249-15256, 1998.

KOSTER, R., ANDERSON, M. DEBBER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 411-414, 1959.

KUBES, P., KANWAR, S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. **The Journal of Immunology**, v. 152, p. 3570-3577, 1994.

KUSTER, B. *et al.* A new variant of the gamma subunit of renal Na,K-ATPase. Identification by mass spectrometry, antibody binding, and expression in cultured cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.18441-46, 2000.

LAGO, J. *et al.* Ouabain- induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by protein phosphorylation and intracellular pH. **Cellular Signalling**, v. 13, p. 515-524, 2001.

LANDMANN, R., MULLER, B., ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 295-304, 2000.

LAREDO, J.; HAMILTON, B.P.; HAMLYN, J.M.. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 135, p. 794 -797, 1994.

LAREDO, J. *et al.* Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension**. v. 29, p. 401-407, 1997.

LAVOIE, L. *et al.* The molar ratios of a and b subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. **Biochemistry**, v.36, p. 7726-7732, 1997.

LEADBETTER, E. A. *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. **Nature**, v. 416, p. 603-607, 2002.

LEE, T.J., GOTLIEB, A.I. Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, 115-127, 2003.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, 601-606, 1969.

LI, J. *et al.* Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney **NATURE COMMUNICATIONS**, v. 1, p.1-7, 2010.

LICHTSTEIN, D.*et al.* Biosynthesis of digitalis-like compounds in rat adrenals cells: hydroxycholesterol as possible precursor. **Life Sciences**, v. 23, p. 2109- 2126, 1998.

LICHTSTEIN, D. *et al.* Digitalis and digitalislike compounds down-regulate gene expression of the intracellular signaling protein 14-3-3 in rat lens. **Hypertension Research**, v. 23, p.51-53, 2000.

LIEBESKIND, J.C. *et al.* Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observation and inhibitory effects on spinal cord interneurons. **Brain Research**, v. 50, p. 441-446, 1973.

LIM, H. *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. **Cell**, v.91, p.197- 208, 1997.

LINDER, A. E. *et al.* Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 323, n. 2, p. 415- 421, 2007.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER., T. Na¹,K¹-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.19659–19662, 1994.

LISTER, R.G., The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, **Psychopharmacology**, v.92, p.180–185, 1987.

LIU, J. *et al.* Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 27, p. 27838–2784, 2000.

LMAUVIEL, A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.53: 288–295, 1993.

LO, W.W., FAN, T.P. Histamine stimulates inositol phosphate accumulation via the H1-receptor in cultured human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 148, p. 47–53, 1987.

LOESER, J.D., MELZACK, R. Pain: an overview. **LANCET**, v. 353, p.1607 - 1609, 1999.

LOESER, J.D. Pain and suffering. **The Clinical Journal of Pain**, v.16, p. S2 - S6, 2000.

LOH, H. SMITH, A. Molecular characterization of opioid receptors. **Annual Review of Pharmacology**, v. 30, p. 123-170, 1990.

MACGLASHAN, D. Jr. Histamine: a mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.112, p. S53–S59, 2003.

MALFAIT, A.M. *et al.* The β_2 -Adrenergic Agonist Salbutamol Is a Potent Suppressor of Established Collagen-Induced Arthritis: Mechanisms of Action. **The Journal of Immunology**, v.162, p.6278-6283, 1999.

MAGGI, R. *et al.* Inhibition of leutinizing hormone-releasing hormone secretion by delta-opioid agonists in GT1-1 neuronal cells. **Endocrinology**, v. 136, p. 5177-5181,1995.

MANN *et al.* Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase. **Endocrinology**, v. 142, p. 5059–5068, 2001.

MARIOTTI, A. A primer on inflammation. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v.25, p.7-15, 2004.

MARTIN, W.R. Pharmacology of opioids. **Pharmacological Reviews**, v. 35, p. 283-303, 1983.

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.

MATSUMOTO, T. *et al.* Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. **Laboratory Investigation**, v. 77, p. 119–125, 1997.

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

MALIK, N. *et al.* Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.22754-22758,1996.

McDONOUGH, A. A.; GEERING, K.; FARLEY, R. A. The sodium pump needs its beta subunit. **FASEB Journal**, v.4, p.1598-605, 1990.

MEDEIROS, M.V. *et al.* Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenan in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, p.109–114, 1995.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature Review**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR., C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, no. 5566, p. 298–300, 2002.

MENKE, J.G. *et al.* Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 21583-21586, 1994.

MEHTA, D.; MALIK, A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological Reviews**, v.86, p. 279–367, 2006.

MICHEL, C. C.; CURRY, F. E. Microvascular Permeability. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 703- 761, 1999.

MIDWOOD, K. *et al.* Tenascin- C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Medicine*, v. 15, p. 774–780, 2009

MILLAN, M.J. THE INDUCTION OF PAIN: AN INTEGRATIVE REVIEW. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p.1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v.66, p.355-474, 2002.

MILLER, E.J, COHEN, A.B, MATTHAY, M.A. Increased interleukin- 8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. **Critical Care Medicine**, v.24, p. 1448–1454, 1996.

MILLER, S. B. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, p. 37- 49, 2006.

MIZUMURA, K. *et al.* Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? **Experimental Brain Research**, v. 196, p. 53–65, 2009.

MOHD, S.H.; LEWIS, D.A. Anti-inflammatory action of drugs that raise adenosine-3',5'-cyclic monophosphate and putrescine levels in-vivo, **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 36, p. 760-762, 1984.

MONCADA, S., PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p.109-142, 1991.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative & Physiological Psychology**, v. 48, p. 254–260, 1955.

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

MOREAU, M.E. *et al.* The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99 p. 6–38, 2005.

MORITA, M. *et al.*, Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270 p. 10902–10908, 1995.

MOUSLI, M. *et al.* Interaction of substance P, compound 48/80 and mastoparan with the α subunit C-terminus of G protein. **Immunology Letters**, v. 25, p.355–357, 1990.

MOYA-GARCIA, A.A, MEDINA, M.A., SANCHEZ-JIMENEZ, F. Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. **Bioessays**. v. 27, p. 57–63, 2005.

NAKAE, S. *et al.* Interleukin- 1β , but not interleukin- 1α , is required for T-cell-dependent antibody production. **Immunology**, v.104, p. 402–409, 2001.

NAKAMURA, T.; UI, M. Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. A possible involvement of the toxin-specific substrate in the Ca^{2+} -mobilizing receptor-mediated biosignaling system. **The Journal of Biochemistry**, v. 260, p. 3584–3593, 1985.

NARAYANAN, N. *et al.* Antipyretic, antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Premna herbacea* roots. **Fitoterapia**, v.71, p.147-153, 2000.

NARUMIYA, S. Prostanoid receptors. Structure, function and distribution. **The New York Academy of Sciences**, v. 744, p.126–138, 1994.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**, v.79, p.1193-1226, 1999.

NASCIMENTO, C.R. **Estudo da diferenciação e ativação de células dendríticas humanas *in vitro***. Rio de Janeiro, 2009. Tese (doutorado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 169 p.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature – insight review Articles**, v. 420, p.846 – 852, 2002.

OKAZAKI, T. *et al.*, Inhibition of antigen induced histamine release by ouabain. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 57, p. 454–462, 1976.

OLEJ, B. *et al.* Ouabain Induces Apoptosis on PHA-Activated Lymphocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, v.16, p.769-774, 1994.

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

OLIVEIRA, F.S. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E TOXICOLÓGICA DE (-)-HIDROXIDIIDROCARVONA EM ROEDORES**. João Pessoa, 2009. Tese (doutorado), Universidade Federal da Paraíba, 120 p.

OMOTE, K. *et al.* Peripheral nitric oxide in carrageenan-induce inflammation. **Brain Research**, v. 912, p.171–175, 2001.

ORLOV, S.N *et al.* Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. **The Journal of Biological Chemistry**, v.4, p.16545-16552, 1999.

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

PANGBURN, M.K.; RAWAL, N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. **Biochemical Society Transactions**, v.30, (part 6), p. 6–10, 2002.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149–167, 1985.

PENG, M. *et al.* Partial inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain induces the Ca²⁺-dependent expressions of early response genes in cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 26, p. 10372-10378, 1996.

PENG, L., P. MARTIN-VASALLO E K. J. SWEADNER. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. **The Journal of Neuroscience**, v.17, p.3488-502, 1997.

PERKINS, M.N. CAMPBELL, E. DRAY, A. Anti-nociceptive activity of the B1 and B2 receptor antagonists des Arg⁹Leu⁸Bk and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 53, p.191-197, 1993.

PILBEAM, C. C. *et al.* Differential effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultured bone cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 1198-1203, 1997.

PHIPPS, R.P. *et al.* A new view of prostaglandin-E regulation of the immune response, v.12, **Immunology Today**, p. 349–352, 1991.

PORRECA, F., OSSIPOV, M.H, GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neuroscience**, v. 25, p. 319 – 325, 2002.

POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331 – 338, 2004.

PRESSLEY, T. A. Structure and function of the Na, K pump: ten years of molecular biology. **Mineral and electrolyte metabolism**, v.22, p.264-271, 1996.

QUASTEL, M.R.; KAPLAN, J.G. Inhibition by Ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin in vitro, **Nature**, v. 219, p. 198 – 200, 1968.

QIU, L.Y. *et al.* Phe783, Thr797, and Asp804 in transmembrane hairpin M5-M6 of Na⁺,K⁺-ATPase play a key role in ouabain binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.47240-47244, 2003.

RAJASEKARAN, S.A RAJASEKARAN, A.K. Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 2130-2148, 2009.

RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: Wall PD, Melzack, eds. **Textbook of Pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p. 58-78.

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Advanced Critical Care**, v.15, p.3-17, 2004.

REN, K., DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**, v.16, p.1267–1276, 2010.

REPKE, K. R; SCHON, R. Role of protein conformation changes and transphosphorylations in the function of Na⁺/K⁺- transporting adenosine triphosphatase: an attempt at an integration into the Na⁺/K⁺ pump mechanism. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 67, p. 31–78, 1992.

RICHARDSON, J.D.; VASKO, M.R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 30, p.839 – 845, 2002.

RITTNER, H.L.; BRACK, A.; STEIN, C. Pain and the immune system. **British journal of anaesthesia**, v. 101, p. 40–44, 2008.

ROCHA e SILVA, M. A brief history of inflammation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. VANE, J.R. e FERREIRA, S.H. (eds.), Springer, v. 50, p.6-25, 1978.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 52, p. 297–303, 1995.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. *et al.* CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sciences**, v. 73, p. 1037-1051, 2003.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DOS SANTOS, N.F.; RUMJANEK, V.M. Synergistic Effect Between Ouabain and Glucocorticoids for the Induction of Thymic Atrophy. **Bioscience Reports**, v. 26, p.159–169, 2006.

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

RODRIGUES-MASCARENHAS, *et al.* MODULATION OF THE IMMUNE SYSTEM BY OUABAIN. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1153, p.153-163, 2009.

ROELOFS, M. F. *et al.* Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 7021–7027, 2006.

ROY, S.; LOH, H. Effects of opioids on the immune system. **Neurochemical Research**, v. 21, p. 1375- 1386,1996.

RUEFF, A. *et al.* Regulation of bradyinin sensitivity in peripheral sensory fibres of the neonatal rat by nitric oxid and cyclic GMP. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1139-1145, 1994.

SACHS, G.; MUNSON, K. D. Mammalian phosphorylating ion-motiveATPases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 3, p. 685–694, 1991.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 90, p.7240-7244, 1993.

SAPIA, L.*et al.* Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.49, p.459-468, 2010.

SASAKI, M. *et al.* Antinociception with Intrathecal alpha-Methyl-5-Hydroxytryptamine, a 5-Hydroxytryptamine2A/ 2C Receptor Agonist in Two Rat Models of Sustained Pain. **Anesthesia & Analgesia**, v. 96, p. 1072- 1078, 2003.

SATO, T. *et al.*, Involvement of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in osteoclast-like cell formation induced by interleukin-1 beta. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.11, p.392–400,1996.

SATOH, E.; NAKAZATO, Y. On the mechanism of ouabain induced release of acetylcholine from synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v. 58:1038-1044, 1992.

SAVEGNAGO, L. ESTUDOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO DISSELENETO DE DIFENILA EM CAMUNDONGOS. 172f. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Santa Maria.

SCHAEFER, L. *et al*, The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 2223–2233, 2005.

SCHEINER-BOBIS, G.; SCHONER, W. A fresh facet for ouabain action. **Nature Medicine**, v. 7, p.1288-1289, 2001.

SCHAFER, M.; MARTIN, R. Opioid peptides in the pituitary: a hormone, a panacrine modulation and a peptide in search of function. **Biological Chemistry**, v. 375, p. 737-740, 1994.

SCHONER, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 108, p.449–454, 2000.

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

SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. Initiation of the inflammatory response and its preserved. In: BONTA, I. L.; BRAY, M. A.; PARNHAM, M. J. (Eds). **Handbook of inflammation**. New York: Elsevier, 1985. p. 27-47.

SEDIVEC, M.J. *et al.* Increase in nociceptive input to spinocervical tract neurons following chronic partial deafferentation. **The Journal of Neuroscience**, v.3, p.1511-1519, 1983.

SENOL, M. *et al.* The effect of Na⁺-K⁺ ATPase inhibition by ouabain on histamine release from human cutaneous mast cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 294, p. 25–29, 2007.

SENYSHYN, J.; BAUMGARTNER, R.A.; BEAVEN, M.A. Quercetin sensitizes RBL-2H3 cells to polybasic mast-cell secretagogues through increased expression of Gi GTP-binding proteins linked to a phospholipase C signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v.160, p. 5136–5144, 1998.

SHAH, J. R. *et al.* Different signaling pathways mediate stimulated secretions of endogenous ouabain and aldosterone from bovine adrenocortical cells. **Hypertension**, v. 31, p.463-468, 1998.

SHAMRAJ ,O.I.; MELVIN ,D.; LINGREL, J.B. Expression of Na,K-ATPase isoforms in human heart. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 179, p.1434–1440, 1991.

SHAMRAJ, O.I., LINGREL, J.B. A putative fourth Na,K-ATPase alphasubunit gene is expressed in testis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.12952– 12956, 1994.

SHATZMANN, H. J. Herzglykoside als Hemmstoffe fuer den aktiven Kal-iumund Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. **Helvetica Physica Acta**, v.11, p. 346-360, 1953.

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

SHYJAN, A. W. *et al.* Differential expression and enzymatic properties of the Na⁺,K⁺-ATPase α 3 isoenzyme in rat pineal glands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p. 1178–1182, 1990.

SIMON, E. Opioid receptors and endogenous opioid peptides. **Medicinal Research Reviews**, v. 11; p. 357-374, 1991.

SKOU, J.C. The influence of some cation on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 23, p.394-401, 1957.

SKOU, J.C. Further investigations on a Mg⁺⁺, Na⁺-activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.42, p. 6-23, 1960.

SKOU, J.C. The fourth Datta lecture: the energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁺-pump. **FEBS Letters**, v. 268, p. 314-324, 1990.

SKOU, J. C., ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, p. 249–261, 1992.

SMART, D. LAMBERT, D. The stimulatoty effects of opioids and their possible role in the developmente of tolerance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 264-269, 1996.

SMITH, W. L., DeWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Advanced Immunology**, v.62, p.167-215, 1996.

SMITH, W.L., DEWITT, D.L., GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v.69, p.146-182, 2000.

SOPHOCLEOUS, A.; ELMATZOGLOU, I.; SOUVATZOGLOU, A. Circulating endogenous digitalis-like factor(s) (EDLF) in man is derived from the adrenals and its secretion is ACTH-dependent. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, p. 668-74, 2003.

STEIN, C.; GRAMSCH, Q. C.; HERZL, A. Intrinsic Mechanisms of Antinociception in Inflammation: Local Opioid Receptors and μ Endorphin. **The Journal of Neuroscience**, v.1, p. 1292-129, 1990.

STENGELIN, M.K.; HOFFMAN, J.F. Na,K-ATPase subunit isoforms in human reticulocytes: evidence from reverse transcription-PCR for the presence of α 1, α 3, β 2, β 3, and γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 5943–5948, 1997.

STERANKA, R.R. *et al.* Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 3245-3249, 1988.

STOECK, M., NORTHOFF, H.; RESCH, K. Inhibition of mitogen-induced lymphocyte proliferation by Ouabain: interference with interleukin 2 production and interleukin 2 action. **The Journal of Immunology**, v. 131, p. 1433 – 1437, 1983.

SU, F. *et al.* Involvement of Na^+ , K^+ -ATPase and its inhibitors in HuR-mediated cytokine mRNA stabilization in lung epithelial cells. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 109-124, 2011.

SURAPISITCHAT, J. *et al.* Differential Regulation of Endothelial Cell Permeability by cGMP via Phosphodiesterases 2 and 3. **Circulation Research**, v. 12, p. 811- 818, 2007.

SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **Journal of Pharmacobiodynamics**, v. 8, p. 565 – 575, 1981.

SZAMEL, M.; RESCH, K. Inhibition of lymphocyte activation by ouabain. Interference with the early activation of membrane phospholipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 647, p.297-301, 1981.

SZAMEL, M. *et al.* Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1235, p.33-42, 1995.

SZEBERENYI, J.B. *et al.* Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. **Immunology Letters**, v. 76, p. 175–182, 2001.

SWEADNER, K.J.; RAEL, E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. **Genomic**, v. 68, p.41–56, 2000.

SWEADNER, K.J. *et al.* FXYD proteins as regulators of the Na,K-ATPase in the kidney. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p.382–387, 2003.

SWEADNER, K.J. Phospholemman: a new force in cardiac contractility. **Circulation Research**, v. 97, p. 510–511, 2005.

TAKAHASHI, R.N.; PAZ, M.M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 607– 610, 1987.

TANAKA, T. *et al.* Helix content of G protein α subunit is decreased upon activation by receptor mimetics. **The Journal of Biochemistry**, v.273, p. 3247–3252, 1998.

TAUB, M. L. Regulation of the Na,K-ATPase activity of Madin-Darby canine kidney cells in defined medium by prostaglandin E1 and 8-bromocyclic AMP. **Journal of Cellular Physiology**, v.151, p. 337-346, 1992.

TERMEER, C. *et al.* Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 99–111, 2002.

THAYER, S.T. *et al.* Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. **Journal of Neuroscience**, v.8, p.4089-4097, 1988.

THERIEN, A.G. *et al.* Tissuespecific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na,KATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 32628–32634, 1997.

TIRUPPATHI, C. *et al.* Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability, **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 173– 185, 2003.

TJØLSEN, A., HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., M., editors. **The Pharmacology of Pain**. Berlin: Springer, 1997, p. 1 - 20,

TOBITA, T. *et al.* The effects of isoflurane on conditioned inhibition by dorsal column stimulation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, p. 436-441, 2003.

TOMITA, U. *et al.* Direct interactions of mastoparan and compound 48/80 with GTP-binding proteins. **The Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 184–189, 1991.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 44, p. 463–469, 1993.

UDEGBUNAM, R.I. *et al.* Anti-Nociceptive, Anti-inflammatory and Anti-Oxidante Effects of the Methanol Leaf Extract of *Sterculia tragacantha* Lindl. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, p. 516-524, 2011.

URBAN, L., NAG, I. Is there a nociceptive carousel? **Trends in Pharmacological Sciences**. v.18, p.223 - 224, 1997.

VABULAS, R. M. *et al.* HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15107–15112, 2002.

VABULAS, R. M. *et al.* The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 20847–20853, 2002.

VALENTE, C. R. *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 HINSBERGH, V. W. M.; AMERONGEN, G. P. van N. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. **Journal of Anatomy**, v. 200, p. 549- 560, 2002.

VANEGAS H; SCHAIBLE, H. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 327 – 363, 2001.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 295 – 309, 2004.

VARMA, T.K. *et al.* Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.530–543, 2002.

VAZ, Z.R. *et al.* Antinociceptive action of 2- β -4-bromobenzoyl-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyl derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p.304–312, 1996.

VERGE, V.M.K. *et al.* Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 11617-11621, 1992.

VIKMAN, K.S. *et al.* A two-compartment in vitro model for studies of modulation of nociceptive transmission. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 105, p. 175-184, 2001.

VILELA-FILHO, O. Dor: anatomia funcional, classificação e fisiopatologia. **Jovem Médico**, v. 2, p. 125-132, 1998.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96 – 103, 1969.

VOLLMER, J. *et al.* Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1575–1585, 2005.

VYAS, S.; MARCHBANKS, R.M. The effect of ouabain on the release of [¹⁴C] acetylcholine and other substances from synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v. 37, p.1467-1474, 1981.

WANG J.M. *et al.* Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 28, p. 83–90, 1998.

WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **The Journal of Physiology**, v.188, p.403 – 423, 1967.

WHEELER, D. S. *et al.* Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. **Respiratory Research**, v. 10, p. 31, 2009.

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

WILLIS, A.L. Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 21, p.126-128, 1969.

WINTER, C.A., RISLEY E.A., NUSS, G.W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.11, p. 544–547, 1962.

WITHE RING, W. An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. London: G.G .J . & J.Robinson, 1785.

WOLLEMAN, M. Recent developments in the research of opioid receptor subtypes molecular characterization. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, p. 1095-1101, 1990.

WOO, A.L.; JAMES, P.F.; LINGREL, J.B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. **The Journal of biological chemistry**, v. 275: 20693–20699, 2000.

WOOLFE , G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300–307, 1944.

XIE, Z.; ASKARI, A. Na⁺K⁺ATPase as a signal transducer. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p.2434-2439, 2002.

YAKSH, T.L.; WILSON, P.R. Spinal serotonin terminal systems mediate antinociception. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** , v. 208, p. 446-453, 1979.

YAMAKI, K. *et al.* Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 390–399,1998.

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

YOKOVAMA, H. The role of central histaminergic neuron system as an anticonvulsive mechanism in developing brain. **Brain & Development**, v.23, p.542–547, 2001.

ZENG, W. *et al.* Spinal antinociceptive action of Na⁺-K⁺ pump inhibitor ouabain and its interaction with morphine and lidocaine in rats. **Anesthesiology**, v. 90, p. 500–508, 1999.

ZENG, W.; CHEN, X.; DOHI, S. Antinociceptive Synergistic Interaction Between Clonidine and Ouabain on Thermal Nociceptive Tests in the Rat. **The Journal of Pain**, v. 8, p 983-988. 2007.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v.429, p.23-37, 2001.

ANEXOS

Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**CERTIDÃO**

João Pessoa, 06 de agosto de 2008

CEPA Nº. 0407/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadora: Profa. Dra. Sandra R. Mascarenhas

Departamento/Setor: LTF/UFPB

Ref.: Projeto de Pesquisa: "EFEITO MODULADOR DA OUABAÍNA NO SISTEMA IMUNOLÓGICO."

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,

Prof. Dr. DEMÉTRIUS ANTONIO MACHADO DE ARAÚJO
Presidente em Exercício do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

Research Article

Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Ouabain in Mice

Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos,^{1,2} Jacqueline Alves Leite,¹ Luciana Teles Carneiro,¹ Márcia Regina Piuvezam,^{1,2} Maria Raquel Vitorino de Lima,¹ Liana Clébia Lima de Moraes,¹ Vivian Mary Rumjanek,³ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58059-900, Brazil

²Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58059-900, Brazil

³Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

Correspondence should be addressed to Sandra Rodrigues-Mascarenhas, sandramascarenhas@ltf.ufpb.br

Received 23 November 2010; Revised 17 February 2011; Accepted 26 March 2011

Academic Editor: Muzamil Ahmad

Copyright © 2011 Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos 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.

Ouabain, an inhibitor of the Na^+/K^+ -ATPase pump, was identified as an endogenous substance of human plasma. Ouabain has been studied for its ability to interfere with various regulatory mechanisms. Despite the studies portraying the ability of ouabain to modulate the immune response, little is known about the effect of this substance on the inflammatory process. The aim of this work was to study the effects triggered by ouabain on inflammation and nociceptive models. Ouabain produced a reduction in the mouse paw edema induced by carrageenan, compound 48/80 and zymosan. This anti-inflammatory potential might be related to the inhibition of prostaglandin E₂, bradykinin, and mast-cell degranulation but not to histamine. Ouabain also modulated the inflammation induced by concanavalin A by inhibiting cell migration. Besides that, ouabain presented antinociceptive activity. Taken these data together, this work demonstrated, for the first time, that ouabain presented *in vivo* analgesic and anti-inflammatory effects.

1. Introduction

Ouabain, one of the oldest drugs used for treatment of cardiac insufficiency, is classically known as a specific inhibitor of the plasma membrane Na^+/K^+ -ATPase [1]. Originally isolated from plants, it was demonstrated that mammals naturally produce an endogenous analogue of ouabain, a hormone synthesized in the adrenal glands, hypothalamus, and pituitary and found circulating in the plasma [2–5]. Accumulating evidence suggests that circulating levels of endogenous ouabain are modulated by stress conditions. Elevated plasma levels of ouabain were found in hypertensive patients and after physical exercise in different species [6–8].

The steroid ouabain is capable of modulating many aspects of the immune system, being considered as an immunomodulatory molecule [9]. Ouabain, *in vitro*, inhibits mitogen-induced thymocyte and lymphocyte proliferation [10, 11], inhibits the generation of lymphokine-activated killer (LAK) activity induced by IL-2 [12], increases intracellular calcium levels [13], increases CD69 expression [14] and acts both *in vitro* [15] and *in vivo* [16] synergistically with corticoids. *In vitro*, ouabain increases glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization in lymphoid cells [9]. Besides that, ouabain downregulates mCD14 expression on monocytes, which is related to inflammatory response against several pathogens [17] and induces IL-1 β production on human mononuclear cells [18].

Additionally, this molecule is also capable of inducing the activation of various signal transduction cascades that are independent of changes in intracellular Na^+ and K^+ concentrations, involving the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR), and protein kinase C [17, 19–23]. In murine thymocytes, ouabain decreased the levels of phosphorylated MAPK p38 and nuclear factor of activated T-cells (NFATc1) induced by the mitogen concanavalin A [24].

Besides the effects described in the immune system, little is known about the role of ouabain in inflammatory processes. During inflammation, a complex program of intracellular signal transduction and transcription events, driven by multiple proinflammatory mediators and cytokines, is activated. The acute inflammation is characterized by exudation of protein-rich fluid, edema, vasodilatation, and cell migration, primarily neutrophils, into the site of injury [25]. It was reported that ouabain suppressed the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α stimulated with LPS both *in vitro* and *in vivo* [26]. In addition, cardiac glycoside drugs inhibits TNF- α /NF- κ B signaling pathway, which is a central common regulator for the process of inflammation [27].

The aim of the present study was to investigate the role of ouabain in acute peripheral inflammation induced by intraplantar and intraperitoneal injection of different phlogistic agents and in algic processes.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Female swiss albino mice (2 months old) were housed in a temperature-controlled room and received water and food *ad libitum*. After manipulation, euthanasia was employed by cervical dislocation. The study was performed according to the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals [28], after approval of protocol no. 0407/08 by the Institutional Ethics Committee of Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

2.2. Treatment with Ouabain. In all experiments, 0.56 mg/kg ouabain [16] or phosphate buffered saline (PBS) was given intraperitoneally (i.p.) for three consecutive days. A dose-response curve was also performed using 0.10 mg/kg and 0.31 mg/kg ouabain, and 0.56 mg/kg ouabain was given i.p. for one and two consecutive days.

2.3. Inflammatory Paw Edema. To induce inflammation, mice received subcutaneous injections in the plantar surface [29] of carrageenan (2.5%), compound 48/80 (2 μ g/paw), zymosan (1%), histamine (100 μ g/paw), prostaglandin E2 (5 μ g/paw), and bradykinin (6 nmol/paw) in 20 μ L of phosphate buffered saline (PBS) in the right (ipsilateral) hindpaw and 20 μ L of PBS in the left (contralateral) hindpaw. Captopril (5 mg/kg) was used 1 h prior to bradykinin challenge in order to prevent the action of kininases [30]. Ouabain last treatment was injected i.p. one hour before intraplantar injections of phlogistic agents. All the reagents were obtained from Sigma. Hindpaw edema was measured with a digital

micrometer (Instrutemp 070393611) [31] and is expressed as the difference of thickness (mm) between the stimulated and the saline-injected paw.

Dexamethasone (0.5 mg/kg), indomethacin (10 mg/Kg) and salbutamol (10 mg/kg) were used as antiinflammatory controls and injected i.p. or subcutaneous (s.c.) one hour before intraplantar injections.

2.4. Peritoneal Inflammation Model. Mice were injected intraperitoneally with 60 μ g Concanavalin A diluted in sterile saline solution to a final injection volume of 0.1 mL one hour after the last ouabain administration. After 24 h, animals were sacrificed and peritoneal lavage was performed with 10 mL of sterile PBS [32–34]. The fluid was removed for total and differential cell counts and results were reported as cell number/mL of peritoneal wash. Differentiation of leukocyte subpopulations in peritoneal lavage fluids was performed on cytopspin preparations stained with Wright-Giemsa solution (Sigma, St. Louis, Mo, USA). For each slide a minimum of 100 cells was counted microscopically under 1000 magnification.

2.5. Acetic Acid Induced Writhing Test. Acetic acid administration causes irritation resulting in painful contortions followed by extension of hind limbs [35]. The animals were injected i.p. with 0.1 mL/10 g of 0.8% (v/v solution) acetic acid one hour after the last treatment with ouabain (0.56 mg/kg). Morphine (6 mg/Kg) (i.p.) was used for analgesia. Ten minutes after the administration of acetic acid, mice were placed in separate boxes and the number of abdominal writhes was counted for 10 minutes. The antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal writhes when compared to control animals.

2.6. Hot Plate. Animals were placed on a hot plate maintained at $52 \pm 1^\circ\text{C}$. The time elapsed between placing the animal on the hot plate, and the animal either licking its fore or hind paws or jumping on the surface was considered the response latency [36]. Mice with baseline latencies of more than 15 s were excluded from the study. Response latency testing was measured 30, 60 and 120 minutes after the last treatment with Ouabain (0.56 mg/kg), saline or the positive control, morphine (10 mg/Kg). The cutoff time for the hot-plate test latency was set at 30 s to avoid tissue injury. All animals were brought to the test room at least 1 h prior to the experiments and were not tested more than once.

2.7. Possible Involvement of Opioid Receptors. In order to investigate the involvement of the opioidergic system in ouabain-induced antinociception, separate groups of mice were pretreated with nonselective opioid receptor antagonist, naloxone (5 mg/kg, s.c.), which was injected 15 min before i.p. administration of ouabain (0.56 mg/kg) and morphine (10 mg/kg, i.p.), and tested using the hot plate test [37].

2.8. Elevated Plus maze. The apparatus is comprised of two open arms (35×5 cm) and two closed arms ($30 \times 5 \times 15$ cm)

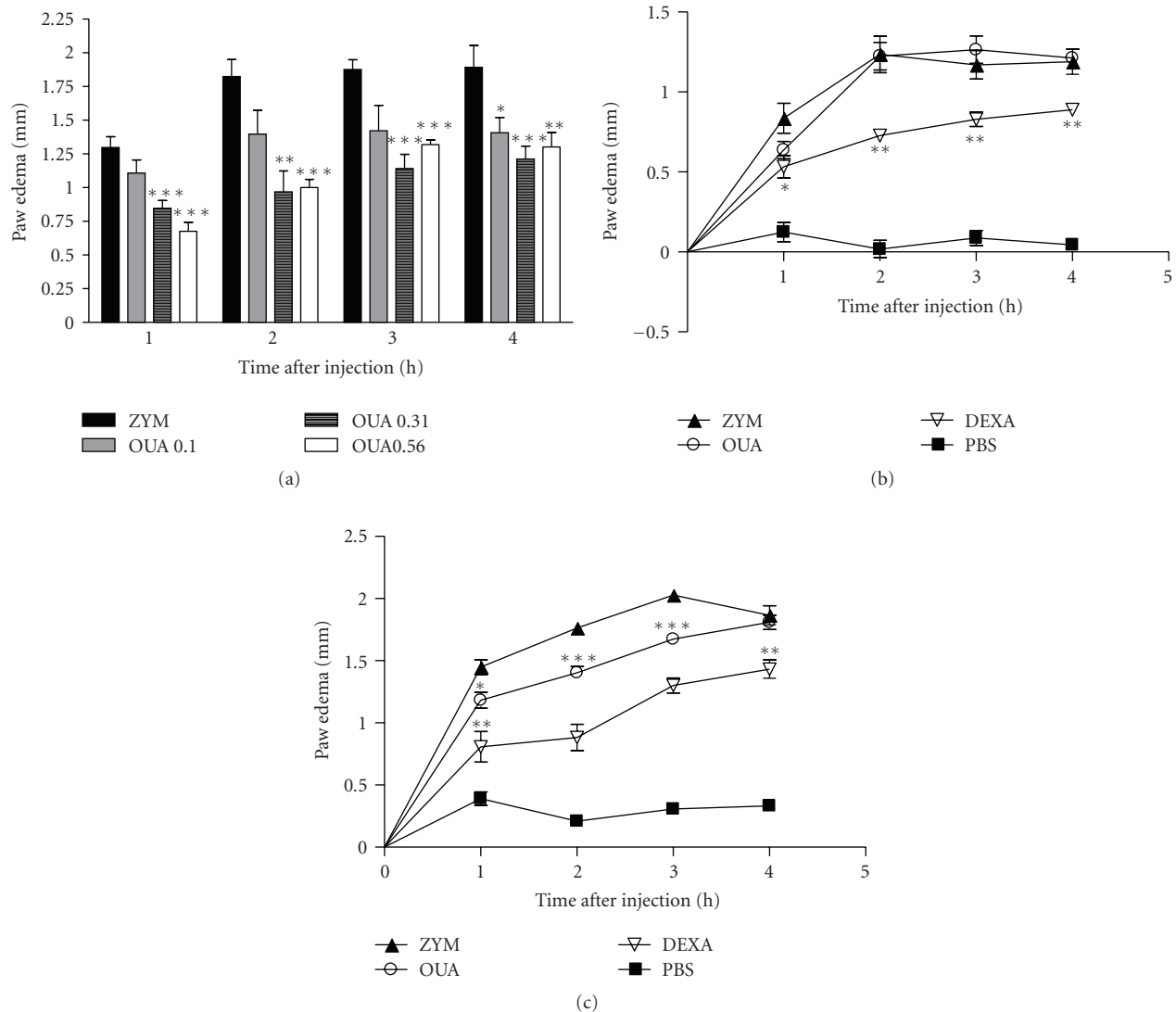


FIGURE 1: Ouabain dose-response curve and administration for 1 and 2 consecutive days. Mice were pretreated with 0.10 mg/kg, 0.31 mg/kg and 0.56 mg/kg ouabain for 3 consecutive days (a) or with 0.56 mg/kg ouabain for 1 (b) and 2 consecutive days (c); one hour after the last ouabain treatment, mice received intraplantar injections of zymosan in 20 μ L phosphate buffered saline (PBS) in the right hindpaw and 20 μ L of PBS in the left hindpaw. Each point represents the mean of eight animals. Dexametazone (DEXA, 0.5 mg/kg) was used as antiinflammatory control and injected i.p. one hour before intraplantar challenge. Asterisks denote the significance levels compared with ZYM group. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by unpaired test. **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001.

that extended from a common central platform (5 $\times$ 5 cm). The entire maze was elevated to a height of 30 cm above floor level [38]. One hour after ouabain administration, mice were placed in the central region of the plus-maze apparatus. Diazepam (0.5 mg/Kg) was administered 30 min before the test and used as positive control.

2.9. Statistical Analysis. All data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by unpaired test or ANOVA followed *Dunnett's* or *Mann Whitney test*, and the results were considered significant if *P* < .05.

3. Results

3.1. Effect of Ouabain on Carrageenan, Zymosan, and 48/80-Induced Mice Paw Edema. The paw edema induced by carrageenan and zymosan involves various mediators such as histamine, bradykinin, and prostaglandins [39, 40]. Although 0.10 mg/kg ouabain was without effect, 0.31 mg/kg and 0.56 mg/kg ouabain prevented zymosan edema formation (Figure 1(a)). On the other hand, ouabain was not able to inhibit zymosan-induced paw inflammation when administered only one day prior experiment (Figure 1(b)). Furthermore, when ouabain was given for two days prior experiment, it did not interfere in the edema present 4 h

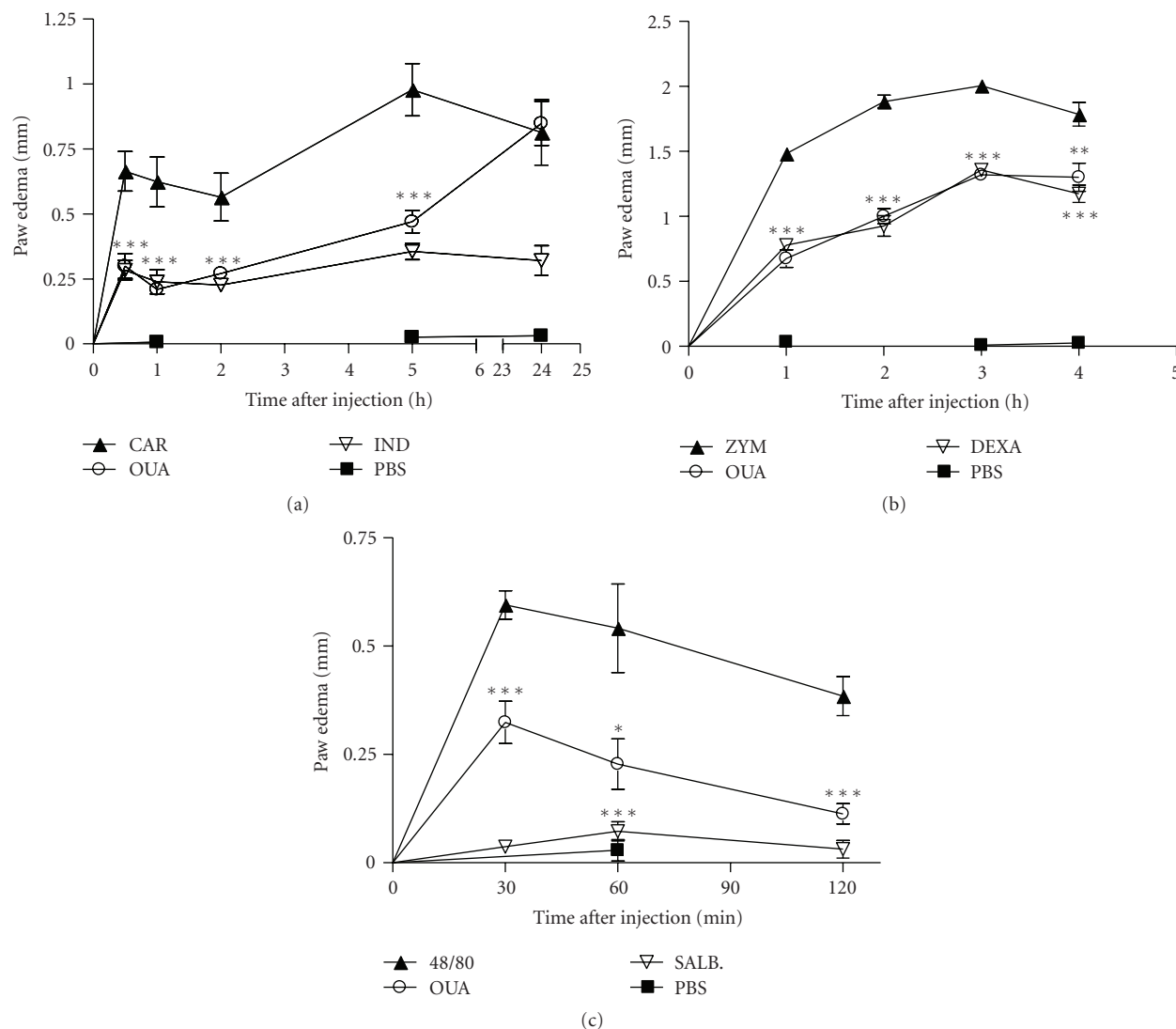


FIGURE 2: Effect of the pretreatment with Ouabain (OUA, 0.56 mg/kg) administered intraperitoneally on paw edema triggered by carrageenan (CAR), zymosan (ZYM), and compound 48/80 in mice. Mice received intraplantar injections of carrageenan (2.5%, (a)), zymosan (1%, (b)), or compound 48/80 (2 μ g/paw, (c)) in 20 μ L phosphate buffered saline (PBS) in the right hindpaw and 20 μ L of PBS in the left hindpaw. Each point represents the mean of eight animals. Indomethacin (IND, 10 mg/Kg), dexametasone (DEXA, 0.5 mg/Kg), and salbutamol (SALB, 10 mg/kg) were used as antiinflammatory controls and injected i.p. one hour before intraplantar challenge. Asterisks denote the significance levels compared with CAR, ZYM, or compound 48/80 group. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by unpaired test **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001.

after zymosan (Figure 1(c)). Ouabain 0.56 mg/kg injected for three consecutive days, prevented zymosan edema formation at the 1st (54.4%), 2nd (47.1%), 3rd (34.7%), and 4th h (26.9%) after treatment, as well as did 0.5 mg/kg dexamethasone (Figure 2(b)). Similarly to what was observed with zymosan, carrageenan-induced paw edema was also significantly reduced in a time-dependent manner by the treatment of 0.56 mg/Kg ouabain at 30 min (54.9%), 1st (66.4%), 2nd (51.0%), and 5 h (51.9%) after carrageenan treatment (Figure 2(a)). On the other hand, ouabain did not interfere in the edema present 24 h after carrageenan injection. A significant antiinflammatory effect of indomethacin at the dose of 10 mg/Kg was observed at all times studied. Paw

edema induced by compound 48/80 was short lasted, with a peak 30 min after injection. Ouabain significantly inhibited the edema, but to a lesser extent than salbutamol, at 30 (69.1%), 60 (79.7%), and 120 min (49.7%) after compound 48/80 injection (Figure 2(c)).

3.2. Effect of Ouabain on Paw Edema Triggered by Different Inflammatory Mediators. The results in Figure 3(a) indicate that ouabain was incapable to inhibit the edema induced by histamine at any of the times studied. On the other hand, the administration of ouabain produced a significant reduction in the mouse paw edema induced by prostaglandin E2 and bradykinin (Figures 3(b) and 3(c)). A significant antiedema

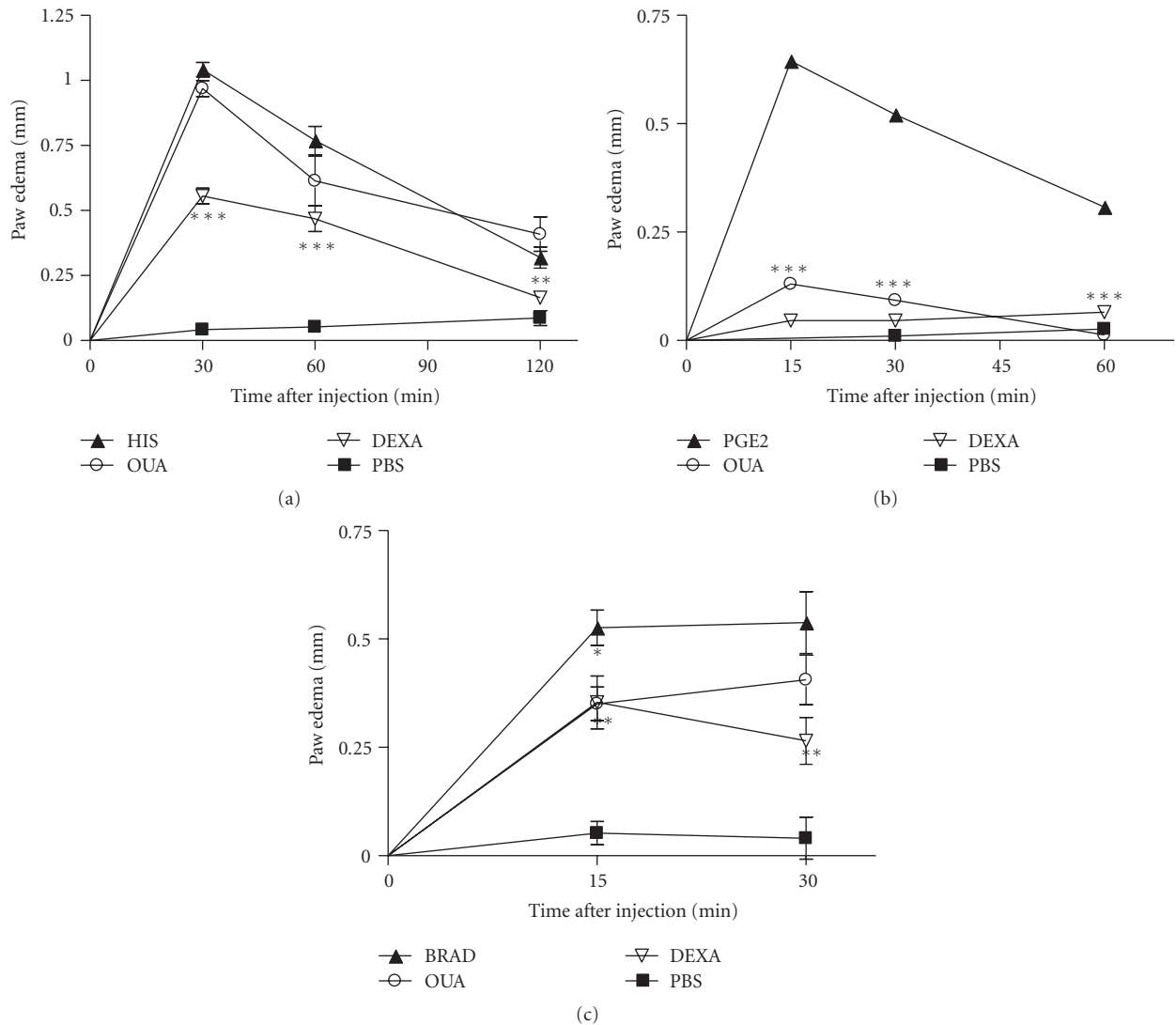


FIGURE 3: Effect of the pretreatment with Ouabain (OUA, 0.56 mg/kg) administered intraperitoneally on paw edema triggered by histamine (HIS), prostaglandin E2 (PGE2) and bradykinin (BRAD). Mice received intraplantar injections of histamine (100 μ g/paw, (a)), prostaglandin E2 (5 μ g/paw, (b)) or bradykinin (6 nmol/paw, (c)) in 20 μ L of phosphate buffered saline (PBS) in the right hindpaw and 20 μ L of PBS in the left hindpaw. Each point represents the mean of eight animals. Dexametasone (0.5 mg/kg) was used as antiinflammatory control and injected i.p. one hour before intraplantar challenge. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by unpaired test **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001.

effect of ouabain was observed at 15 (79.8%), 30 (82.1%) and 60 min (96.0%) after prostaglandin E2 challenge and at 15 (34.0%) but not at 30 min after bradykinin challenge.

3.3. Effect of Ouabain Treatment on the Cellular Influx into the Peritoneal Cavity. Peritoneal inflammation was induced and the number of cells recruited into the peritoneal cavity was measured as an indication of the degree of inflammation. As shown in Figure 4(a), the administration of ouabain alone had no effect on the number of resident peritoneal cells in unchallenged mice. However, after induction of inflammation, treatment with ouabain led to a 70%–80% reduction in the total cell numbers in the peritoneal cavity after 24 h, as a reflex of the inhibition of polymorphonuclear

leukocytes (Figure 4(b)). These data are consistent with an attenuated inflammatory response observed.

3.4. Effect of Ouabain on Acetic Acid-Induced Writhing Response. The results of acetic acid-induced writhing responses in mice, which indicate ouabain's analgesic activity, were presented in Figure 5(a). It was demonstrated that ouabain caused a significant inhibition (45%) on the writhing responses induced by acetic acid when compared to the control group, as well as did the analgesic drug, 6 mg/kg morphine (78%).

3.5. Effect of Ouabain on the Hot Plate Test and Involvement of Opioid Receptors. The results of the hot plate test revealed

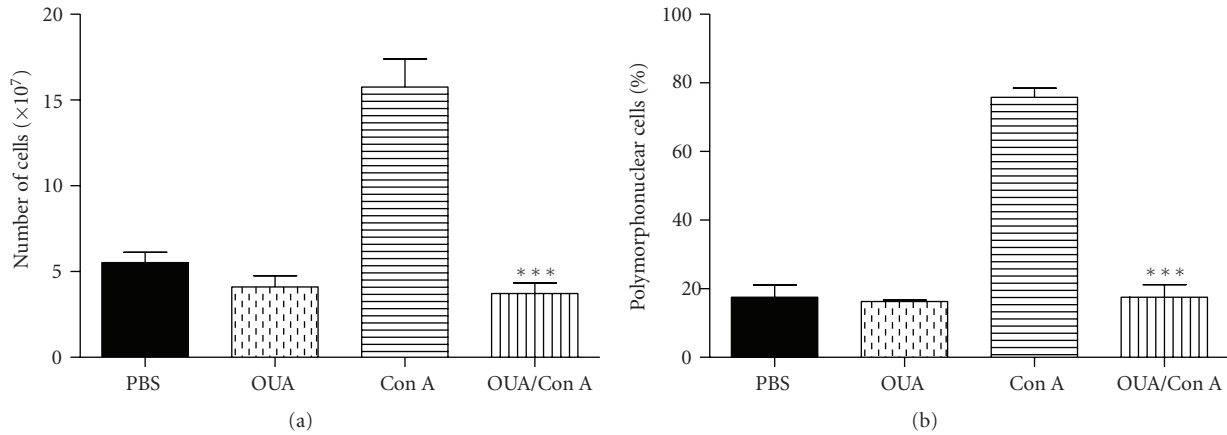


FIGURE 4: Effect of the pretreatment with Ouabain (OUA, 0.56 mg/kg) administered intraperitoneally on peritoneal inflammation triggered by Concanavalin A (ConA, 60 μ g/300 μ L) on total (a) and differential cell counts (b). Each bar represents the mean of nine animals. Asterisks denote the significance levels compared with Con-A values. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by unpaired test ***P* < .01 and ****P* < .001.

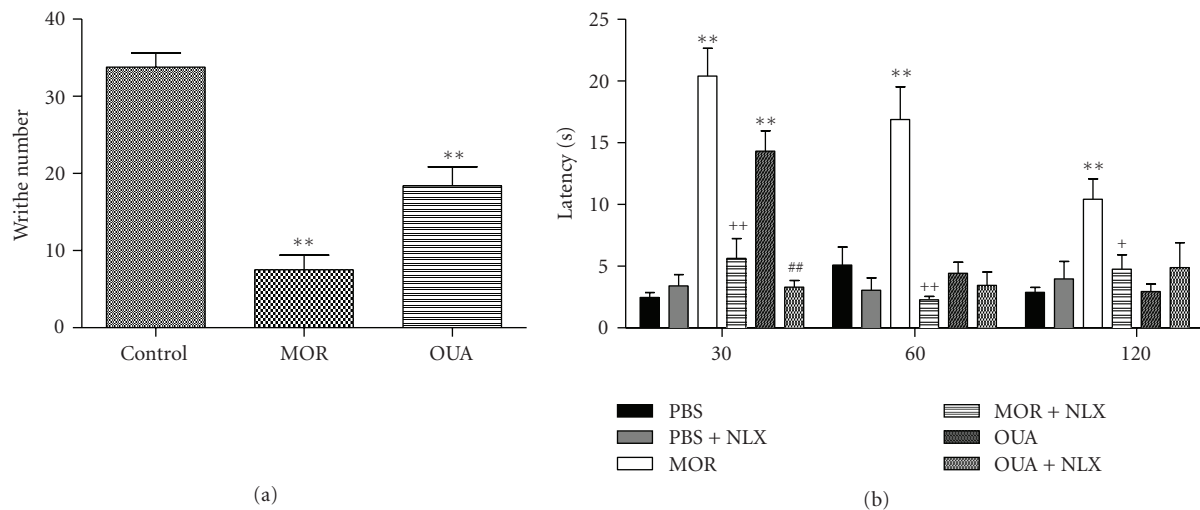


FIGURE 5: Effect of the pretreatment with Ouabain (OUA, 0.56 mg/kg) administered intraperitoneally on acetic acid-induced writhing and hot plate test in mice. Each bar represents the mean of six or ten animals. Morphine (MOR, 10 mg/kg) administered intraperitoneally was used for analgesia. Naloxone (NLX, 5 mg/kg), an opioid antagonist, was used to test the involvement of opioid receptors. Asterisks denote the significance level compared with control values; # compared with the Ouabain group and + compared with the morphine group. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using (ANOVA) followed *Dunnnett's test*. **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001.

that the latency time was increased (74%) when animals were tested 30 min after the last injection of ouabain. Pretreatment of mice with naloxone inhibited the antinociceptive effect triggered by ouabain (around 77%). On the other hand, ouabain was not capable to interfere in the latency observed after 60 or 120 min. The analgesic drug, morphine (10 mg/kg) modulated the pain, increased the latency time (more than 70%), and it was significantly reversed by naloxone (70%), (Figure 5(b)).

3.6. Effect of Ouabain on Elevated Plus-Maze Test. The results of the elevated plus maze test revealed that ouabain did not interfere in the numbers of entries in open arms but

increased the time spent (Figures 6(a) and 6(b)). Additionally, the number of visits was not modified, and the time spent in closed arms was decreased by ouabain (Figures 6(c) and 6(d)). Ouabain did not interfere in total number of entries (Figure 6(e)). The positive control (0.5 mg/Kg diazepam), increased the number total of entries as well the number of entries and the time spent in open arms and decreased the time spent in closed arms.

4. Discussion

In agreement with the immunosuppressive effects that have been previously observed, in the present work, ouabain

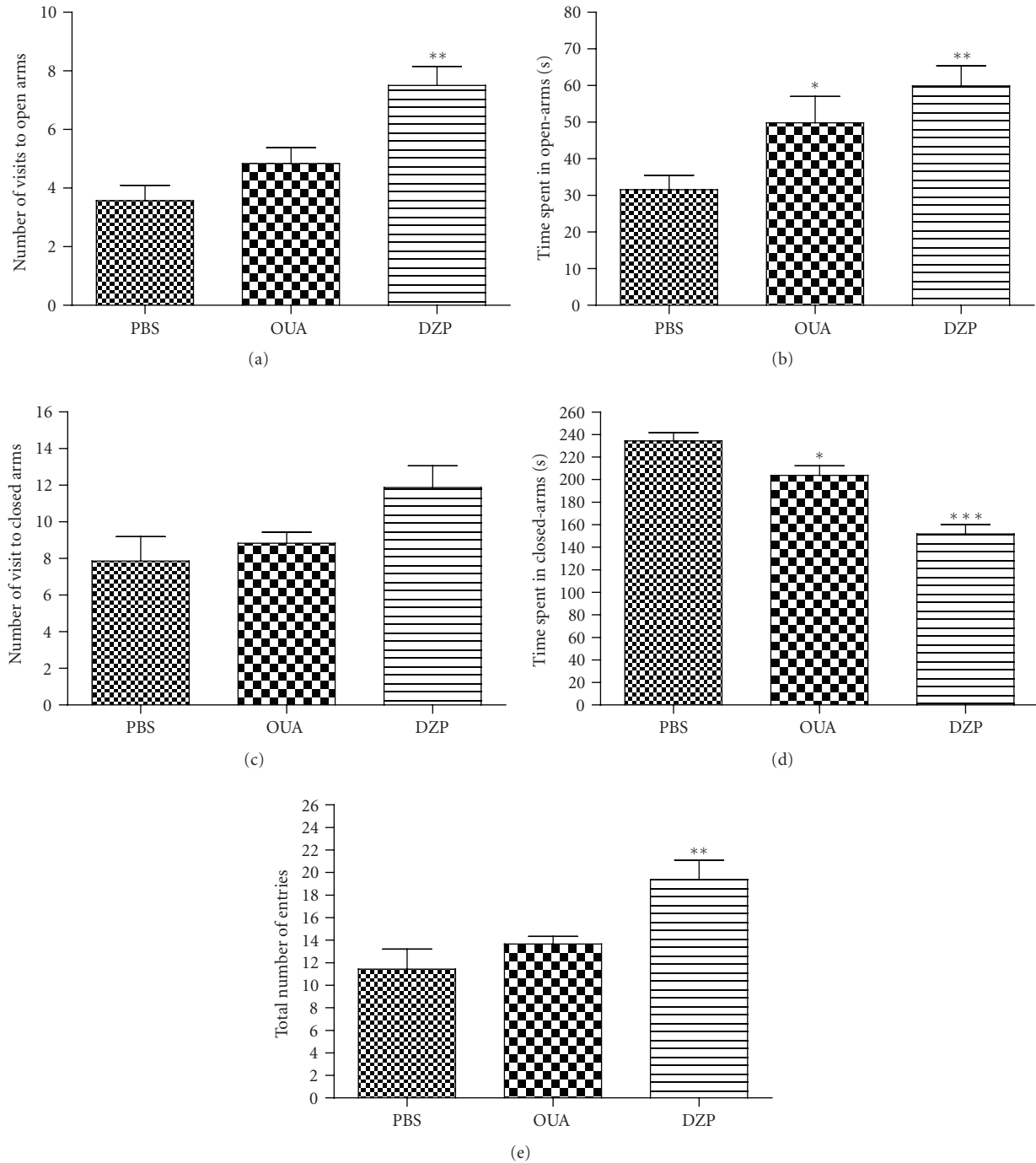


FIGURE 6: Effect of the pretreatment with Ouabain (OUA 0.56 mg/kg) administered intraperitoneally on elevated plus-maze test in mice. (a) Number of visit to open-arms; (b) Time spent in open-arms; (c) Number of visit to closed-arms; (d) Time spent in closed arms; (e) Total numbers entries. Each bar represents the mean of seven or eight animals. Diazepam (DZP 0.5 mg/Kg) was used as positive control. Data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using ANOVA followed Mann Whitney test or Student's *t*-test followed by unpaired test: * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$.

inhibited inflammation and nociception. To study the role of ouabain in the inflammatory process, initially we used the carrageenan and zymosan-induced paw edema. These models induce inflammatory responses, including edema formation, neutrophil infiltration, and the development of hyperalgesia [41].

Ouabain administered for three consecutive days was able to inhibit zymosan edema formation at all periods studied. On the other hand, ouabain was not able to inhibit zymosan-induced paw inflammation when administered only one day prior experiment. Furthermore, when ouabain was given for two days prior experiment, it did not interfere in

the edema present 4 h after zymosan. Despite the fact that ouabain was effective at the 0.31 mg/kg concentration, the dose of 0.56 mg/kg was chosen because, using a different model, in a previous *in vivo* work, this concentration was effective [16]. The intraplantar administration of zymosan activates of the complement system [42] promotes increased expression of COX-2 and prostaglandin production, mainly of type E2, and increases the production of nitric oxide [39]. A controversy exists regarding the role played by ouabain on mast cell degranulation. Stimulatory and inhibitory effects were reported [43, 44]. Some data have also demonstrated that ouabain had no effect on mast cell degranulation [45]. In this work, the edema induced by mast cell degranulation using compound 48/80 was also inhibited.

In agreement with the results using zymosan, ouabain administered for three consecutive days was also able to inhibit carrageenan induced edema formation. Henriques and coworkers [46] showed that carrageenan injection into the mouse paw induces a biphasic edema that develops in the first 6 h, followed by a second phase, which starts at 24 h. The early phase is mainly mediated by histamine, serotonin, and by an increasing synthesis of prostaglandins such as prostaglandin E2. Recent studies have shown that carrageenan also induces peripheral release of nitric oxide (NO) sustained by TNF- α , IFN- γ , and IL-1. These cytokines have been shown to induce iNOS in a variety of cells [47]. The late phase is mainly sustained by prostaglandin release and NO [48]. In the present work, we found that ouabain inhibits the inflammation after 30 min, 1, 2, and 6 h but not after 24 h of carrageenan challenge. The antiinflammatory effect observed in the first phases could be related to the suppression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α [26] and by the blockade of the TNF- α /NF- κ B signaling pathway [27].

Taking this information into account, the effect of ouabain triggered by different inflammatory mediators related to carrageenan, zymosan, and compound 48/80-induced mouse paw inflammation was carried out. The present results demonstrate that ouabain produced a significant reduction in the mouse paw edema induced by prostaglandin E2 and bradykinin (at 15 minutes) but did not interfere in the edema induced by histamine. These findings suggest that the antiinflammatory effect of ouabain might be related to the inhibition of prostaglandin E2, bradykinin, and mast-cell degranulation but not to histamine.

Another feature of acute inflammation is cell migration, primarily neutrophils, into the site of injury. The inhibitory effect of ouabain on neutrophil migration was confirmed through peritoneal inflammation induced by concanavalin-A. This mitogen possesses chemotactic activity for neutrophils [49] and ouabain produced a clear inhibition in the influx of polymorphonuclear cells to the peritoneal cavity. Together with the previous data, this result clearly demonstrates that ouabain has an antiinflammatory effect.

Prostaglandins are potent sensitizing agents able to modulate multiple sites of nociceptive pathways [50]. Prostaglandin E2 acts synergistically with bradykinin in the induction of pain. These substances are among the most important mediators of the inflammatory hyperalgesia [51–53]. Our results demonstrated that ouabain produced a significant

reduction in the mouse paw edema induced by prostaglandin E2 and bradykinin. These data prompted us to evaluate the role of Ouabain in the nociception.

The acetic acid-induced abdominal writhing is a sensitive method to evaluate peripherally acting analgesics. In this model, opioid mechanisms and released arachidonic acid via cyclooxygenase and prostaglandin biosynthesis play a role in the nociceptive mechanism [54–56]. In the present work, it was demonstrated that ouabain and morphine, caused a significant inhibition, 45% and 78%, respectively, on the writhing responses induced by acetic acid when compared to the control group. This peripheral analgesic potential might be related to the inhibition of PGE2 and bradykinin, as we have also found that ouabain reduced the edema formation induced by these mediators, suggesting that ouabain antinociceptive effect can be associated with an antiinflammatory action.

To better evaluate the role of ouabain in pain, we used the thermal model for nociception, the hot-plate test, which is specific central antinociceptive test [57–59]. Ouabain was found to have antinociceptive activity in the hot-plate test, increasing the latency time (74%) when tested 30 min but not 60 nor 120 min after the last injection of ouabain. Animals were also pretreated with naloxone, an opioid antagonist that opposes the effects of opioid agonists such as morphine [37]. The results demonstrated that naloxone was capable to inhibit ouabain effect, indicating that at least in part, the antinociceptive effect of ouabain is also related to activation of opioid receptors. Using different models, it was also reported by other groups that ouabain exhibited antinociceptive effects [60, 61].

In an attempt to discard the possibility that the effect observed was due to a sedative effect on the animal behavior and not an analgesic effect, further experiments were performed, and mice were exposed to the elevated plus-maze test [38, 62–64]. This test is based on the natural fear of open and elevated spaces, and, as a consequence, rats and mice tend to avoid the open arms and stay on the enclosed arms [65, 66]. It was reported that an increase in the proportion of time spent in the open arms and in the proportion of entries into the open arms indicates anxiety reduction [38]. On the other hand, total number of arm entries is an indicator of motor activity [62–64]. Our data demonstrated that ouabain did not interfere in the mice anxiety behavior or in the motor function, when compared to the control group. As expected, the positive control (0.5 mg/Kg diazepam) leads to anxiety reduction demonstrated by an increase in the number of visits and time spent in the open arms and by an increase in the total number entries. These results suggest that the analgesic effect of ouabain is not related to sedative effect or to motor function.

5. Conclusion

For the first time, the present work demonstrated, *in vivo*, the antiinflammatory and analgesic potential of ouabain which might be related to prostaglandin E2 and bradykinin as well as to opioid mechanisms.

Acknowledgments

This work was supported by Fapesq (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro). The authors would like to acknowledge Airlla Laana de Medeiros Cavalcanti, Jéssica de Sá Barreto Callou Peixoto, Josenilson Feitosa de Lima, and Juliana da Silva Brandi Oliveira for helping in some experiments.

References

- [1] G. Scheiner-Bobis and W. Schoner, "A fresh facet for ouabain action," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 12, pp. 1288–1289, 2001.
- [2] J. M. Hamlyn, M. P. Blaustein, S. Bova et al., "Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 14, pp. 6259–6263, 1991.
- [3] M. Ferrandi, P. Manunta, S. Balzan, J. M. Hamlyn, G. Bianchi, and P. Ferrari, "Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays," *Hypertension*, vol. 30, no. 4, pp. 886–896, 1997.
- [4] J. Laredo, B. P. Hamilton, and J. M. Hamlyn, "Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells," *Endocrinology*, vol. 135, no. 2, pp. 794–797, 1994.
- [5] W. Schoner, "Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus," *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, vol. 108, no. 7, pp. 449–454, 2000.
- [6] A. Goto, K. Yamada, H. Nagoshi, Y. Terano, and M. Omata, "Stress-induced elevation of ouabainlike compound in rat plasma and adrenal," *Hypertension*, vol. 26, no. 6, part 2, pp. 1173–1176, 1995.
- [7] N. Bauer, J. Müller-Ehmsen, U. Krämer et al., "Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of β -blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition," *Hypertension*, vol. 45, no. 5, pp. 1024–1028, 2005.
- [8] M. P. Blaustein, J. Zhang, L. Chen et al., "The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension," *Hypertension*, vol. 53, no. 2, pp. 291–298, 2009.
- [9] S. Rodrigues-Mascarenhas, A. D. S. de Oliveira, N. D. Amodeo, O. R. Affonso-Mitidieri, F. D. Rumjanek, and V. M. Rumjanek, "Modulation of the immune system by ouabain," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1153, pp. 153–163, 2009.
- [10] M. Szamel, S. Schneider, and K. Resch, "Functional interrelationship between $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 256, no. 17, pp. 9198–9204, 1981.
- [11] V. Pires, R. C. Harab, B. Olej, and V. M. Rumjanek, "Ouabain effects on activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA-stimulated cells and of CD69 on PHA- and TPA-stimulated cells," *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 19, no. 3, pp. 143–148, 1997.
- [12] V. L. G. de Moraes, B. Olej, L. de La Rocque, and V. M. Rumjanek, "Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity," *The FASEB Journal*, vol. 3, no. 12, pp. 2425–2429, 1989.
- [13] J. Echevarria-Lima, E. G. de Araújo, L. de Meis, and V. M. Rumjanek, " Ca^{2+} mobilization induced by ouabain in thymocytes involves intracellular and extracellular Ca^{2+} pools," *Hypertension*, vol. 41, no. 6, pp. 1386–1392, 2003.
- [14] S. Rodrigues Mascarenhas, J. Echevarria-Lima, N. F. dos Santos, and V. M. Rumjanek, "CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca^{2+} entry," *Life Sciences*, vol. 73, no. 8, pp. 1037–1051, 2003.
- [15] C. L. Mann, C. D. Bortner, C. M. Jewell, and J. A. Cidlowski, "Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase," *Endocrinology*, vol. 142, no. 12, pp. 5059–5068, 2001.
- [16] S. Rodrigues-Mascarenhas, N. F. dos Santos, and V. M. Rumjanek, "Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy," *Bioscience Reports*, vol. 26, no. 2, pp. 159–169, 2006.
- [17] R. C. Valente, C. R. Nascimento, E. G. Araújo, and V. M. Rumjanek, "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*, vol. 16, no. 4, pp. 228–236, 2009.
- [18] A. D. Foey, A. Crawford, and N. D. Hall, "Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na,K-ATPase activity," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1355, no. 1, pp. 43–49, 1997.
- [19] P. Kometiani, J. Li, L. Gnudi, B. B. Kahn, A. Askari, and Z. Xie, "Multiple signal transduction pathways link Na^+/K^+ -ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: the roles of Ras and mitogen-activated protein kinases," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 24, pp. 15249–15256, 1998.
- [20] M. Haas, A. Askari, and Z. Xie, "Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na^+/K^+ -ATPase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 36, pp. 27832–27837, 2000.
- [21] K. Mohammadi, P. Kometiani, Z. Xie, and A. Askari, "Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na^+/K^+ -ATPase to ERK1/2," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 45, pp. 42050–42056, 2001.
- [22] Z. Xie, "Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 47, no. 2, pp. 383–390, 2001.
- [23] S. Harwood and M. M. Yaqoob, "Ouabain-induced cell signaling," *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, 1, pp. 2011–2017, 2005.
- [24] S. Rodrigues-Mascarenhas, F. F. Bloise, J. Moscat, and V. M. Rumjanek, "Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes," *Cell Biology International*, vol. 32, no. 10, pp. 1323–1328, 2008.
- [25] E. R. Sherwood and T. Toliver-Kinsky, "Mechanisms of the inflammatory response," *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, vol. 18, no. 3, pp. 385–405, 2004.
- [26] A. Matsumori, K. Ono, R. Nishio et al., "Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain," *Circulation*, vol. 96, no. 5, pp. 1501–1506, 1997.
- [27] Q. Yang, W. Huang, C. Jozwik et al., "Cardiac glycosides inhibit $\text{TNF-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 27, pp. 9631–9636, 2005.

- [28] M. Zimmermann, "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals," *Pain*, vol. 16, no. 2, pp. 109–110, 1983.
- [29] D. F. P. Leite, J. Echevarria-Lima, S. C. Ferreira, J. B. Calixto, and V. M. Rumjanek, "ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 82, no. 3, pp. 630–637, 2007.
- [30] C. R. Correa and J. B. Calixto, "Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse," *British Journal of Pharmacology*, vol. 110, no. 1, pp. 193–198, 1993.
- [31] J. C. Castardo, A. S. Prudente, J. Ferreira et al., "Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 118, no. 3, pp. 405–411, 2008.
- [32] D. Rodriguez, B. S. Cavada, J. T. Abreu-de-Oliveira, R. de-Azevedo-Moreira, and M. Russo, "Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 25, no. 8, pp. 823–826, 1992.
- [33] J. G. Cripps, F. A. Crespo, P. Romanovskis, A. F. Spatola, and R. Fernandez-Botran, "Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan-cytokine interactions," *International Immunopharmacology*, vol. 5, no. 11, pp. 1622–1632, 2005.
- [34] G. V. B. Cruz, P. V. S. Pereira, F. J. Patrício et al., "Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 1, pp. 148–154, 2007.
- [35] R. Koster, M. Anderson, and E. J. Debber, "Acetic acid for analgesic screening," *Federation Proceedings*, vol. 18, pp. 412–414, 1959.
- [36] G. Woolfe and A. D. MacDonald, "The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol)," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 80, pp. 300–307, 1944.
- [37] F. D. S. Oliveira, D. P. De Sousa, and R. N. de Almeida, "Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 31, no. 4, pp. 588–591, 2008.
- [38] R. G. Lister, "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse," *Psychopharmacology*, vol. 92, no. 2, pp. 180–185, 1987.
- [39] S. Cuzzocrea, B. Zingarelli, G. Calapai, F. Nava, and A. P. Caputi, "Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production," *Life Sciences*, vol. 60, no. 3, pp. 215–220, 1997.
- [40] R. Vinegar, J. F. Truax, J. L. Selph, P. R. Johnston, A. L. Venable, and K. K. McKenzie, "Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat," *Federation Proceedings*, vol. 46, no. 1, pp. 118–126, 1987.
- [41] R. L. C. Handy and P. K. Moore, "A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on caurageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity," *British Journal of Pharmacology*, vol. 123, no. 6, pp. 1119–1126, 1998.
- [42] L. Pillemer, L. Blum, I. H. Lepow et al., "The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena," *Science*, vol. 120, no. 3112, pp. 279–285, 1954.
- [43] J. Lago, A. Alfonso, M. R. Vieytes, and L. M. Botana, "Ouabain-induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by protein phosphorylation and intracellular pH," *Cellular Signalling*, vol. 13, no. 7, pp. 515–524, 2001.
- [44] T. Okazaki, V. S. Ilea, A. Okazaki, K. Wicher, R. E. Reisman, and C. E. Arbesman, "Inhibition of antigen induced histamine release by ouabain," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 57, no. 5, pp. 454–462, 1976.
- [45] M. Senol, I. H. Ozerol, A. V. Patel, and D. P. Skoner, "The effect of Na⁺-K⁺ ATPase inhibition by ouabain on histamine release from human cutaneous mast cells," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 294, no. 1-2, pp. 25–29, 2007.
- [46] M. G. Henriques, P. M. Silva, M. A. Martins et al., "Mouse paw edema. A new model for inflammation?" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 20, no. 2, pp. 243–249, 1987.
- [47] A. Ianaro, C. A. O'Donnell, M. Di Rosa, and F. Y. Liew, "A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice," *Immunology*, vol. 82, no. 3, pp. 370–375, 1994.
- [48] A. R. S. Brito and M. A. Antonio, "Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 61, no. 3, pp. 215–228, 1998.
- [49] J. G. Cripps, F. A. Crespo, P. Romanovskis, A. F. Spatola, and R. Fernández-Bostrán, "Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan-cytokine interactions," *International Immunopharmacology*, vol. 5, no. 11, pp. 1622–1632, 2005.
- [50] M. Burian and G. Geisslinger, "COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 107, no. 2, pp. 139–154, 2005.
- [51] A. Dray, "Inflammatory mediators of pain," *British Journal of Anaesthesia*, vol. 75, no. 2, pp. 125–131, 1995.
- [52] J. D. Richardson and M. R. Vasko, "Cellular mechanisms of neurogenic inflammation," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 302, no. 3, pp. 839–845, 2002.
- [53] H. Vanegas and H.-G. Schaible, "Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord," *Progress in Neurobiology*, vol. 64, no. 4, pp. 327–363, 2001.
- [54] E. M. Franzotti, C. V. F. Santos, H. M. S. Rodrigues, R. H. V. Mourão, M. R. Andrade, and A. R. Antoniolli, "Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 72, no. 1-2, pp. 273–278, 2000.
- [55] R. Deraedt, S. Jouquey, F. Delevallee, and M. Flahaut, "Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition," *European Journal of Pharmacology*, vol. 61, no. 1, pp. 17–24, 1980.
- [56] H. O. Collier, L. C. Dinneen, C. A. Johnson, and C. Schneider, "The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse," *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, vol. 32, no. 2, pp. 295–310, 1968.
- [57] R. C. da Silveira e Sá, L. E. G. de Oliveira, F. F. Nóbrega, J. Bhattacharyya, and R. N. de Almeida, "Antinociceptive and toxicological effects of *Dioclea grandiflora* seed pod in mice," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 606748, 6 pages, 2010.
- [58] D. S. França, A. L. Souza, K. R. Almeida, S. S. Dolabella, C. Martinelli, and M. M. Coelho, "B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice," *European Journal of Pharmacology*, vol. 421, no. 3, pp. 157–164, 2001.

- [59] A. R. Campos, F. A. A. Albuquerque, V. S. N. Rao, M. A. M. Maciel, and A. C. Pinto, "Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 2, pp. 116–120, 2002.
- [60] W. Zeng, S. Dohi, H. Shimonaka, and T. Asano, "Spinal antinociceptive action of Na^+ - K^+ pump inhibitor ouabain and its interaction with morphine and lidocaine in rats," *Anesthesiology*, vol. 90, no. 2, pp. 500–508, 1999.
- [61] W. Zeng, X. Chen, and S. Dohi, "Antinociceptive synergistic interaction between clonidine and ouabain on thermal nociceptive tests in the rat," *The Journal of Pain*, vol. 8, no. 12, pp. 983–988, 2007.
- [62] J. Borsy, E. Csanyi, and I. Lazar, "A method of assaying tranquilizing drugs based on the inhibition of orientational hypermotility," *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, vol. 124, pp. 180–190, 1960.
- [63] S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, and M. Briley, "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 14, no. 3, pp. 149–167, 1985.
- [64] R. J. Rodgers and N. J. T. Johnson, "Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety," *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, vol. 52, no. 2, pp. 297–303, 1995.
- [65] D. Treit, J. Menard, and C. Royan, "Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze," *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, vol. 44, no. 2, pp. 463–469, 1993.
- [66] K. C. Montgomery, "The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior," *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, vol. 48, no. 4, pp. 254–260, 1955.