

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

JACQUELINE ALVES LEITE

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA OUABAÍNA NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**

João pessoa - PB

2012

JACQUELINE ALVES LEITE

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA OUABAÍNA NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

João Pessoa – PB

2012

L533a Leite, Jacqueline Alves.

Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo
inflamatório agudo / Jacqueline Alves Leite.--João Pessoa,
2012.

139f. : il.

Orientadora: Sandra Rodrigues Mascarenhas

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Farmacologia. 3. Ouabaína.
4 Glicosídeos cardíacos. 4. Inflamação e citocinas.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

JACQUELINE ALVES LEITE

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA OUABAÍNA NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal
da Paraíba como parte dos
requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOLOGIA

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Orientadora

Profa. Dra. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinadora Externa

Prof. Dr. Valdir De Andrade Braga
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Dasdores** e **Geraldo Trigueiro**

Aos meus irmãos, **Jardel** e **Geraldo Junior**

À minha inspiração, **Italo Rossi**

Porque família é tudo

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por tudo que há em minha vida e por iluminar meu caminho nas horas de incerteza e frustração, sempre me mostrando o próximo passo a ser seguido.

Aos meus **pais**, por terem me ensinado a viver com dignidade, por terem trabalhado sempre por mim, por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos para realizarem os meus, meu muito obrigada, amo vocês!

Aos meus **irmãos**, pelo apoio, amizade e torcida nessa longa caminhada.

À minha família, em especial ao meu avô, **Zeca** (*in memorian*) e minha voinha **Maria Rosa**, pela grande torcida, sempre demonstrada, com meu sucesso.

À meu namorado, amigo e companheiro de profissão, **Italo Rossi**, pelo amor, apoio, companheirismo em todos os momentos, por ser um presente de Deus em minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Sandra Rodrigues Mascarenhas**, que acreditou em mim muito mais que eu mesma, pela paciência, incentivo, ensinamentos, determinação, prestatividade e dedicação a este trabalho, que servirão de referência na minha vida pessoal e profissional. Pela confiança em entregar sua turma de Enfermagem para eu ministrar parte da disciplina de Imunologia no estágio docência. Por ser um exemplo de professora e pesquisadora e por nossa amizade que vem sendo construída ao longo destes anos, meu muito obrigada!

Aos professores membros da Banca Examinadora **Vivian Rumjanek**, **Robson Coutinho**, **Valdir Braga** e **Marcia Piuvezam** pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À Profa. Dra. **Leônia**, por contribuir para minha formação, pelo carinho e amizade, que levarei sempre comigo.

À Profa. Dra. **Márcia Piuvezam**, pela colaboração e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Juliana Brandi**, minha grande amiga e companheira de bancada, pela amizade, companheirismo e incentivo nos momentos mais difíceis do mestrado, por ter me ensinado o gosto pela imunologia.

À minha querida amiga, **Heloina Falcão**, por ser um exemplo de competência, e por seu carinho e amizade sempre verdadeira, durante toda minha caminhada, desde a época de iniciação científica.

Aos meus amigos e companheiros de bancada, **Fábio Tenório, Luciana Teles** e **Anne Abreu** pela amizade, alegrias e tristezas compartilhadas e pelas boas risadas durante o meu mestrado, vocês estarão sempre em meu coração.

Aos companheiros de laboratório de Imunologia, **Giciane, Renatinha, Priscila, Rogério, Claudio, Fagner** e **Hermman**, por toda ajuda dispensada. E aos meus e adotados, queridos alunos de Iniciação Científica, **Anne, José Guilherme, Jucélio, Laércia, Adriano, Alynne** e **Airla**, pelo incentivo e amizade durante essa caminhada.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Funcional, os Relaxados, **Aline, Carol Maga, Carol Folhas, Ceíça, Cibele, Cibério, Fábio, Fernando, Gislaine, Juliana, Luiz, Rafael** e **Rosi** por todo apoio, pelos momentos de angústias, alegrias e de descontração no cafezinho e no vôlei divididos, vocês tornaram essa caminhada mais leve, meu muito obrigada!

Aos todos os alunos do laboratório do Prof. Dr. Demétrius, em especial a **Glaucia Faheina**, por sua disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. **Luiz Fernando** e seus alunos, em especial, o **Jocelmo** por gentilmente ter cedido substâncias para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. **Márcia Rosa** e suas alunas **Patrícia, Yara** e **Farnciane** (as Leishgirls) pela ajuda dispensada nos experimentos de cultura celular.

Aos amigos da melhor turma de **mestrado 2010**, em especial a **Abrahão, Ana Paula, Daiene, Felipe, Jéssica, Juliana Moura, Milena, Monalisa, Néires, Paula, Patrícia** e **Viviane** por todos os momentos de descontração e estudo.

Aos meus queridos alunos da **turma de Enfermagem da UFPB**, por fazerem parte da minha formação.

Aos meus sempre amigos de graduação, em especial, **Talita, Dani, Aline, Juliana, Sabrina** e **Andinho**.

Aos **professores** deste programa de Pós-graduação, pela contribuição na minha formação.

À coordenação deste programa, em nome dos professores **Dra. Maria de Fátima Agra** e **Dr. Josean Fachine Tavres**, pela competência pela qual coordenam este programa.

À todos os funcionários da Pós-graduação e Cbiotec, em especial as secretarias, **Tânia** e **Carol**, por toda competência desenvolvida em seus trabalhos.

À **José Crispim Duarte**, por sua dedicação ao biotério, por sua paciência, amizade e por muitas risadas.

A funcionária da limpeza, **Mônica (Moniquita)**, por seu carinho e amizade.

Aos técnicos, **Luis Cordeiro** e **Adriano Silva**, pelo indispensável apoio técnico para a realização deste trabalho.

À **direção** do Centro de Biotecnologia (Cbiotec) na pessoa do Prof. Dr. Valdir Braga, pelo apoio institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro e suporte técnico científico através do Portal Periodicos, respectivamente.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Porque ninguém faz um trabalho sozinho

Muito obrigada!

Jacqueline Alves Leite

Eu sou Tua ovelha Senhor.

Eu conheço a Tua voz.

É que às vezes a surdez toma conta de mim.

Eu sou Tua ovelha, Senhor.

Não permita que eu me perca, que eu me desvie do Teu rebanho.

Mas, se eu me perder, eu Te peço, Senhor,

Vem me encontrar.

(Pe. Marcelo Rossi)

RESUMO

LEITE, J. A. **ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA OUABAÍNA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO**. 2012. Dissertação (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2012).

A ouabaína (OUA), um potente inibidor da Na^+/K^+ -ATPase, foi identificada como uma substância endógena presente no plasma humano. Nos últimos anos, foi evidenciado que a OUA é capaz de interferir em diversos aspectos do sistema imunológico. Durante o processo inflamatório, são ativados mecanismos que envolvem a diferenciação, proliferação, ativação e migração celular, além da liberação de mediadores inflamatórios, e geralmente, ocorre o retorno à homeostasia. Este trabalho demonstrou a capacidade moduladora da OUA no processo inflamatório. **Objetivo:** Avaliar o papel imunomodulador da OUA na inflamação aguda em modelo murino. **Métodos:** Inicialmente, foi realizada uma curva de tempo e dose-resposta com a OUA (0,10 mg/kg; 0,31 mg/kg e 0,56 mg/kg) administrada de forma intra-peritoneal (i.p.) no modelo de edema de pata induzido por zimosan (10mg/mL). Os camundongos também foram estimulados com zimosan i.p.(2mg/ml). Após 4h, o fluido peritoneal foi removido para a contagem total e diferencial das células. Foi realizada a análise das populações de neutrófilos e macrófagos, além da viabilidade celular utilizando o kit anexina por citometria de fluxo. As concentrações das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 no fluido peritoneal foram testadas por ELISA. Foi determinada a interferência do tratamento com a OUA no aumento da permeabilidade vascular. Também foi estudado, *in vitro*, o efeito de diferentes concentrações de OUA (10 nM, 100 nM e 1000 nM) na produção de óxido nítrico (NO). **Resultados:** No modelo do edema de pata, observamos que são necessários três dias consecutivos de tratamento na dose de 0,56 mg/kg para que a atividade anti-inflamatória da OUA seja identificada. No modelo de peritonite induzida por zimosan, o pré-tratamento com a OUA reduziu em 42% no número total de células na cavidade peritoneal, como um reflexo da inibição de leucócitos polimorfonucleares (54%). No entanto, este fenômeno não está associado a apoptose destas células. A OUA também diminuiu o extravasamento de plasma induzido por zimosan (33%) e reduziu os níveis de TNF- α (64%) e IL-1 β (63%), sem alterar os níveis de IL-6 e IL-10. Na cultura de macrófagos peritoneais, a OUA não interferiu na produção de NO. **Conclusão:** Este conjunto de dados sugere que a OUA possui uma atividade anti-inflamatória. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

Palavras chave: Glicosídeos cardíacos, inflamação e citocinas.

ABSTRACT

LEITE, J. A. **OUABAIN IMMUNOMODULATORY ACTIVITY IN THE ACUTE INFLAMMATORY PROCESS**. 2012. Dissertation (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2012).

Ouabain (OUA), a potent inhibitor of the Na^+, K^+ -ATPase pump, was identified as an endogenous substance of human plasma. In recent years, ouabain was shown to affect various immunological processes. Mechanisms that involve cellular differentiation, proliferation, activation and migration, as well as inflammatory mediators release, are activated during inflammation and homeostasis is usually reestablished. This study demonstrated the modulatory ability of OUA on inflammatory process. **Aim:** This study aimed to evaluate ouabain immunomodulatory role on acute inflammatory process using a murine model. **Methods:** Initially, a dose and time-response curve was performed with OUA (0.10 mg/kg, 0.31 mg/kg and 0.56 mg/kg) intraperitoneally administered on the paw edema induced by zymosan (10 mg/mL). Mice were also intraperitoneally (i.p.) stimulated with zymosan (2 mg/mL). After 4h, the peritoneal fluid was removed for total and differential cell counts. Neutrophils and macrophages population, as well as cell viability, were analyzed using an annexin KIT by flow cytometry. The concentrations of the cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10 in peritoneal lavage fluids were assayed using ELISA kit. Ouabain influence in the vascular permeability increase was determined using evans blue dye. OUA, *in vitro*, influence on nitric oxide (NO) production was also studied. **Results:** It was observed that OUA 0,56 mg/kg injected for three consecutive days prevented zymosan edema formation. After induction of inflammation, treatment with OUA led to a 42% reduction in the total cell numbers in the peritoneal cavity, as a reflex of the inhibition of polymorphonuclear leukocytes (54%), which was not due to cell apoptosis. Ouabain also decreased zymosan-induced plasma exudation (33%). Furthermore, OUA decreased the levels of TNF- α (64%) and IL-1 β (63%), without interference on IL-6 and IL-10 levels. It was also demonstrated, using peritoneal macrophages, that ouabain did not interfere on LPS induced NO production. **Conclusion:** Ouabain modulated the acute inflammatory response induced by zymosan. However, further studies are necessary to elucidate the mechanisms involved

Keywords: Cardiac glycosides, inflammation and cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral dos glicosídeos cardíacos.....	22
Figura 2 – Estrutura química da ouabaína.....	25
Figura 3 – Síntese dos mediadores lipídicos	34
Figura 4 – Mecanismo de ação do ATP (sinal de perigo)	37
Figura 5 – Via de sinalização da citocina TNF- α	39
Figura 6 - Produção de IL-1 β pelo complexo protéico inflamassoma.....	42
Figura 7 – Mecanismo de migração celular durante a resposta inflamatória.	43
Figura 8 – Modulação de células do sistema imunológico pelo neutrófilo.....	46
Figura 9 – Polarização dos Macrófagos (M1 e M2).....	49
Figura 10 – Vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória.....	51
Figura 11 – Efeito da ouabaína no número de leucócitos totais e diferencial no modelo de peritonite induzida por zimosan.....	77

Figura 12 – Avaliação do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células presentes no lavado peritoneal..... 79

Figura 13 - Análise das subpopulações celulares presentes no lavado peritoneal..80

Figura 14 – Efeito da ouabaína sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória.....82

Figura 15 – Análise do efeito da ouabaína na viabilidade dos leucócitos presentes no lavado peritoneal..... 84

Figura 16 – Esquema representando o efeito da ouabaína no processo inflamatório obtidos neste trabalho..... 103

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva dose-resposta do tratamento com ouabaína na formação do edema de pata induzido por zimosan.....	67
Gráfico 2 – Efeito de um dia de tratamento com ouabaína no edema de pata induzido por zimosan	69
Gráfico 3 – Efeito do tratamento com ouabaína por dois dias consecutivos no edema de pata induzido por zimosan.....	71
Gráfico 4 – Efeito do tratamento com ouabaína por três dias consecutivos no edema de pata induzido por zimosan.....	73
Gráfico 5 – Efeito do pré-tratamento com ouabaína sobre alterações na permeabilidade vascular induzida com zimosan	75
Gráfico 6 – Efeito da ouabaína na viabilidade de macrófagos peritoneais murino..	86
Gráfico 7 – Efeito da ouabaína na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais murino.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = Análise de variância
AA = Ácido araquidônico
ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico
AV3V = Região anteroventral do terceiro ventrículo
ANG II = Angiotensina II
ATP = Trifosfato de adenosina
ADP = difosfato de adenosina
AMP = monofosfato de adenosina
ATPase = Enzima catalisadora da hidrólise de adenosina trifosfato
AT1 = Receptor de angiotensina 1
Bcl2 = proteína anti-apoptótica linfoma de células B 2
clAPs = proteína inibidora de apoptose celular
COX = ciclo-oxigenases
CXC = Quimiocinas do tipo CXC
CC = Quimiocinas do tipo CC
CD = *Cluster of differentiation*
Cav = Canais de cálcio dependentes de voltagem
D1 = Receptor para dopamina 1
D2 = Receptor para dopamina 2
DAG = Diacilglicerol
DMSO = Dimetilsufóxido
DCs = Células dendríticas
e.p.m. = Erro padrão da média
ERK = Do inglês *extracellular signal -regulated kinase*
EGF = Fator de crescimento epidermal
ELISA = Do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*
EGFR = Receptor para o fator de crescimento epidermal
Fc = Fragmento cristalizável
FACS = fluorescent-activated classificador de células
FSC = Tamanho celular
FITC = Isotiocianato de fluoresceína

Gq/11 = Proteína regulatória ligada ao nucleotídio guanínico tipo q ou 11 de ação estimulatória

GMPc = Monofosfato cíclico de guanosina

GCs = Guanilil ciclase solúvel

GM-CFS = Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

DSS = Dextran sulfato de sódio

H₁ = Receptor 1 de histamina

H₂ = Receptor 2 de histamina

H₃ = Receptor 3 de histamina

H₄ = Receptor 4 de histamina

IL = Interleucina

iNOS = Óxido nítrico sintase induzível

IP₃ = 1,4,5 trisfosfato de inositol

ICV = Intracerebroventricular

INF-γ = Interferon gama

INF-β = Interferon beta

ICAM = Molécula de adesão intracelular 1

IL-6Ra = Receptor para IL-6

sIL6-R = Receptor solúvel para IL-6

IL-1Ra = Antagonista do receptor da IL-1

i.p = Intraperitoneal

i.v = Intravenoso

IκB = Inibidor do κB

IKK = Proteína cinase do IκB

JNK = do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

LPS = Lipopolissacarídeo

LTs = Leucotrienos

LTC₄ = Leucotrieno C4

LTD₄ = Leucotrieno D4

LTE₄ = Leucotrieno E4

LXA = Lipoxinas

LXA₄ = Lipoxina 4

LAK = Células killer ativadas por linfoquinas

LB = Linfócitos B

M1 = Macrófagos clássicos
M2 = Macrófagos alternativos
MTT = 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
mg = Miligramas
mm = Milímetros
mL = Mililitros
mW = Miliwatt
M = Concentração molar (mols/L)
MLCK = Cinase da cadeia leve da miosina
MAPK = Proteína cinase ativada por mitógeno
MIP-1 = Proteína-1 inflamatória de macrófagos
Na⁺/K⁺-ATPase = Bomba sódio, potássio ATPase
nM = Nanomolar
NF-κB = Fator de transcrição nuclear κB
nNOS = Óxido nítrico sintase neuronal
NFATc = Fator nuclear de ativação de células T c1
nm = Nanometro
N = Número de animais
NK = Células natural *killer*
NLR = Receptores Nod like
PAF = Fator de agregação plaquetária
PAMPs = Padrões moleculares associados a patógenos
PBS = Solução fosfato tamponado
PGs = Prostaglandinas
PLA2 = Fosfolipase A2
PMN = Polimorfonuclear
PE = Ficoeritrina
PKC = Proteína cinase dependente de cálcio
PKG = Proteína cinase G
PIP₂ = Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PLCβ = Fosfolipase C-β
P2X = Receptor purinérgico
PVN = Núcleo paraventricular
pM = Picomolar

ROS = Espécies reativas de oxigênio

RS = Retículo sarcoplasmático

r.p.m = Rotações por minuto

RPMI = Meio de cultura *Royal Park Memorial Institute*

SFB = Soro fetal bovino

SSC = Granulosidade

SNS = Sistema nervoso simpático

SNC = Sistema nervoso central

STAT3 = Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TNF- α = Fator de necrose tumoral α

TMB = Tetrametilbenzidina

Th17 = Células T *helper* 17

TGF- β 1 = Fator de crescimento tumoral β 1

TXA = Tromboxanos

TLR = Receptores do tipo toll

VCAM-1 = Molécula de adesão das células vasculares¹

VEGF = Fator de crescimento endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Glicosídeos cardíacos	22
1.2 Ouabaína.....	24
1.3 Efeito da ouabaína no sistema imunológico.	27
1.4 Inflamação.....	29
1.4.1 Mediadores envolvidos na inflamação.....	31
1.4.1.1 Aminas vasoativas	32
1.4.1.2 Peptídeos vasoativos e fragmentos do sistema complemento.....	32
1.4.1.3 Mediadores lipídicos.....	33
1.4.1.4 Sinais de perigo.....	35
1.4.1.5 Citocinas e quimiocinas.....	38
1.5 Migração celular	42
1.6 Neutrófilos	44
1.7 Macrófagos.....	47
1.8 Vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória.....	50
2 OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo geral	54
2.2 Objetivo específico	54
2.2.1 <i>In vivo</i>	54
2.2.2 <i>In vitro</i>	54
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1 Material.....	56

3.1.1 Animais.....	56
3.1.2 Reagentes utilizados	56
3.2 Métodos.....	57
3.2.1 Preparação da ouabaína para os testes <i>in vivo</i>	57
3.2.2 Edema de pata induzido por zimosan	57
3.2.3 Permeabilidade vascular	57
3.2.4 Peritonite induzida por zimosan	58
3.2.5 Coleta do lavado peritoneal.....	58
3.2.6 Contagem diferencial de células do lavado peritoneal	59
3.2.7 Análise das populações celulares por citometria de fluxo	59
3.2.8 Análise da apoptose dos leucócitos inflamatórios.....	60
3.2.9 Medida de fluorescência	60
3.2.10 Ensaio imunoenzimático para detecção de citocinas no sobrenadante de células do lavado peritoneal	61
3.2.11 Preparação e utilização da ouabaína nos testes <i>in vitro</i>	62
3.2.12 Citotoxicidade da ouabaína.....	62
3.2.13 Determinação da viabilidade celular.....	63
3.2.14 Doseamento de Óxido nítrico	63
3.2.15 Análise estatística	64
4 RESULTADOS	66
4.1 Avaliação do efeito imunomodulador da ouabaína em modelos de inflamação aguda <i>in vivo</i>	66
4.1.1 Curva dose-resposta do efeito da ouabaína no edema de pata induzido por zimosan.....	66

4.1.2 Avaliação do pré-tratamento com ouabaína durante um dia no modelo de edema de pata induzido por zimosan.....	68
4.1.3 Avaliação do pré-tratamento com ouabaína durante dois dias consecutivos no modelo de edema de pata induzido por zimosan.	70
4.1.4 Avaliação do pré-tratamento com ouabaína durante três dias consecutivos no modelo de edema de pata induzido por zimosan.	72
4.1.5 Efeito da ouabaína no aumento da permeabilidade vascular induzida por zimosan.	74
4.1.6 Efeito da ouabaína na migração celular induzida por zimosan.	76
4.1.7 Análise das populações celulares por citometria de fluxo.	78
4.1.8 Efeito da ouabaína sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias	81
4.1.9 Efeito da ouabaína na viabilidade dos leucócitos presentes no lavado peritoneal.....	83
4.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório da ouabaína <i>in vitro</i>	85
4.2.1 Estudo da citotoxicidade da ouabaína em macrófagos peritoneais murino..	85
4.2.2 Efeito da ouabaína na produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais murino.....	87
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXOS	129

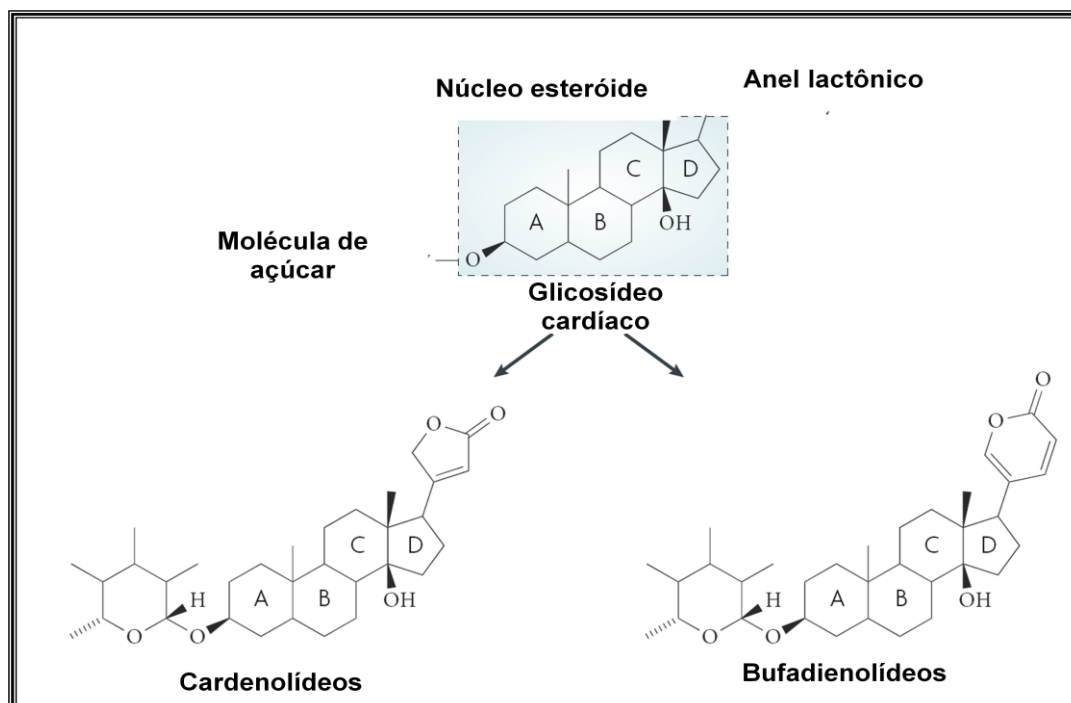
1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glicosídeos cardíacos

Os glicosídeos cardíacos constituem uma família de compostos naturais que apresentam uma grande diversidade estrutural, entretanto, todos possuem um núcleo esteroidal em sua estrutura, que é considerado o grupo farmacofórico responsável pela atividade destes compostos (SCHONFELD et al., 1985). Este núcleo esteroidal é duas vezes substituído, por um anel lactônico insaturado na posição 17 β (C17 β) e uma molécula de açúcar na posição 3 (C3) (Figura 1). A natureza do anel lactônico divide o grupo dos glicosídeos em dois tipos: os cardenolídeos, que apresentam uma butirolactona (anel lactônico insaturado formado por cinco membros) e os bufadienolídeos, que apresentam uma pirona (anel lactônico insaturado formado por seis membros) (Figura 1) (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Figura 1- Estrutura geral dos glicosídeos cardíacos



Fonte: Prassas e Diamandis, 2008. Os glicosídeos cardíacos são divididos em dois grupos, cardenolídeos e bufadienolídeos, a depender o anel lactônico.

Vários compostos semelhantes aos digitálicos tem sido encontrados em tecidos de mamíferos, como no cérebro e nas glândulas supra-renais, e em fluidos corporais, como no plasma, na urina e no líquido cefalorraquidiano (WEIDEMANN, 2005). Os glicosídeos identificados endogenamente incluem vários membros da classe dos cardenolídeos e bufadienolídeos, como a ouabaína, digoxina, marinobufagenina e proscillaridina A (HAMLYN et al., 1991; LICHTSTEIN et al., 1993; BAGROV et al., 1998; SCHNEIDER et al., 1998). A biossíntese destes hormônios está relacionada à síntese do colesterol e da progesterona, sendo controlada por outros hormônios, tais como renina-angiotensina, endotelina e adrenalina (GOTO et al., 1990; QAZZAZ et al., 2004).

Os glicosídeos endógenos desenvolvem diferentes atividades ao se ligarem a Na^+/K^+ -ATPase, uma proteína presente na membrana celular, que utiliza a energia do ATP para transportar íons Na^+ e K^+ contra um gradiente eletroquímico, mantendo baixos níveis citosólicos de Na^+ e altas concentrações de K^+ em praticamente todas as células animais (LINGREL, 2010). A sua atividade enzimática é essencial para muitos eventos fisiológicos, para a manutenção do equilíbrio osmótico e do pH, para a atividade de células nervosas e musculares, e para a manutenção do potencial de repouso celular, possuindo um papel central na função renal através da reabsorção de Na^+ e água (NICHOLS; MALDONADO, 1993).

Os digitálicos tem sido utilizados para fins terapêuticos desde os tempos antigos. Três conhecidos glicosídeos cardíacos, digoxina, ouabaína e digitoxina foram usados para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e fibrilação atrial por sua capacidade em aumentar as concentrações de cálcio (Ca^{2+}) intracelular (NEWMAN et al., 2008). Adicionalmente aos efeitos cardíacos, o uso dos digitálicos vem sendo associado ao tratamento de diversos tipos de neoplasias, incluindo, linfoma, leucemia, câncer de mama e câncer do trato urinário (HAUX et al., 2001; PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Dados acumulados nos últimos anos evidenciam que os glicosídeos inibem o crescimento tumoral e induzem a morte das células cancerígenas por apoptose e autofagia, sem induzir toxicidade nas células normais, sugerindo uma ação específica destes compostos (NEWMAN et al., 2008). Diversas vias de sinalização, como a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fator de transcrição nuclear κB

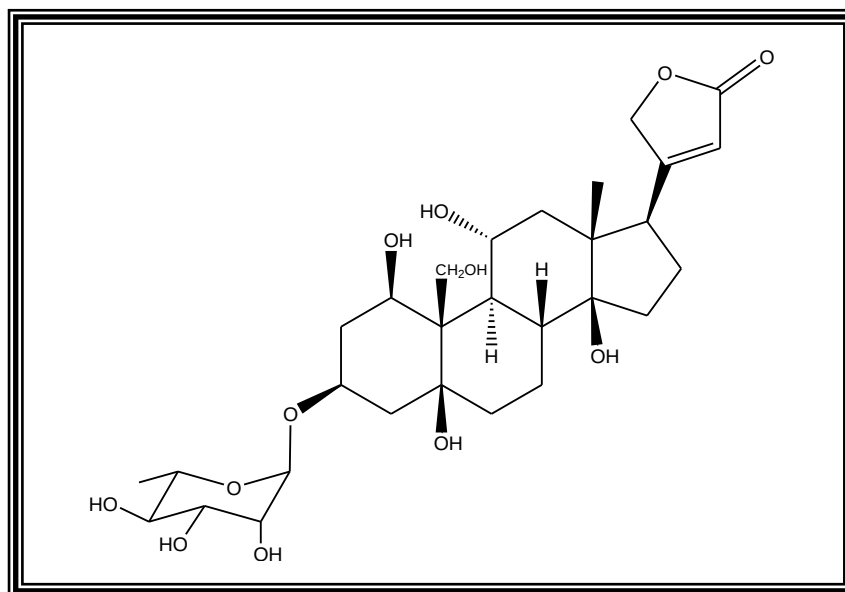
(NF- κ B) e espécies reativas de oxigênio (ROS), podem ser moduladas pelos digitálicos, o que regularia o crescimento e sobrevivência do tumor (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Adicionalmente, outros trabalhos sugerem que os glicosídeos possuem atividade anti-inflamatória, visto que estes compostos, como a digoxina, a digitoxina, a oleandrina, o odorosideo A e a ouabaína, tem demonstrado efeitos promissores em diversos modelos de inflamação, por reduzir a migração de células inflamatórias, inibir a expressão de moléculas de adesão e interferir na sinalização de quimiocinas e citocinas (ESPOSITO; POIRIER; CLARK, 1989; YANG et al., 2005; MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006; IHENETU et al., 2008; TAKADA et al., 2009; DE VASCONCELOS et al., 2011).

1.2 Ouabaína

A ouabaína é um glicosídeo cardíaco conhecido inicialmente como um composto de origem vegetal, extraído das cascas e raízes da árvore Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*) e de sementes do gênero *Strophanthus* (*Strophanthus gratus* e *Strophanthus kombé*), ambos pertencentes à família Apocynaceae. Em 1991, Hamlyn e colaboradores, identificaram uma substância endógena, circulante no plasma de mamíferos superiores semelhante à ouabaína.

Nos últimos anos, a ouabaína tem sido amplamente estudada por sua capacidade de interferir em diversos mecanismos reguladores e mantenedores da homeostase (BAGROV; SHAPIRO, 2008). Este digitálico é um composto hidrofílico, formado a partir da união de um esteróide (ouabagenina) e um açúcar (ramnose) por uma ligação glicosídica (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura química da ouabaína

Fonte: Leite et al., 2012

A ouabaína pode ser encontrada no plasma humano em concentrações de 50 pM a 80 nM, sendo produzida pela adrenal, hipotálamo, hipófise e na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) (PAMNANI et al., 1981; HAMLYN et al., 1991; GOTO et al., 1992; FERRANDI et al., 1997; SCHONER, 2000; SCHONER et al., 2003), e apresenta características químico-estruturais, biológicas e imunológicas idênticas as da ouabaína encontrada em vegetais (HAMLYN et al., 1991; FERRANDI et al., 1997; SCHONER, 2000).

Os principais estímulos para a secreção da ouabaína são: o aumento da concentração plasmática de sódio e volume extracelular (BLAUSTEIN, 1993), a angiotensina II (ANG II) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (DE WARDENER et al., 1961). Recentemente, foi demonstrado que a biossíntese da ouabaína endógena ocorre na glândula adrenal na via da enzima 11 β -hidroxilase (HAMLYN et al., 2003).

Vários eventos fisiológicos e patológicos podem interferir nos níveis endógenos da ouabaína. Evidências demonstram que a síntese de ouabaína pode ser modificada de acordo com o estado fisiológico em que se encontra o organismo. Níveis elevados de ouabaína foram encontrados em pacientes hipertensos (SCHONER, 2000) assim como em diferentes modelos de ratos com hipertensão (ROSSONI et al., 2003; XAVIER et al., 2004; WENCESLAU et al.,

2011). A ouabaína também participa da resposta do organismo ao estresse agudo e já foi demonstrado que o exercício físico é capaz de aumentar os níveis de ouabaína em ratos, cachorros e seres humanos alguns minutos após o início da atividade física (GOTO et al., 1992).

Alguns estudos demonstraram a participação da ouabaína endógena no desenvolvimento da hipertensão neurogênica (GRASSI, 2004). Um dos principais mecanismos desencadeadores desta doença é a liberação de angiotensina II (ANG II) (LAZARTIGUES, 2010). A ouabaína, por ser um inibidor da Na^+/K^+ -ATPase, diminui o potencial de membrana neuronal, promovendo uma exacerbação do efeito excitatório simpático desencadeado pela ANG II (PULINA et al., 2010), além de aumentar a liberação desse hormônio no núcleo paraventricular (PVN), resultando em uma estimulação dos receptores de angiotensina AT1 e estresse oxidativo (ZHANG et al., 2008). A ouabaína também contribui para a expressão de receptores AT1 (LIU et al., 2008) e para a diminuição na expressão da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (CAMPESE; YE; ZHONG, 2002), aumentando a atividade do SNS levando a manutenção da hipertensão neurogênica (GABOR; LEENEN, 2009).

A ouabaína também pode agir como um neuromodulador do sistema nervoso central (SNC), aumentando a atividade de neurônios simpáticos em ratos (DE WARDENER, 2001). Adicionalmente, este digitálico, pode estimular ou inibir a apoptose de células do SNC, a depender da concentração utilizada. Este evento foi observado em estudos de regeneração da retina, onde concentrações micromolares da ouabaína induziram a apoptose das células ganglionares, enquanto que, concentrações nanomolares protegeram as mesmas células da apoptose (DE REZENDE CORREA et al., 2005; FIMBEL et al., 2007).

Outros trabalhos evidenciaram que a injeção intracerebroventricular (ICV) da ouabaína, desencadeia alterações comportamentais em ratos (EL-MALLAKH et al., 1995; LI et al., 1997; LEHMANN et al., 2006; YU et al., 2010). Este evento pode estar relacionado a inibição da Na^+/K^+ -ATPase e consequente aumento nos níveis de dopamina e seus metabólitos (ELGHOZI et al., 1983; SIRINATHSINGHJI; HEAVENS; SIKDAR, 1988). Associado a este efeito, os receptores de dopamina, incluindo D1 e D2, podem modular a concentração de sódio intracelular e expressão da bomba (ROBERTS; REPASS; EL-MALLAKH,

2010). Além disso, a ouabaína induz a fosforilação da enzima tirosina hidroxilase, mediada pela ativação da via de sinalização ERK1/2, resultando na biossíntese de dopamina, o que implica a participação deste digitálico no desenvolvimento do transtorno bipolar (YU et al., 2011).

1.3 Efeito da ouabaína no sistema imunológico

O sistema imunológico ou imunitário é formado por células e órgãos cuja atividade está relacionada ao estabelecimento da homeostasia. As células do sistema imunológico podem reconhecer diferentes moléculas a partir da interação com receptores de repertório limitado (receptores de reconhecimento de padrões moleculares presentes em patógenos) ou com receptores altamente diversificados, como os receptores presentes nas células T e B. Os transtornos no sistema imunitário podem resultar em doenças, tais como imunodeficiências e hipersensibilidades (WILSON; TRUMPP, 2006). A resposta imune pode ser manipulada por substâncias ativas para reprimir as respostas indesejadas resultantes da inflamação, auto-imunidade, alergia, rejeição de transplante, e estimular as respostas de proteção contra agentes patogênicos capazes de evadir o sistema imunitário (CHAUSSABEL; PASCUAL; BANCHEREAU, 2010).

A ouabaína é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2009) exercendo efeitos inibitórios sobre a proliferação linfocitária induzida por diversos estímulos (QUASTEL; KAPLAN, 1968; DE MORAES et al., 1989; OLEJ et al., 1998), assim como sobre a geração de células *killer* ativadas por linfoquinas (LAK), sem, no entanto, inibir a atividade citotóxica dessas células (DE MORAES et al., 1989; OLEJ et al., 1994).

O papel da ouabaína em timócitos murinos ainda não está totalmente esclarecido, entretanto estudos demonstram que esse digitálico induz a expressão de CD69, através do influxo de cálcio proveniente do ambiente extracelular (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2003). Além disso, a ouabaína é capaz de inibir a proliferação dos timócitos desencadeada por concanavalina-A (SZAMEL; SCHNEIDER; RESCH, 1981). Este efeito pode estar relacionado com a sua capacidade em reduzir a atividade da proteína quinase

ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e os níveis do fator nuclear de ativação de células T c1 (NFATc1) (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008).

A inibição da Na^+/K^+ -ATPase por meio de concentrações elevadas de ouabaína causa despolarização da membrana plasmática de timócitos, *in vitro*, e potencializa a morte induzida por glicocorticóides (MANN et al., 2001). Outros dados demonstraram que esse sinergismo entre ouabaína e hidrocortisona também pode ocorrer *in vivo* (RODRIGUES-MASCARENHAS; DOS SANTOS; RUMJANEK, 2006).

Por outro lado, em linfócitos maduros de sangue periférico, a ouabaína é capaz de induzir um aumento da expressão do proto-oncogen c-myc, levando parte dessa população à morte por apoptose (OLEJ et al., 1998). A inibição da Na^+/K^+ -ATPase por altas concentrações da ouabaína causa a despolarização da membrana plasmática (MANN et al., 2001) e redução dos níveis de K^+ , que por sua vez, induz a atividade das caspases (BORTNER; HUGHES; CIDLOWSKI, 1997) reforçando o papel da ouabaína em processos apoptóticos.

O processo de diferenciação dos linfócitos B pode ser modulado por glicocorticóides ou hormônios esteroidais (GARVY et al., 1993), estudos recentes tem demonstrado que o tratamento por três dias consecutivos com a ouabaína é capaz de modular a maturação dos LB, visto que foi observado uma redução no número de LB maduros na medula óssea, baço e sangue periférico. Sugere-se que este efeito seja decorrente do sinergismo da ouabaína com glicocorticóides, pois o mesmo resultado não foi evidenciado *in vitro* (DE PAIVA et al., 2011).

Durante o processo inflamatório os monócitos migram do sangue para o local da lesão, onde se diferenciam em macrófagos. Recentemente foi relatado o efeito da ouabaína sobre a expressão de mCD14, uma molécula de superfície envolvida na resposta dos macrófagos contra bactérias Gram-negativas e na fagocitose. Neste trabalho, foi observado que a ouabaína regula negativamente a expressão destas moléculas por meio da transativação do fator EGFR e p38 MAPK (VALENTE et al., 2009).

Evidências crescentes tem demonstrado a participação da Na^+/K^+ -ATPase no desenvolvimento da inflamação aguda pulmonar. Em estudos onde camundongos foram submetidos à inalação com ouabaína, houve o desenvolvimento de uma inflamação pulmonar dependente da estimulação da

enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Estes dados foram confirmados *in vitro*, pois a inibição da Na^+/K^+ -ATPase pela ouabaína, em células epiteliais de pulmão humano e murino, causou uma estimulação na expressão de COX-2 (FENG et al., 2011).

Por outro lado, utilizando um modelo diferente, foi demonstrado que a ouabaína é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta inflamatória aguda induzida por distintos agentes flogísticos, e que sua atividade antiedematogênica e antinociceptiva está relacionada à inibição da ação de mediadores como prostaglandina e bradicinina, entretanto este efeito independe da ação da histamina (DE VASCONCELOS et al., 2011).

1.4 Inflamação

O sistema imune, entre várias outras funções, desempenha um papel fundamental no reconhecimento rápido e eliminação de micro-organismos patogênicos, através de diferentes processos, tais como fagocitose e indução de inflamação (SKELDON; SALEH, 2011). A inflamação é classicamente definida como uma resposta fisiológica que pode ser desencadeada, dentre outros estímulos, pela invasão microbiana e/ou agressão tecidual, fundamental para o retorno à homeostasia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008). Durante um processo inflamatório desencadeado por uma infecção, ocorrem alterações no processo de hematopoese, essenciais para o aumento do número de células efectoras. Este processo de diferenciação e proliferação celular é regulado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Adicionalmente, recentemente tem sido relatado que o interferon gama (INF- γ) é capaz de inibir o desenvolvimento de neutrófilos (BRUIN et al., 2011).

Durante a inflamação são liberados vários mediadores, que atuam localmente desencadeando os sinais característicos desse processo: dor, calor, rubor e edema, acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (SEDGWICK; LEES, 1986; SERHAN, 2010).

Adicionalmente, a inflamação também pode ser compreendida como uma resposta de adaptação ao mau funcionamento de tecidos ou desequilíbrio homeostático, estando envolvida no desenvolvimento de diversas doenças como: artrite reumatóide, asma, câncer, hipertensão e obesidade (NATHAN;

DING, 2010). Dentro desse contexto, diversos fatores podem iniciar o processo inflamatório, tais como, infecções microbianas e virais; exposição à alérgenos; radiação e substâncias químicas ou tóxicas; consumo de álcool, uso do tabaco e uma dieta rica em calorias (AGGARWAL; GEHLOT, 2009; SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010).

O processo inflamatório é comumente dividido em dois estágios, a fase aguda, mais precoce, e a fase crônica. Vale ressaltar que essa é apenas uma divisão didática e a evolução da resposta acontece de forma progressiva, com a combinação de elementos presentes nas duas fases mencionadas. A fase aguda é um estágio inicial da inflamação onde ocorrem alterações na microvasculatura, infiltração de células polimorfonucleares (neutrófilos) seguido por monócitos que se diferenciam em macrófagos e finalmente os fibroblastos que se proliferam podendo restabelecer a estrutura do tecido lesado. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto período de tempo e é normalmente benéfica para o hospedeiro, capaz de erradicar o estímulo inicial (POBER; SESSA, 2007; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Após a eliminação do agente causador da inflamação, há a ativação de mecanismos adicionais que podem conter e reverter a resposta inflamatória. Caso essa fase resolutive não ocorra de maneira bem sucedida haverá o desenvolvimento da inflamação crônica (GILROY et al., 2004). Os mediadores lipídicos, incluindo lipoxinas (LXS), resolvinas e protectinas são liberados na segunda fase da resposta inflamatória aguda favorecendo a resolução do processo (GILROY et al., 2004; NAVARRO-XAVIER et al., 2010). Como consequência, o recrutamento de neutrófilos é encerrado e eles podem sofrer apoptose. A posterior remoção de células apoptóticas é um passo importante, visto que evita a exposição do tecido a conteúdos nocivos das células necróticas, e é um pré-requisito para restaurar a função normal do tecido (MADERNA; GODSON, 2003; SCHWAB; SERHAN, 2006). A remoção das células apoptóticas é mediada por macrófagos e células dendríticas (MAJAI; PETROVSKI; FESUS, 2006). A fagocitose de células apoptóticas esta associada com a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como fator transformador de crescimento- β 1 (TGF- β 1), interleucina 10 (IL-10) e prostaglandina D2 (PGD₂), que promovem uma diminuição no recrutamento de monócitos e inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios, tais como, fator de necrose tumoral- α

(TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002; KOLACZKOWSKA et al., 2009).

No processo inflamatório também ocorre uma vasodilatação mediada principalmente pela histamina, prostaglandinas e óxido nítrico (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Outro mecanismo pelo qual esses mediadores promovem o aumento da permeabilidade vascular é através da contração das células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares (MEHTA; MALIK, 2006). O aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular resulta numa redução da velocidade do fluxo sanguíneo e na exsudação de plasma rico em proteínas para o espaço extravascular, explicando a formação do edema na inflamação aguda (KUMAR et al., 2009).

1.4.1 Mediadores envolvidos na inflamação

A resposta inflamatória aguda é impulsionada por inúmeros mediadores de origem diferentes que induzem controle de suas fases subseqüentes desde seu início a sua resolução. Os mediadores do processo inflamatório podem ser classificados mediante suas propriedades bioquímicas em: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, nucleotídeos extracelulares, citocinas e quimiocinas (MAJNO e JORIS, 2004).

1.4.1.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) podem ser liberadas quando há uma degranulação dos mastócitos. Elas são conhecidas como fatores edematogênicos, por desencadear efeitos complexos sobre a vasculatura, provocando aumento da permeabilidade microvascular em resposta a traumas, queimaduras e alergias (KUMAR et al., 2009). As conseqüências imediatas de sua libertação pelos mastócitos podem ser altamente prejudiciais em organismos sensíveis, resultando em alguns casos, no colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (REUTER et al., 2010).

Os efeitos da histamina são mediados pela ligação a quatro subtipos de receptores, H_1 , H_2 , H_3 e H_4 , acoplados a diferentes subtipos de proteínas G. Entre os quais a ativação do receptor H_1 é considerada a mais importante para o desenvolvimento dos eventos vasculares. Está bem estabelecido, que a ativação dos receptores H_1 (acoplados a $G_{q/11}$), pela histamina, ativa a isoforma β -1 da fosfolipase C ($PLC\beta$) que por sua vez hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3). O IP_3 ativa seus receptores presentes no retículo sarcoplasmático (RS) promovendo a liberação de cálcio (Ca^{2+}) desses estoques, e ainda o próprio Ca^{2+} ativa os receptores de rianodina presentes no RS aumentando a liberação de Ca^{2+} para o citosol. O Ca^{2+} presente no citosol ativa a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) que irá fosforilar e ativar os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) na membrana plasmática permitindo a entrada de Ca^{2+} e dessa forma promovendo a elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular. O Ca^{2+} se liga a calmodulina formando o complexo $4Ca^{2+}$ -calmodulina que por sua vez ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) a qual fosforila a cadeia leve de miosina e assim facilitando a função motora entre a actina e miosina, promovendo a contração das células endoteliais (YUAN, 2000). A serotonina ou 5-hidroxitriptamina pode ser produzida e liberada por mastócitos e plaquetas, promovendo a vasodilatação dependente de óxido nítrico e aumento da permeabilidade vascular (JUTEL; AKDIS; AKDIS, 2009).

1.4.1.2 Peptídeos vasoativos e fragmentos do sistema complemento

Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados de forma ativa nas vesículas de secreção (por exemplo, a substância P) ou gerados por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular. A substância P é liberada pelos neurônios sensoriais e pode promover a degranulação dos mastócitos. Outros peptídeos vasoativos são gerados através da proteólise pela trombina, fator de Hageman, ou plasmina e causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, diretamente ou induzindo a liberação de histamina dos mastócitos. O fator Hageman funciona como um sensor de dano vascular e indutor da inflamação, uma vez que ativa a cascata da calicreína e o principal produto desta cascata, a bradicinina, afeta o sistema

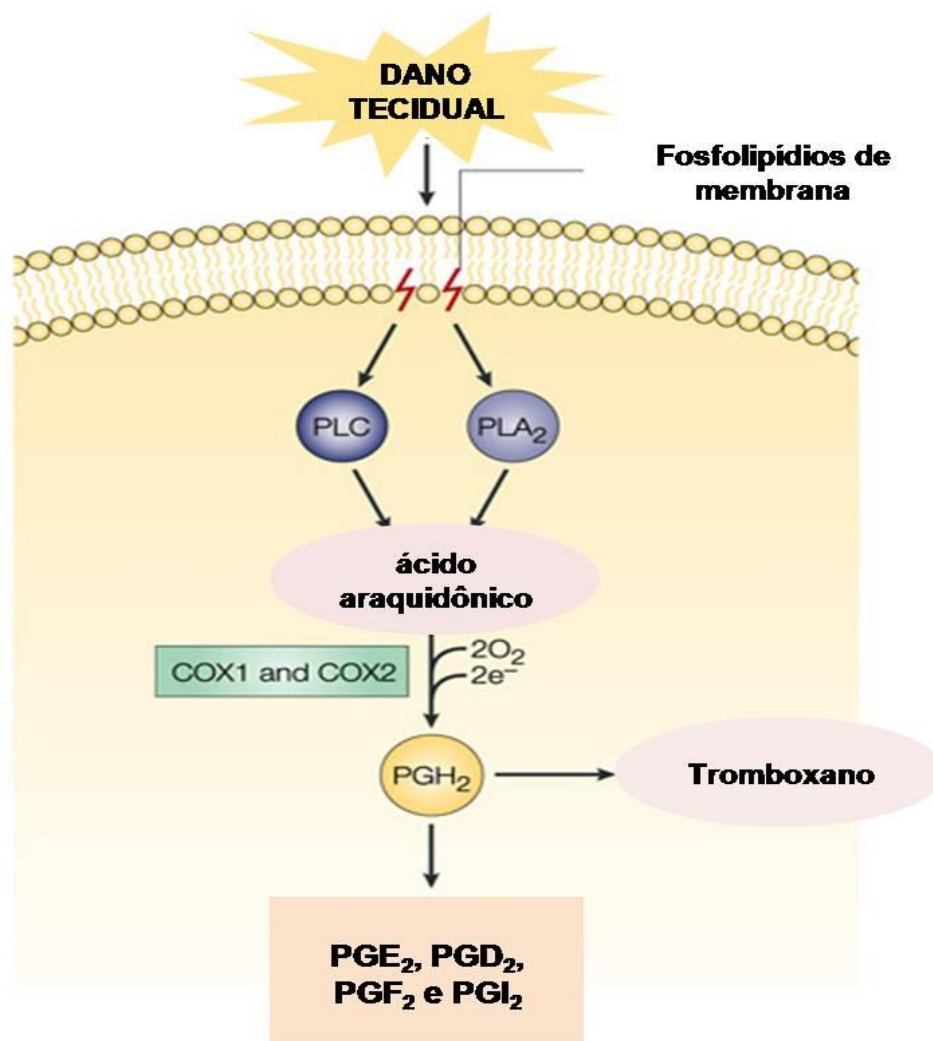
vascular, além de ser importante indutor da dor. A sensação de dor tem um papel fisiológico importante na inflamação por alertar o organismo para o estado anormal do tecido danificado (ROCK; KONO, 2008).

A ativação do sistema complemento produz os fragmentos C3a, C4a e principalmente o fragmento C5a (também conhecido com anafilatoxinas), que promovem degranulação dos mastócitos afetando, desse modo, a vasculatura e, além disso, são quimiotáticos, participando na migração dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos) e monócitos durante a inflamação (KUHR et al., 2010).

1.4.1.3 Mediadores lipídicos (eicosanóides)

Outra classe de mediadores envolvidos no processo inflamatório são os mediadores lipídicos conhecidos como eicosanóides, que compreendem os prostanóides, leucotrienos (LTs) e lipoxinas, todos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo poliinsaturado presente esterificado nos fosfolipídios de membrana celular. Após a ativação por íons Ca^{+2} intracelular, a fosfolipase A2 citosólica gera o AA a partir da fosfatidilcolina. O AA é metabolizado em eicosanóides, quer por ciclo-oxigenases (COX1 e COX2), que geram prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXA), ou por lipoxigenases, que geram leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXA) (BOWDEN, 2004; SERHAN, 2007) (Figura 3).

Os prostanóides são produzidos por duas isoformas enzimáticas, a COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa fisiologicamente em baixos níveis produzindo as PGs, entretanto sua expressão também foi mostrada em processos inflamatórios (LANGENBACH et al., 1995; MORHAM et al., 1995). A COX-2, conhecida como a forma induzível, tem sua expressão aumentada em resposta a estímulos inflamatórios, contudo, em algumas regiões cerebrais, no aparato justa glomerular renal e no endotélio vascular, essa enzima encontra-se expressa constitutivamente (WARNER; MITCHELL, 2004). Essas duas enzimas catalisam inicialmente a conversão do AA em prostaglandina G_2 (PGG_2) e depois em prostaglandina H_2 (PGH_2) que é subsequentemente convertido nos prostanóides biologicamente ativos (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_4) (HAWORTH; BUCKLEY, 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Síntese dos mediadores lipídicos

Fonte: Bowden, 2004. As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico que é liberado dos fosfolipídios de membrana pela ação da PLC e PLA₂. O AA é convertido a PGH₂ pela ação das enzimas COX-1 e COX-2.

Os eicosanóides afetam várias funções na microcirculação, incluindo coagulação, permeabilidade vascular, adesão e migração leucocitária. A PGE₂ promove vasodilatação, febre e dor durante a inflamação. Essa prostaglandina sensibiliza os neurônios aferentes primários os tornando mais responsivos a estímulos algícos como a bradicinina. Outro importante produto da COX-2 é a PGD₂, produzida pelas células do sistema imunológico, como os macrófagos, linfócitos T e células dendríticas (URADE; HAYAISHI, 2000). A PGD₂ sofre desidratação *in vitro* e *in vivo*, produzindo PGs biologicamente ativas da série J (15-dPGJ₂) (HAWORTH; BUCKLEY, 2007). Estas prostaglandinas inibem a

síntese de citocinas pró-inflamatórias como, o TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β), e aumentam a síntese de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), além disso, também inibem a migração de células mononucleares, evitando a cronificação da inflamação (HAWORTH; BUCKLEY, 2007).

Os cisteinil leucotrienos, compreendidos pelo LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam intensa vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular em regiões venulares. O LTD₄ é um potente mediador quimiotático promovendo a adesão e migração de leucócitos para a região da inflamação. O TXA₄ produz vasoconstrição e promoção da agregação plaquetária (GERRITSEN, 1996; RAJAKARIAR; YAQOOB; GILROY, 2006).

O metabolismo do AA por via das enzimas lipo-oxigenases produzem as lipoxinas (LXA), mediadores importantes para inibir a inflamação, além de promover a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual. As LXA apresentam uma atividade seletiva sobre leucócitos polimorfonucleares (PMN) e eosinófilos, impedindo a migração destas células para o foco da inflamação, além de induzir a apoptose dos neutrófilos. Contudo, elas são potentes ativadoras dos monócitos, favorecendo a migração e ativação da capacidade destas células em fagocitar corpos apoptóticos (GODSON et al., 2000; GILROY et al., 2004).

A segunda classe de mediadores lipídicos, o fator de ativação plaquetária (PAF), é gerado a partir da acetilação do ácido lisofosfatídico, e são responsáveis por ativar vários processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de leucócitos, vasodilatação, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas (HIGGS; MONCADA; VANE, 1984; SERHAN, 2007).

1.4.1.4 Sinais de perigo (nucleotídeos extracelulares)

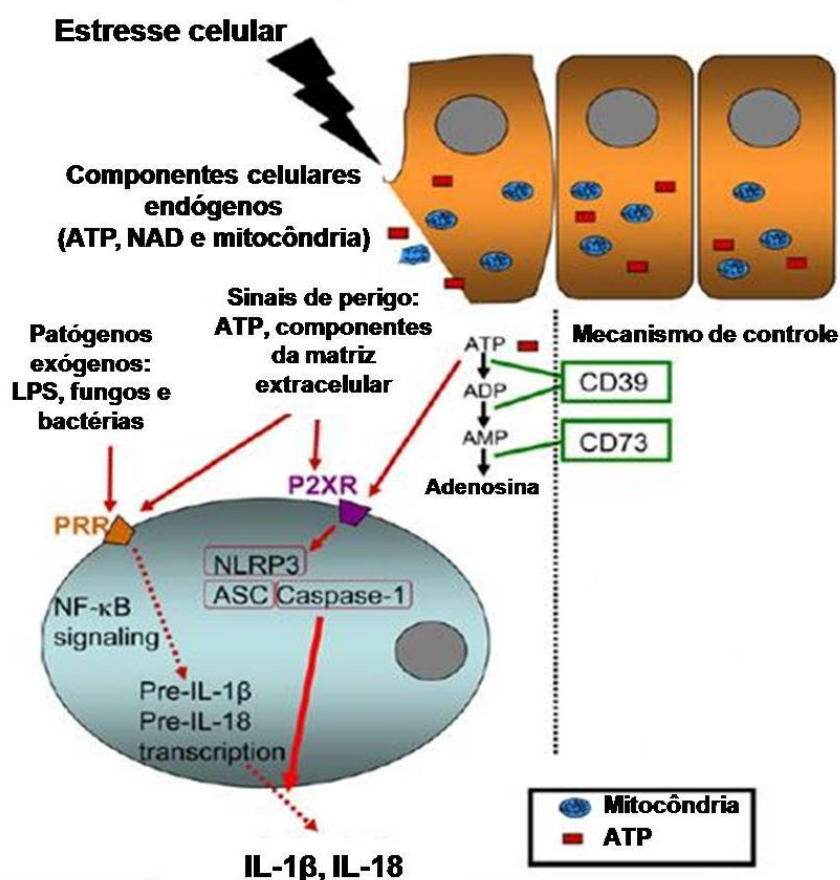
Os agentes infecciosos e seus produtos foram por muitos anos os responsáveis por ativar o sistema imunológico inato desencadeando a inflamação. O recente conhecimento de um grupo de moléculas endógenas que apresentam uma capacidade semelhante aos patógenos, em ativar a resposta imunológica, forneceu uma melhor compreensão das respostas inflamatórias ativadas por patógenos e lesões. Estas moléculas endógenas, denominadas

alarminas ou “sinais de perigo”, são constituintes de células normais que podem ser liberadas no meio extracelular durante estados de estresse celular ou danos teciduais (KLUNE et al., 2008).

O trifosfato de adenosina (ATP) é uma molécula que apresenta alta concentração intracelular, sendo liberada sobre condições de estresse celular. Em condições de homeostase, a concentração do ATP extracelular é de 10 nM. Este equilíbrio é regulado por ectonucleotidases como, CD39 e CD73, que desfosforilam o ATP a difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina (ZIMMERMANN, 2000; ROBSON; SEVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Em condições patológicas, incluindo, hipóxia, trauma, infecção, inflamação, bem como, em processos ativos, como a liberação por leucócitos (neutrófilos e macrófagos). Em adição a liberação do ATP, a ação das ectonucleotidases é inibida, favorecendo a atividade do ATP no tecido inflamado (KAHNER et al., 2006; ATARASHI et al., 2008; ZEISER et al., 2011).

Os nucleotídeos extracelulares podem modular diversas funções por meio da ligação aos receptores purinérgicos da família P2X (P2X1-7R) e P2Y (P2Y1-14R) (ROBSON et al., 1997; LAZAROWSKI; BOUCHER; HARDEN, 2003; BOURS et al., 2006). O receptor P2X7 é um canal catiônico ativado por altas concentrações de ATP, que desempenha um papel importante no processo inflamatório, por induzir a secreção de interleucina-1 (IL-1) via proteínas presentes no inflamassoma NALRP3 (criopirina) (FERRARI et al., 2006). Além disso, o ATP age como fator quimiotático para neutrófilos, ativando estas células a liberar espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHEN et al., 2006; CHEN et al., 2010). Em macrófagos os receptores P2X7 ativam estas células a produzirem IL-1, interleucina-18 (IL-18) e ROS (FERRARI et al., 2006; LUCATTELLI et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4 – Mecanismo de ação do ATP (sinal de perigo)



Fonte: Adaptado de Zeiser et al., 2011. O estresse celular promove a liberação dos sinais de perigo endógenos, ATP e mitocôndria, ou componentes da matriz extracelular. O ATP interage com seu receptor P2XR desencadeando a ativação da proteína NLRP3 do inflamassoma levando a síntese de citocinas da família IL-1.

Outro passo crítico na resposta imune é a apresentação de antígenos pelas células dendríticas (DC), que são recrutadas para o local da inflamação. O ATP promove a migração destas células para região da inflamação, por induzir a expressão de moléculas de adesão, como CD54, bem como, receptores de quimiocinas (LA SALA et al., 2002).

1.4.1.5 Citocinas e quimiocinas

Todas as células envolvidas na inflamação são passíveis de responder aos estímulos pró-inflamatórios desencadeados pelas citocinas e quimiocinas (BECK et al., 2009). As células do sistema inato são compostas por uma população de células brancas do sangue, tais como neutrófilos, monócitos, células dendríticas (DCs), natural killer (NK), eosinófilos, basófilos, bem como, os macrófagos e mastócitos residentes do tecido. Essas células controlam a invasão oportunista de uma ampla gama de vírus, fungos, bactérias e parasitas, em parte pela liberação de várias citocinas e quimiocinas, que orquestram as respostas imunes (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

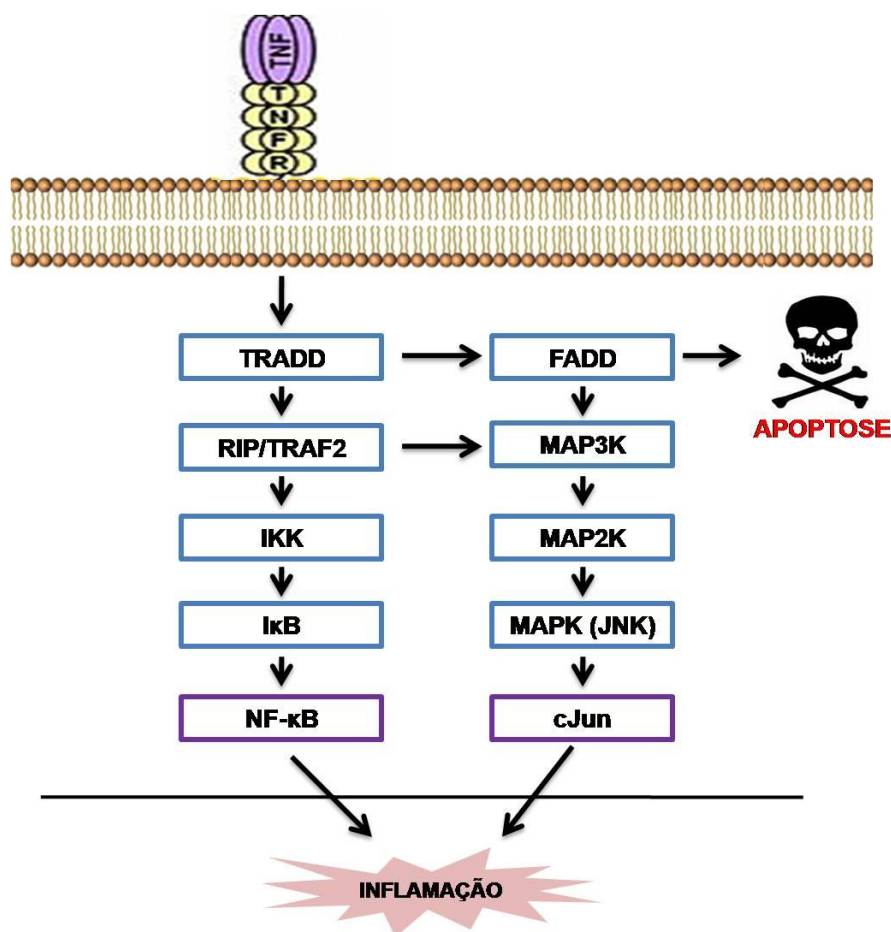
As citocinas têm um papel regulador sobre o início, a manutenção e o término das reações inflamatórias. Elas são substâncias pleiotrópicas que modulam a função de muitos tipos celulares e são determinantes para o infiltrado celular e para os efeitos sistêmicos durante a inflamação aguda. Entre as citocinas mais conhecidas, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas IL-1 β , IL-6 e a quimiocina CXCL8 (também conhecida como IL-8) são importantes na inflamação, devido aos seus papéis na patofisiologia de muitas doenças (LACY; STOW, 2011).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória importante na patogênese de diversas doenças, sendo produzida por células polimorfonucleares e mononucleares, exercendo potentes efeitos inflamatórios, tais como, indução da expressão endotelial de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (EL ALWANI et al., 2006), ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares, aumento da permeabilidade vascular, além de atuar como um fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A liberação sistêmica de TNF- α pode induzir febre e estimular a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, além de, ativar a cascata de coagulação, induzindo vasodilatação sistêmica com conseqüente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

As respostas biológicas decorrentes da ação de TNF- α envolvem, tipicamente as vias de sinalização intracelulares que ativam fatores de transcrição celular como o NF- κ B que, uma vez ativado, modula a transcrição gênica de várias proteínas pró-inflamatórias. A via das proteínas cinases

ativadas por mitógeno (MAPK) representada pelas vias ERK1/2, ERK5, JNK e p38, também são ativadas pelo TNF- α durante o processo inflamatório, essas proteínas quando ativadas fosforilam outras proteínas que regulam a transcrição de genes inflamatórios (ROTHWARF; KARIN, 1999; KAMINSKA, 2005) (Figura 5).

Figura – 5 Via de sinalização da citocina TNF- α

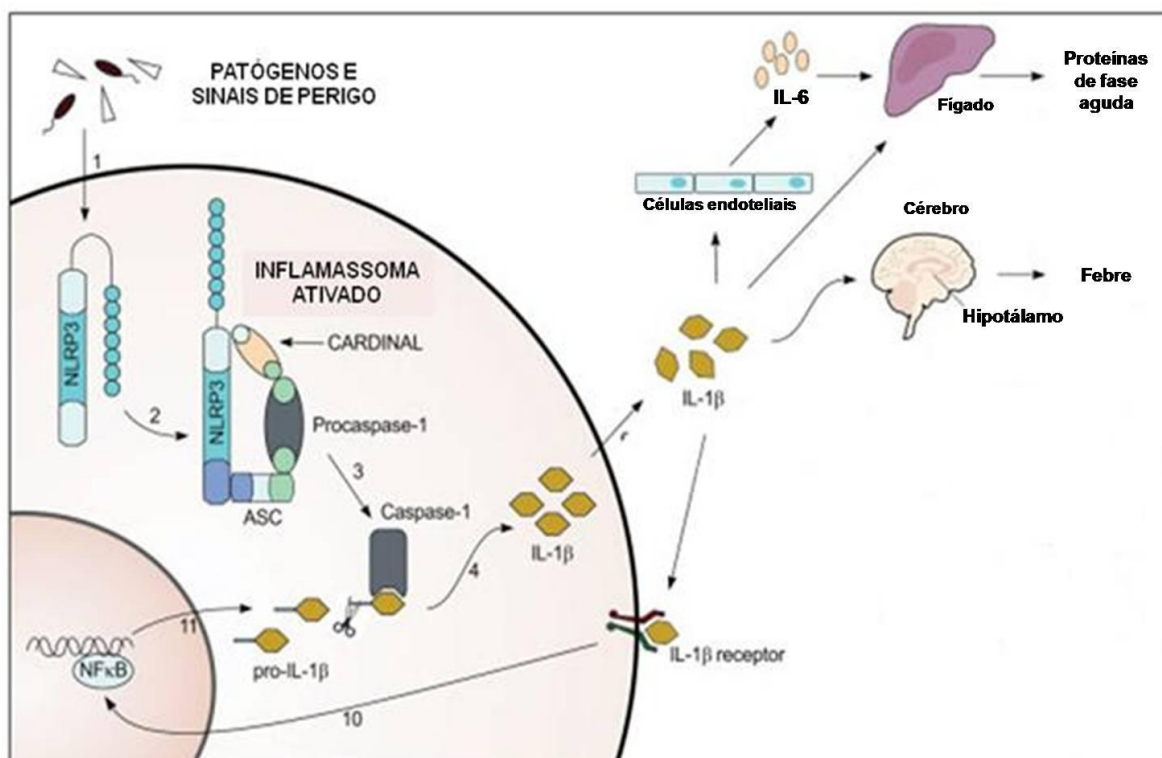


Fonte: Adaptado de Yang et al., 2005. O TNF- α ao se ligar em seu receptor (TNFR) induz o recrutamento de proteínas TRADD para formar um complexo. Esta ativação pode ativar vias de sinalização, NF- κ B ou MAPK levando a inflamação ou morte por apoptose.

Além do seu papel bem caracterizado como uma citocina inflamatória, há evidências crescentes de propriedades anti-inflamatórias do TNF- α . Embora a presença do TNF- α seja crítica para o desenvolvimento do modelo experimental da doença auto-imune encefalomielite, esta citocina também está envolvido na

resolução da desta doença (KASSIOTIS; KOLLIAS, 2001). Observações semelhantes foram feitas no modelo de colite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), onde a ausência ou neutralização de TNF- α promove uma exacerbação da doença (NAITO et al., 2003). Estas propriedades anti-inflamatórias do TNF, podem ser atribuídas, pelo menos em parte, à sua capacidade em modular a apoptose das células envolvidas na inflamação, pois é conhecido, que esta citocina induz a apoptose de células T, acelerando a resolução da resposta inflamatória (ZHENG et al., 1995). Em adição a estes dados, estudos indicam que o TNF- α suprime a inflamação aguda intestinal por aumentar a síntese local de glicocorticóides, que suprime a resposta imunológica (NOTI et al., 2010).

A interleucina 1 β (IL-1 β) esta envolvida em diversas desordens inflamatórias, incluindo diabetes, artrite reumatóide e câncer. Esta citocina é produzida em sua forma inativa, como uma pro-IL-1 β , que é transformado pela ação da proteína caspase-1 em sua forma ativa, e assim liberada no meio extracelular (EDER, 2009). Recentemente, a produção de IL-1 β tem sido associada ao inflamassoma, um complexo multiprotéico montado no citoplasma da célula, que ao reconhecer patógenos intracelulares induz a ativação da caspase-1. Diversos inflamassomas são montados com os membros da família dos receptores Nod like (NLRs), sendo importantes para o controle de infecções virais, bacterianas e fúngicas (LATZ, 2010; LACHMANN et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6 - Produção de IL-1 β pelo complexo protéico inflamassoma

Fonte: Adaptado de Lachmman et al., 2011. O inflamassoma ao ser ativado por patógenos ou sinais de perigo ativa a caspase-1 que irá clivar a pró-IL-1 β . A IL-1 β induz produção de IL-6, proteína de fase aguda e regulação da febre no hipotálamo.

A IL-1 β ativa uma cascata de sinalização que induz a transcrição de citocinas (como exemplo: IL-6 IL-8 e IL-12) e quimiocinas, como o fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e a proteína-1 inflamatória de macrófagos α/β (MIP-1 α/β), favorecendo a migração de monócitos para o foco da inflamação. Em adição, a IL-1 ativa a expressão de moléculas de adesão, o que favorece o recrutamento e ativação de linfócitos inflamatórios, além de aumentar a expressão de genes como a COX-2; fosfolipase A2 e iNOS (WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

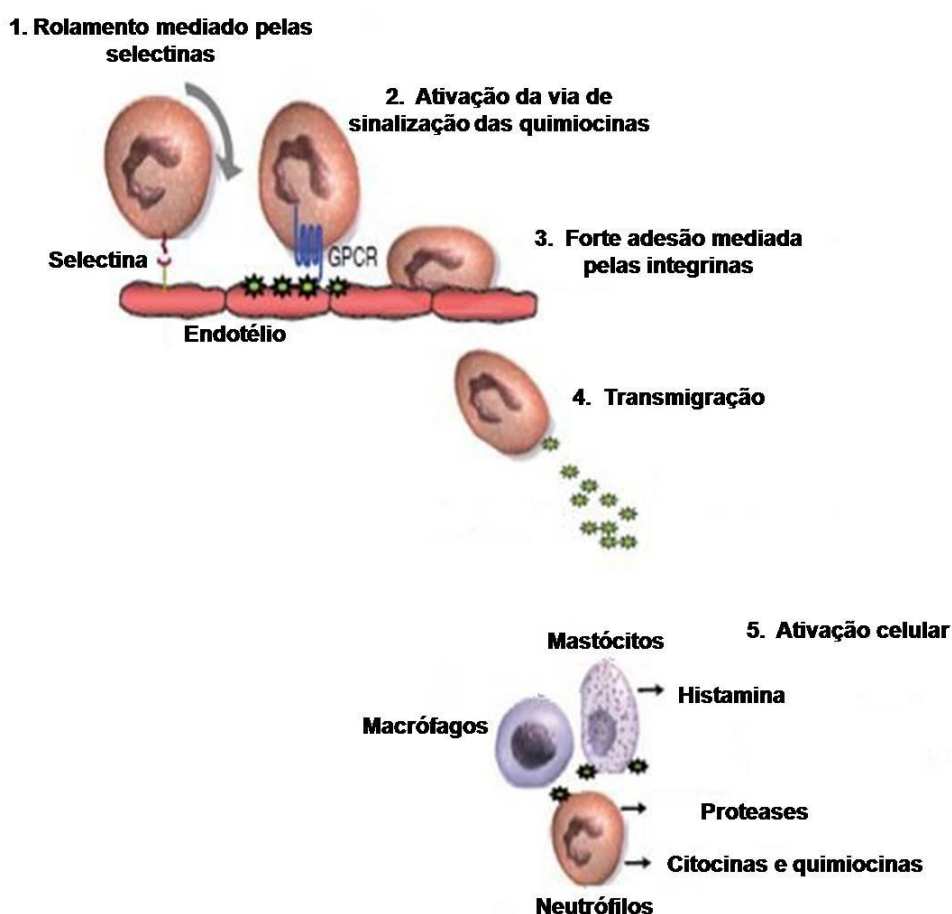
A interleucina-6 (IL-6) é outra importante citocina pró-inflamatória, que desenvolve suas ações ao interagir com um receptor presente na membrana (IL-6Ra) que está ligado a via de sinalização JAK-STAT levando a produção de citocinas, quimiocinas e recrutamento de leucócitos inflamatórios. Entretanto, a IL-6, também desenvolve efeitos anti-inflamatórios, ao interagir com seu receptor solúvel (sIL6R) ativando uma via alternativa chamada de trans-sinalização, que

esta associada a proteína transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). A proteína STAT3 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de leucócitos, inibição da ativação das células dendríticas, além de induzir a produção de IL10, que apresenta propriedades anti-inflamatórias (HEINRICH et al., 2003; FIELDING et al., 2008; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

1.5 Migração celular

A capacidade migratória das células do sistema imunológico é uma característica fundamental da resposta imune, na qual leucócitos, em geral, migram da circulação para tecidos adjacentes e são capazes de conter e destruir micro-organismos patogênicos por meio da fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas presente em seus grânulos. No entanto, essas substâncias não são específicas a ponto de destruir somente o agente agressor, mas também promovem danos teciduais (YONEKAWA; HARLAN, 2005).

A atividade migratória não é uma função intrínseca das células, mas um processo que é regulado por sinais extracelulares (LANG; RATKE, 2009). O extravasamento dos leucócitos é um processo mediado pela interação de moléculas de adesão expressas na superfície dos leucócitos e nas células endoteliais (CARLOS; HARLAN, 1994). Inicialmente, ocorre uma interação leucócito-endotélio, conhecida como rolamento, mediada por membros da família de moléculas de adesão selectinas. As Integrinas (CD11/CD18) e imunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1) são importantes para a adesão firme seguida do processo de diapedese das células (VON ANDRIAN et al., 1992). A expressão dessas moléculas é regulada por vários mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e proteínas do complemento (MOMMSEN et al., 2011) (Figura 7).

Figura 7- Mecanismo de migração celular durante a resposta inflamatória

Fonte: Adaptado de Mackay, 2008. Durante a resposta inflamatória os leucócitos sofrem um processo de rolamento, adesão e migração. Estes mecanismos são regulados pelas moléculas de adesão celular E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1. Inicialmente os leucócitos aderem transitoriamente e rolam ao longo do endotélio por meio da ligação com a E-selectina e são ativados pela ação das quimiocinas a expressarem as moléculas de integrinas. Posteriormente, ocorre uma firme adesão mediada pelas moléculas integrinas, ICAM-1 e VCAM-1 seguido da transmigração.

A família das selectinas é composta por três moléculas diferentes nomeadas por sua distribuição específica nas células. A E-selectina e P-selectina são expressas principalmente no endotélio vascular, e a L-selectina é expressa na superfície dos leucócitos e interage com moléculas de carboidratos, tais como CD34, P-selectina, e E-selectina (BARTUNKOVA et al., 2000).

As P-selectinas são armazenadas em grânulos específicos presentes nas plaquetas e células endoteliais conhecidos como corpos de Weibel-Palade. Elas

são rapidamente mobilizadas para a superfície celular em resposta a uma variedade de agentes inflamatórios como trombina, histamina, moléculas do complemento, fator de agregação plaquetária (PAF), radicais livres e citocinas (TEDDER et al., 1995; LANGER; CHAVAKIS, 2009). A expressão de P-selectina na superfície celular é geralmente de curta duração, onde ela pode se ligar às suas moléculas receptoras nos leucócitos, como a glicoproteína ligante para P-selectina-1 (PSGL-1) (LEY et al., 2007).

A molécula de adesão celular E-selectina (CD62E) é exclusivamente expressa em células endoteliais após a sua ativação por citocinas. Durante a inflamação, as citocinas IL-1 β e TNF- α são liberadas por células danificadas e essas citocinas induzem expressão de E-selectina nas células endoteliais. Os leucócitos podem se ligar via receptores complementares para E-selectina, promovendo o processo de rolamento ao longo do endotélio vascular (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2011).

O processo de rolamento desacelera os leucócitos circulantes, aproximando-os das células endoteliais, permitindo a ligação de quimiocinas, como exemplo, os membros da família CXC também conhecida como IL-8, aos seus receptores. A ativação dos receptores para quimiocinas desencadeia vias de sinalização intracelulares que ativam as integrinas dos leucócitos. A interação entre as integrinas e seus ligantes de imunoglobulinas expressas no endotélio promove uma forte adesão dos leucócitos ao endotélio, com posterior transmigração celular. Além disso, a interação dos leucócitos com as moléculas ICAM e VCAM-1 também estão envolvidas no processo de forte adesão celular (WEBER; FRAEMOHS; DEJANA, 2007).

A expressão das moléculas de adesão, selectinas, ICAM-1, VCAM-1 e as integrinas, é aumentada durante a inflamação, visto que mediadores inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-1 e quimiocina CXCL8, induzem a síntese e a expressão das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (MACKAY, 2008).

1.6 Neutrófilos

Os neutrófilos são células efectoras do sistema imune fundamentais na resistência contra patógenos extracelulares e nas fases precoces da inflamação.

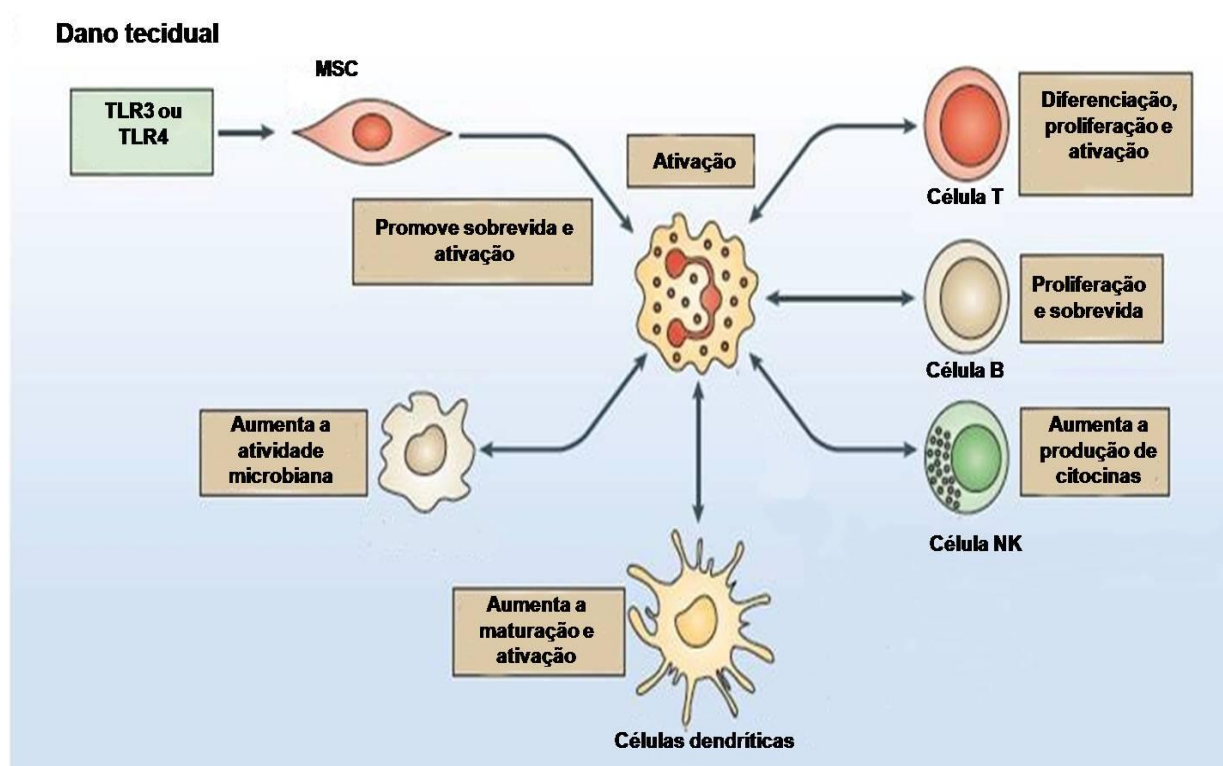
Estas células são classicamente caracterizadas por sua capacidade de agir como fagócitos e por liberar enzimas líticas presentes em seus grânulos com potencial antimicrobiano (NATHAN, 2006; BORREGAARD, 2010). Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos apresentam um tempo de meia-vida curta (10-12 horas) e não são capazes de proliferar, entretanto sua sobrevivência pode ser controlada, pela liberação de citocinas, quimiocinas e produtos microbianos. Algumas células podem regular a sobrevivência dos neutrófilos, tais como, os macrófagos e as células tronco-mesenquimais, por meio da liberação de diversos mediadores, IL-6, INF- β e GM-CSF (BRANDAU et al., 2010; PELLETIER; MICHELETTI; CASSATELLA, 2010; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Os neutrófilos expressam um vasto repertório de receptores o que permite a responsividade destas células a diversos estímulos, podendo codificar mediadores e moléculas chaves do processo inflamatório, incluindo componentes do sistema complemento, receptores Fc, quimiocinas e citocinas. Além disso, evidências recentes sugerem que os neutrófilos também podem produzir moléculas anti-inflamatórias e fatores que promovem a resolução da inflamação (MANTOVANI et al., 2011). Também foi sido sugerido que estas células podem se diferenciar em distintos fenótipos (N1 e N2) dependendo das citocinas presentes no microambiente da inflamação. Onde a presença de TGF- β induz a polarização para o perfil N2 (propriedades pró-inflamatórias), entretanto, na ausência de TGF- β , os neutrófilos polarizam para um perfil N1, que apresentam propriedades anti-inflamatórias com o aumento na sua capacidade citotóxica (FRIDLENDER et al., 2009).

Recentemente foi demonstrado, que os neutrófilos circulantes estimulados por patógenos são capazes de cooperar com outras células, como por exemplo, influenciar na maturação e ativação das células dendríticas, ativação de macrófagos (aumentando a atividade antimicrobiana), células NK (aumentando a produção de citocinas, como o INF γ), plaquetas e células endoteliais (ativando uma cascata de coagulação), bem como a estimulação de células B a produzirem imunoglobulinas (MANTOVANI et al., 2011; PUGA et al., 2011). Também se tornou evidente que estas células são importantes mediadores para a polarização do perfil T helper 17 (Th17), via envolvida na resistência a patógenos e imunopatologias. Assim, a interleucina-17 (IL-17) e citocinas

secretadas por células Th17, induzem a produção de mediadores que promovem uma granulopoiese (proliferação e acúmulo de neutrófilos). Além disso, as células Th17 produzem citocinas e quimiocinas (IL-17, CXCL8, IFN γ , TNF- α e GM-CSF) que favorecem o recrutamento, ativação e sobrevivência prolongada dos neutrófilos nos sítios inflamados, dessa forma, as células Th17 comandam e ampliam a função dos neutrófilos na resistência contra patógenos extracelulares (CUA; TATO, 2010; PELLETIER et al., 2010) (Figura 8).

Figura 8 – Modulação de células do sistema imunológico pelo neutrófilo



Fonte: Adaptado de Montovani et al., 2011. O neutrófilo é capaz de cooperar com diversas células do sistema imunológico regulando suas atividades.

Os neutrófilos são geralmente considerados como componentes passivos da resolução da inflamação, cujo destino é a morte seguida por uma rápida eliminação. No entanto, evidências sugerem que estas células também estão envolvidas na fase resolutiva, por meio da produção de mediadores lipídicos pró-resolutivos como: a lipoxina A₄ (LXA₄), as resolvinas (E₁, E₂, D₁ e D₂), as protectinas (D₁) e as maresinas (SCHWAB et al., 2007; SERHAN et al., 2009). Além disso, os neutrófilos bloqueiam e depuram as quimiocinas e citocinas

inflamatórias. Os mediadores lipídicos, como a LXA₄, a resolvina E₁ e a protectina D₁, aumentam a expressão dos receptores de quimiocina do tipo CC, o CCR5 e o CCD6, nos neutrófilos apoptóticos, favorecendo a eliminação das quimiocinas CCL5 e CCL3, específicas para linfócitos e monócitos, respectivamente (ARIEL et al., 2006). Adicionalmente, a citocina IL-10 aumenta a expressão do receptor antagonista da IL-1 (IL-1RA) nos neutrófilos bloqueando as ações pró-inflamatórias da IL-1 em seu receptor IL-1R (BOURKE et al., 2003; BAZZONI et al., 2010). Dessa forma, os neutrófilos, atuam em vários níveis da resposta inflamatória.

1.7 Macrófagos

Os macrófagos e monócitos desempenham um papel essencial na homeostase do organismo e são caracterizados por alta heterogeneidade funcional (MANTOVANI et al., 2002; GORDON; TAYLOR, 2005). São células versáteis, comumente classificadas como fagócitos mononucleares e residem em quase todos os tipos de tecido onde são identificados como populações com funções morfológicas e localizações distintas. No fígado, macrófagos são chamados de células Kupffer; no tecido ósseo, eles formam os osteoclastos e no sistema nervoso central, eles compreendem a micróglia (GORDON, 1995).

Os macrófagos residentes nos tecidos produzem baixos níveis de mediadores pró-inflamatórios, entretanto, quando estes são expostos a fatores pró-inflamatórios, como, TNF- α , INF- γ , lipopolissacarídeos ou outros produtos microbianos, estas células adquirem um fenótipo pró-inflamatório. Após a ativação, os macrófagos liberam uma série de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- α e IL-1 β . Estas citocinas são rapidamente liberadas nos locais da lesão, onde iniciam e amplificam as respostas inflamatórias, estimulando a expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas, promovendo, assim, a migração dos leucócitos para o tecido inflamado. Adicionalmente, essas citocinas induzem a produção e liberação de prostaglandinas, NO, ROS, IL-6 e PAF (BRADLEY, 2008).

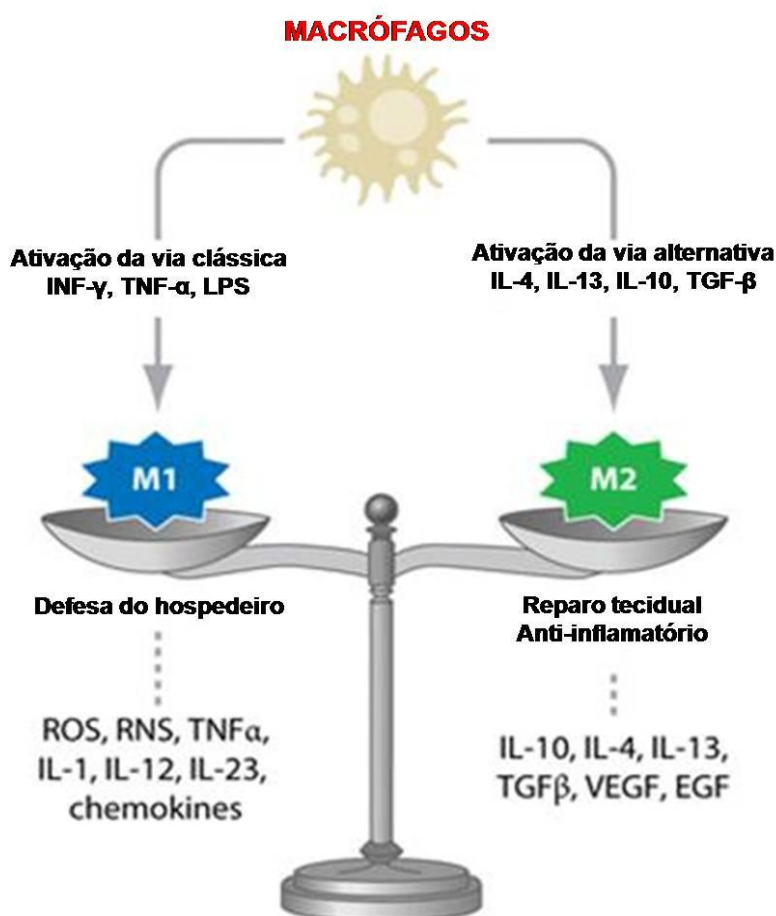
Além disso, os macrófagos desenvolvem uma atividade fagocítica nas fases iniciais da inflamação, bem como na fase resolutive eliminando os agentes causadores da inflamação e os corpos apoptóticos, evitando assim, danos

teciduais (MARQUES-DA-SILVA et al., 2011). A fagocitose é associada com uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias, NO e ROS, adicionalmente, estes mediadores estimulam os macrófagos a desenvolverem o processo de fagocitose (RANSOHOFF; PERRY, 2009).

Evidências sugerem que a atividade biológica diversificada dos macrófagos é mediada por subpopulações de células distintas fenotipicamente, que se desenvolve em resposta a mediadores presentes no microambiente inflamatório. Duas populações principais foram classificadas, em macrófagos ativados classicamente, os macrófagos “clássicos” ou M1, e os macrófagos ativados de forma alternativa, os macrófagos “alternativos” ou M2 (GORDON, 2003).

Os macrófagos M1 são ativados por citocinas como o INF- γ e TNF- α , bem como por reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e sinais de perigo. Estas células apresentam atividade microbicida e tumoricida com potente liberação de citocinas e quimiocinas, incluindo, TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-23 e CXCL8. Além disso, elas exercem atividade citotóxica que resulta da liberação de NO e ROS. Assim, os macrófagos M1 são geralmente considerados potentes células efetoras intracelulares que eliminam micro-organismos e células tumorais (LASKIN et al., 2011). (PORTA, et al., 2009). Em contraste, a ativação de macrófagos M2, é decorrente de sinais como IL-4, IL-13, IL-10 e glicocorticóides. Estes macrófagos apresentam a capacidade de fagocitar os neutrófilos apoptóticos, promoverem a angiogênese, remodelação e reparação tecidual (GORDON, 2003) (Figura 9).

Figura 9 – Polarização dos Macrófagos (M1 e M2)



Fonte: Adaptado de Laskin et al; 2011. Os macrófagos podem ser polarizados em M1 (pró-inflamatórios) ou M2 (anti-inflamatórios) dependendo das citocinas presentes no microambiente inflamatório.

A base molecular para a polarização dos macrófagos ainda não foi totalmente elucidada. Contudo, alguns achados indicam a participação da via do NF- κ B, onde foi observado que macrófagos que expressam de forma exacerbada a proteína p50, que é um regulador negativo do NF- κ B, desenvolve resistência a endotoxinas (Bonizzi, et al., 2004; Liew, et al., 2005; Saccani, et al., 2006). Além disso, outros trabalhos evidenciaram que a subunidade p50 do NF- κ B desempenha um papel essencial na polarização de macrófagos M2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Porta et al., 2008).

Como descrito acima, os macrófagos M2 desempenham um papel na resolução da inflamação e no início da reparação tecidual. Essa atividade é mediada por citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-13), lipídios bioativos (por exemplo, 15d-PGJ2, lipoxinas, resolvinas), e fatores de

crescimento (por exemplo, TGF β , VEGF). No entanto, a superprodução desses mediadores pode contribuir para aumentar a susceptibilidade a infecções e o desenvolvimento de doenças crônicas (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; LASKIN et al., 2011).

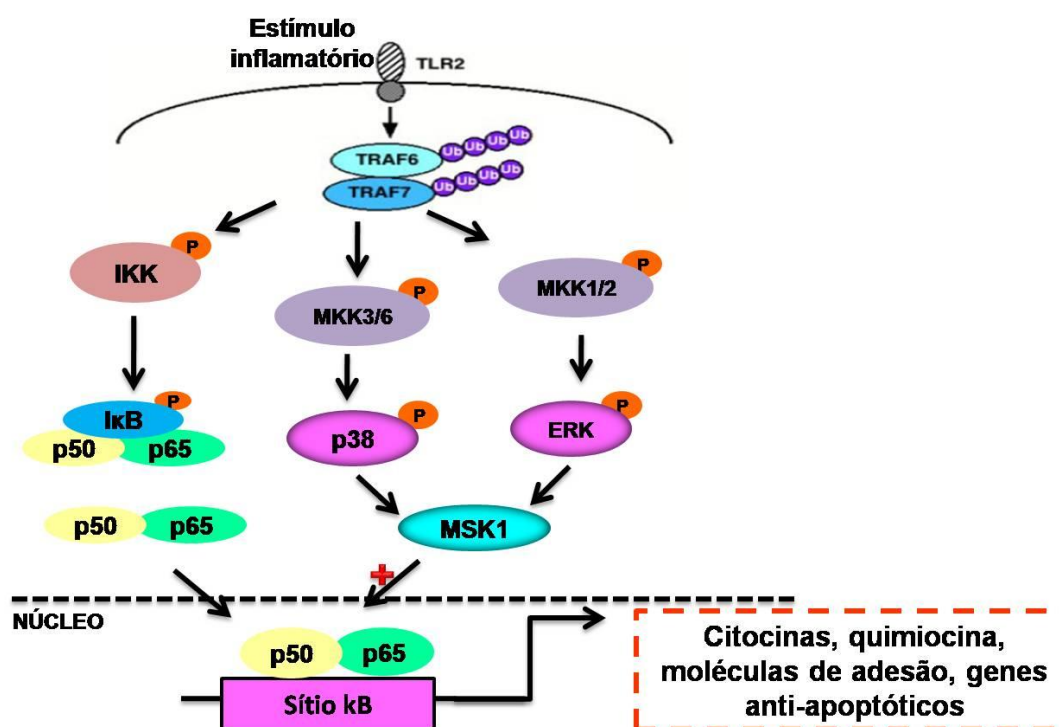
1.8 Vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória

Uma grande variedade de estímulos, incluindo citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias Gram-negativas, fungos e vários outros ligantes dos receptores do tipo Toll (TLR), ativam o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), que é essencial para o desenvolvimento da resposta inflamatória (RULAND, 2011). O NF- κ B é um nome geral para um membro de uma família de proteína Rel. A forma ativada mais comum do NF- κ B em linfócitos é o heterodímero p50:p65Rel. O NF- κ B é mantido no estado inativo no citoplasma pela ligação de uma proteína inibidora chamada de inibidor do I κ B. A ativação de um complexo de serinas cinases, a cinase do I κ B, resulta na fosforilação, na ubiquitinação e na subsequente degradação do I κ B, com a consequente liberação do NF- κ B, permitindo sua entrada no núcleo, onde exerceria seu papel de induzir ou reprimir, a transcrição de inúmeros genes envolvidos na inflamação (GHOSH; KARIN, 2002) (Figura 10). A ativação do NF- κ B citosólico desencadeia a síntese das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS), COX-2 e fosfolipase A2 (PLA2), de várias citocinas e quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), de fatores de crescimento (GM-CSF e VEGF), de moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas), de proteínas reguladoras da apoptose (Bcl-2, Bcl-xl, cIAPs), entre outras proteínas envolvidas no processo inflamatório (GARCIA-MEDIAVILLA et al., 2007; HAYDEN; GHOSH, 2008; RULAND, 2011). Além disso, o NF- κ B, também controla a expressão de genes anti-apoptóticos que protegem os leucócitos inflamatórios da morte celular programada, sendo dessa forma determinante na fase de resolução da inflamação (GILROY et al., 2004) (Figura 10).

Estímulos inflamatórios também ativam a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), envolvida na síntese de citocinas pró-inflamatórias (TURPEINEN et al., 2010). Estímulos inflamatórios podem ativar as vias de

sinalização, p38 MAPK, ERK1/2, ERK5 e JNK, controlando a proliferação e diferenciação celular (PEARSON et al., 2001). Evidências recentes indicam que mediadores inflamatórios, como a histamina, trombina e cálcio intracelular ativam a via MAPK (MEK e ERK1/2) regulando a hiperpermeabilidade vascular (WU, 2003). Em adição, a p38 MAPK promove a regulação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , bem como a expressão de enzimas importantes para o desenvolvimento da inflamação, incluindo COX-2 e iNOS (MAHTANI et al., 2001; TURPEINEN et al., 2010) (Figura 10).

Figura 10 – Vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória



Fonte: Adaptado de Yoshida et al, 2005. Estímulos inflamatórios podem ativar as vias de sinalização NF- κ B e das MAPK, levando a produção de fatores pró-inflamatórios.

Apesar dos efeitos da ouabaína no sistema imune, pouco se conhece sobre o seu papel fisiológico em processos inflamatórios. Tendo em vista o reconhecimento da ouabaína como um hormônio capaz de regular a homeostase do organismo, o presente trabalho pretendeu investigar o seu papel na inflamação. O conhecimento acerca do papel modulador da ouabaína em

processos inflamatórios pode identificar um novo alvo de ação para esse hormônio, que não tenha sido abordado anteriormente.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar o papel imunomodulador da ouabaína no processo inflamatório agudo em modelo experimental murino.

2.2 Específicos:

2.2.1 *In vivo*

No modelo de edema de pata induzido por zimosan:

- Realizar uma curva de tempo e dose-resposta com a ouabaína.
- Estudar o papel da ouabaína no edema de pata.

No modelo de peritonite induzida por zimosan:

- Avaliar o papel da ouabaína no aumento da permeabilidade vascular.
- Verificar o efeito da ouabaína na migração de leucócitos encontrados no lavado peritoneal, avaliando o número de células e as subpopulações.
- Estudar os efeitos da administração da ouabaína na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias encontradas no peritônio;
- Analisar a influência da ouabaína na apoptose e/ou necrose das células presentes no exsudado peritoneal.

2.2.2 *In vitro*

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ouabaína na produção de NO (óxido nítrico) e na citotoxicidade em cultura celular de macrófagos peritoneais murino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Para a realização desse trabalho, todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA/LTF/UFPB com o registro n. 0504/11 (ANEXO A).

Na realização dos experimentos, foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) albinos fêmeas com peso entre 25 - 30 g, os quais foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (Cbiotec/UFPB). Todos os animais foram aclimatados às condições do biotério local antes dos ensaios experimentais, sob temperatura (21 ± 1 °C) e ciclos claro-escuro controlados a cada 12 horas, alimentados com ração Labina® tipo pellets e água à vontade.

Durante os ensaios os animais foram distribuídos randomicamente em diferentes grupos e eutanasiados por deslocamento cervical.

3.1.2 Reagentes utilizados

Para a realização destes experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: ácido orto-fosfórico (MERCK®, Germany); ouabaína, zimosan, tween 20, sulfonamina p-aminobenzeno, N-naftil-etilenodiamina, nitrato de sódio, [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT), lipopolissacarídeo (LPS), iodeto de propídeo, azul de tripan, azul de Evans, cloreto de sódio (NaCl), dexametasona, May-Grunwald, Giemsa, solução fosfato tamponado (PBS), meio de cultura RPMI (SIGMA® Chemical Co., U.S.A.); soro fetal bovino (Gibco®); anti-Mac-3, anti-Gr-1, kit anexina-V (BD Biosciences®); kits TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (eBioscience®). Todas as drogas e reagentes foram preparados imediatamente antes do uso.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação da ouabaína para os testes *in vivo*

Para a realização dos testes *in vivo* a ouabaína foi preparada nas seguintes doses: 0,10 mg/kg; 0,31 mg/kg e 0,56 mg/kg. Para tanto, uma solução mãe de ouabaína era preparada na concentração de 1 mg/mL em solução fosfato tamponado estéril (PBS), imediatamente antes do uso.

3.2.2 Edema de pata induzido por zimosan

Para avaliar o efeito da ouabaína na formação do edema de pata, primeiramente, a espessura das patas traseiras dos camundongos era avaliada com o uso de um micrômetro digital (GREAT, MT – 04513) e a diferença entre as patas direita e esquerda eram consideradas como a medida basal.

Em seguida, os camundongos ($n = 8$) foram tratados por via intraperitoneal com solução PBS estéril, dexametasona 0,5 mg/kg ou ouabaína (10 mg/kg; 0,31 mg/kg e 0,56 mg/kg). Os animais do grupo PBS e ouabaína foram tratados por um, dois ou três dias consecutivos, para avaliar a influência dos dias de tratamento no efeito da ouabaína. Após 1 hora do último dia de tratamento, foi induzido o processo inflamatório pela administração de 20 μ L de zimosan a 1% (10 mg/mL) na região subplatar da pata posterior direita de cada animal. A formação do edema de pata foi mensurada em milímetro (mm) com o auxílio de um paquímetro digital nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas (CASTARDO et al., 2008).

3.2.3 Permeabilidade vascular

Para avaliar a interferência da ouabaína no aumento da permeabilidade vascular, foi seguido o modelo experimental de Kolaczowska e colaboradores (2002). Os camundongos ($n = 6$) foram tratados por via intraperitoneal com solução PBS estéril ou ouabaína (0,56 mg/kg) por três dias consecutivos.

O azul de Evans foi preparado na concentração de 10 mg/mL em solução salina estéril (0,9%), e injetado (300 μ L/animal) por via intravenosa (i.v) na região da cauda, 1 hora após o último dia de tratamento dos animais. Transcorridos 10 minutos, os animais foram desafiados com 500 μ L de

zimosan (2 mg/mL), 30 minutos após o desafio os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a lavagem do peritônio foi realizada utilizando 1,5 mL de PBS gelado.

Em seguida o lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram retirados e adicionados em uma microplaca para posterior leitura utilizando um filtro de 650 nm em um leitor de microplaca. Os resultados foram expressos como absorbância para o corante azul de Evans.

3.2.4 Peritonite induzida por zimosan

Com a finalidade de observar o efeito imunomodulador da ouabaína no processo inflamatório agudo, foi realizado o modelo de inflamação peritoneal (DOHERTY et al., 1985). Os camundongos (n = 6) foram tratados por via intraperitoneal com solução PBS estéril ou ouabaína (0,56 mg/kg) por três dias consecutivos. Após 1 hora do último dia de tratamento, os animais eram estimulados com 500 µL de zimosan na concentração 2 mg/mL, preparada em solução salina estéril (0,9%). Os animais do grupo controle recebiam 500 µL de solução salina estéril na cavidade peritoneal.

3.2.5 Coleta do lavado peritoneal

A coleta do lavado peritoneal foi realizada no tempo de 4 horas, após os desafios com zimosan. Os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Os peritônios dos animais eram expostos e 1 mL de PBS gelado, injetado na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado por 30 segundos e em seguida, realizado a punção do exudato contendo fluidos e leucócitos.

O exudato coletado foi transferido para tubos tipo *ependorf* e centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Após o período de centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C para posterior dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.

As células presentes nos *pellets* eram diluídas em azul de Turk (0,01% de cristal violeta em 3% de ácido acético), na proporção de 1:10 e

contadas com auxílio da câmara hemocitométrica, para a determinação do número de leucócitos totais. A leitura era realizada no microscópio óptico em objetiva de 40 X (Microscópio óptico; BX40, OLYMPUS).

O efeito da ouabaína era avaliado pela comparação entre o número de células inflamatórias presentes no lavado peritoneal de animais tratados com a ouabaína e a quantidade de células presentes no peritônio de camundongos que foram tratados apenas com o veículo.

3.2.6 Contagem diferencial de células do lavado peritoneal

Para a contagem diferencial das células, 100 µL da suspensão de células do lavado peritoneal, previamente diluídos 1:10, foram centrifugados em uma citocentrífuga (Citospin - BIO RESEARCH, Washington – USA) a 1500 rpm por 15 minutos para obtenção de lâminas. Estas, devidamente identificadas, foram coloradas com May-Grunwald Giemsa.

Terminada a etapa de coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos foram identificados segundo coloração e características morfológicas. Foram contadas 100 células por lâmina com auxílio de microscópio ótico com objetiva de imersão (100x) (NIKON E200, Melville, NY – EUA).

3.2.7 Análise das populações celulares por citometria de fluxo

A análise das populações celulares presentes no lavado peritoneal também foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo, por meio do tamanho e granulosidade, bem como pela marcação com os anticorpos ant-Gr-1 para identificar neutrófilos e anti-Mac-3 para identificar macrófagos (BD, Biosciences Pharmingen).

Para isto, $1,5 \times 10^6$ células foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Para impedir ligações inespecíficas, as células foram previamente mantidas na presença de 2 µL de soro de camundongo diluído (1:100) por 5 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C

com 1,5 μ L de MAC-3 e GR-1. No fim da incubação, as células foram lavadas e suspensas em 300 μ L de PBS para leitura em citômetro de fluxo.

3.2.8 Análise da apoptose dos leucócitos inflamatórios

Para realizar o estudo da influência do pré-tratamento com ouabaína na apoptose das células presentes no lavado peritoneal, foi utilizado a técnica de detecção com Anexina-V, que permite identificar as células apoptóticas com base na exposição do fosfolípídeo fosfatidilserina. A Anexina-V é uma proteína com alta afinidade pela fosfatidilserina, e a exposição destes aminofosfolípídeos ocorre quando a célula encontra-se em apoptose ou necrose. O que torna possível a diferenciação entre esses dois processos é a reação entre o iodeto de propídeo (PI) e o DNA nuclear, que ocorre de acordo com o estado de integridade da membrana plasmática.

As células obtidas do lavado peritoneal, como descrito anteriormente, foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas com 100 μ L do tampão de ligação para anexina (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 25mM CaCl_2). Posteriormente, foi adicionado 2,5 μ L de Anexina-V e 10 μ L de iodeto de propídeo (50 μ g/mL) em 5×10^5 células/100 μ L do tampão de ligação. Estas amostras foram incubadas por um período de 15 minutos a temperatura ambiente. No fim da incubação, as células foram lavadas e suspensas em 300 μ L do tampão de ligação, para posterior leitura em citômetro de fluxo.

3.2.9 Medida de fluorescência

A medida de fluorescência foi realizada em aparelho de citômetro de fluxo, BD FACSCaliburTM com 4 cores, equipado com laser de íons de argônio de 15 mW em 488 nm e com laser diodo em 635 nm, resfriados a ar. A fluorescência verde emitida pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi detectada após passagem em filtro de 530 nm (FL1). A fluorescência laranja da ficoeritrina (PE) foi detectada após passagem em filtro de 585 nm (FL2).

3.2.10 Ensaio imunoenzimático para a detecção de citocinas no sobrendante de células do lavado peritoneal

As citocinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, presentes no lavado peritoneal foram quantificadas por ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF- α , anti-IL1 β , anti-IL-6 e anti-IL-10 e incubadas por 18 h a 4 °C.

Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de SFB) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C.

Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotilado foi adicionado às placas e incubadas por uma hora. Posteriormente, foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionada. As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

3.2.11 Preparação e utilização da ouabaína nos testes *in vitro*

Para a realização dos testes *in vitro* foram utilizadas as seguintes concentrações de ouabaína: 10 nM, 100 nM e 1000 nM. Para tanto, foi preparada uma solução mãe na concentração de 1 mM em meio RPMI estéril, posteriormente, essa solução foi filtrada em filtro milipore de 13 mm de diâmetro (MILIPORO, Japão).

3.2.12 Determinação da citotoxicidade da ouabaína

Para a avaliação da citotoxicidade da ouabaína em macrófagos murinos, camundongos fêmeas com 8 a 10 semanas de idade foram estimuladas com 1 mL de tioglicolato na cavidade peritoneal. Após 5 dias, os animais foram eutanasiados para obtenção dos macrófagos peritoneais. Para tanto, 10 mL da solução PBS estéril suplementada com 3% de soro fetal bovino (SBF) foram injetados na cavidade peritoneal, e após 30 segundos de massagem, o lavado foi recuperado.

As células foram centrifugadas a 1200 rpm a 4 °C por 10 minutos e ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI completo (RPMI + 10% SBF, 100 U.I. de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e a viabilidade determinada utilizando o corante Azul de Trypan. As células foram ressuspendidas na concentração de 4×10^5 células/mL de meio RPMI completo e distribuídas em poços de placa de 96 poços (100 µL/poço). Em seguida, as células eram cultivadas por 24 horas, na presença ou na ausência de 10 µL de lipopolissacarídeo (LPS) a 10 µg/mL, seguida da adição ou não de 10 µL de diferentes concentrações de ouabaína (10 nM, 100 nM e 1000 nM). Após a incubação por 24 horas os sobrenadantes foram coletados para posterior doseamento de NO e a viabilidade celular foi determinada.

3.2.13 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Neste método, o MTT, brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO e em álcool ácidos (REILLY et al., 1998).

Após 24h de cultura celular, o sobrenadante foi retirado para dosagem de óxido nítrico (NO), como descrito acima. Às células que permaneciam nos poços da placa foram adicionados 90 µL de meio RPMI completo e 10 µL de uma suspensão de MTT a 5 mg/mL. Essas suspensões celulares foram incubadas por 24 horas, à temperatura de 37° C e 5 % de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO eram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazan formado. A viabilidade celular era quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device). A média dos valores das absorbâncias obtida nas células não tratadas foi considerada como 100 % de viabilidade (MOSMANN, 1983; WILSON, 2000).

3.2.14 Determinação dos níveis de NO

A produção de NO foi avaliada *in vitro* pela dosagem do seu produto de degradação mais estável, o nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como reação de Griess (GREEN et al., 1982). Neste método, o nitrito, quando presente na amostra, reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm.

Foram adicionados 100 µL de reagente de Griess a 100 µL dos sobrenadantes obtidos da cultura com macrófagos peritoneais murino. Esse reagente é constituído pela mistura de duas soluções A e B na proporção 1:1,

que foram preparadas imediatamente antes do uso. A solução A é constituída por: naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a solução B por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Após reagir por 10 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura utilizando filtro de 550 nm em leitor de microplaca (Spectramax 190 – Molecular Device). Os resultados em μM foram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 μM).

3.2.15 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e a diferença entre os diferentes grupos foi avaliada por teste *t* e análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância mínimo considerado foi 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados pelo programa de análise o WinMDI 2.9. Este programa analisa os dados de cada experimento em percentual e os resultados são demonstrados com um experimento representativo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

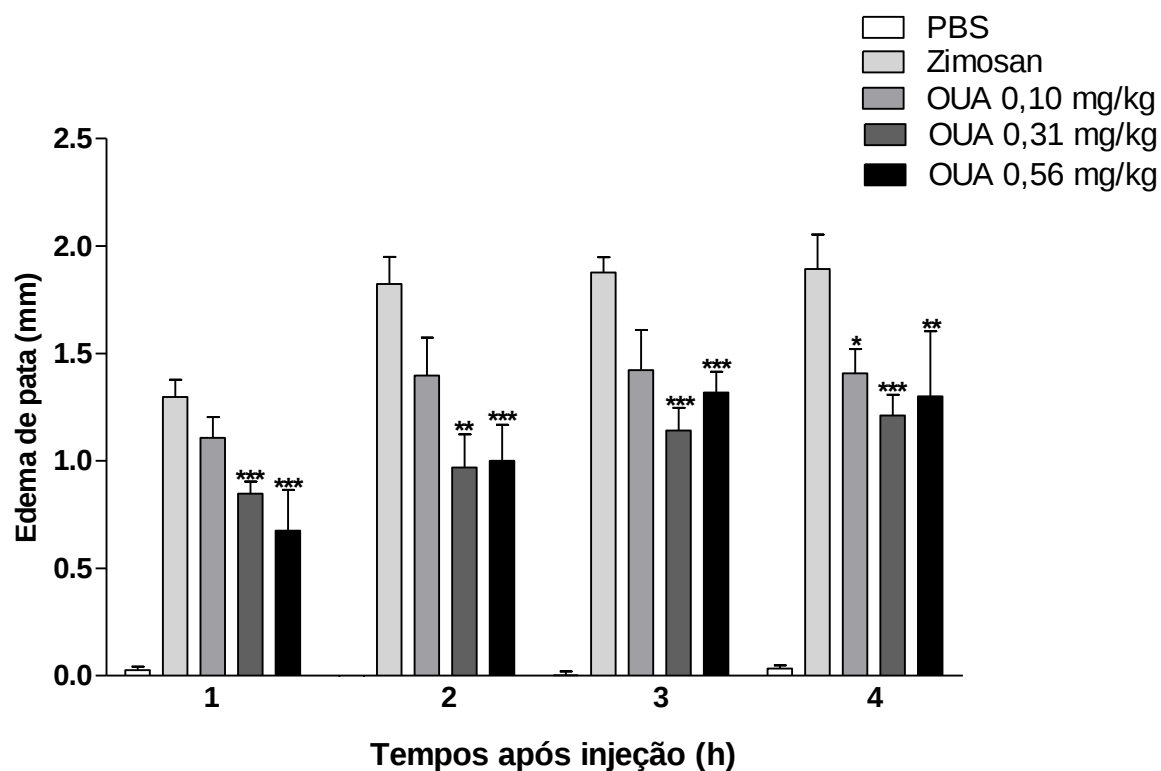
4.1 Avaliação do efeito imunomodulador da ouabaína em modelos de inflamação aguda *in vivo*

4.1.1 Curva dose-resposta do efeito da ouabaína no edema de pata induzido por zimosan

O edema de pata é um modelo de fácil manipulação que tem sido bastante utilizado para triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório. O zimosan é um componente da parede celular da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, que produz intensa resposta inflamatória acompanhada pela liberação de mediadores como a histamina, bradicinina, prostaglandinas e citocinas, além de ativar a via alternativa do sistema complemento (DUDHGAONKAR et al., 2004).

O resultado apresentado no gráfico 1 indica que houve um aumento do volume da pata dos animais estimulados com zimosan (1%) em todos os tempos avaliados (1 – 4 horas), em comparação com o grupo estimulado apenas com PBS. Nesse experimento, foi realizada uma curva dose-resposta do pré-tratamento dos animais com ouabaína. No gráfico 1 pode ser visualizado que a dose de 0,10 mg/kg de ouabaína inibiu o edema induzido por zimosan apenas no período de 4 horas. Entretanto, as doses de 0,31 mg/kg e 0,56 mg/kg de ouabaína foram capazes de reduzir a formação do edema em todos os tempos estudados.

Gráfico 1 – Curva dose-resposta do tratamento com ouabaína na formação do edema de pata induzido por zimosan

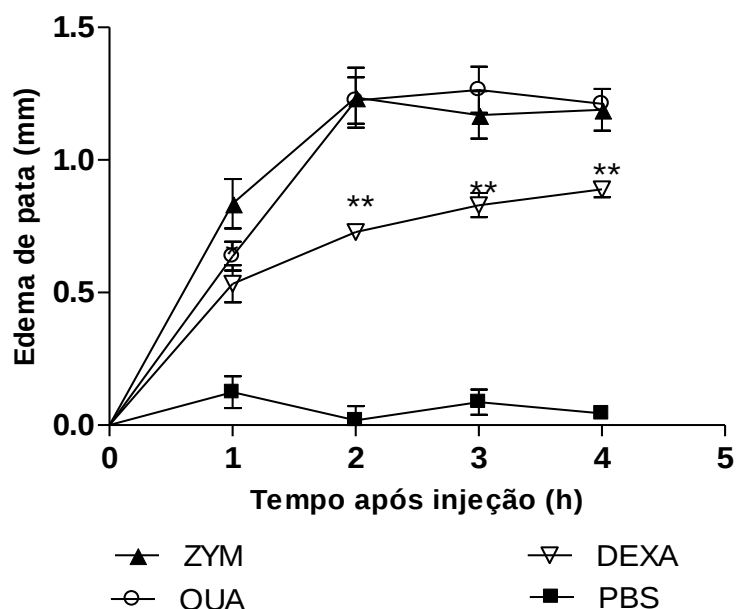


Os camundongos ($n = 8$) foram pré-tratados por três dias consecutivos com ouabaína nas doses de 0,10 mg/kg, 0,31 mg/kg e 0,56 mg/kg. Uma hora após o último dia e tratamento os animais receberam injeção intraplantar de zimosan na pata esquerda e apenas PBS na pata direita, exceto o grupo PBS que recebeu apenas PBS em ambas as patas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados pelo programa Graphpad Prism usando o teste t seguido do teste não pareado, onde todos os grupos foram comparados com o grupo controle zimosan onde, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram considerados significativos.

4.1.2 Avaliação do pré-tratamento com ouabaína durante um dia no modelo de edema de pata induzido por zimosan

Neste mesmo modelo, depois da realização da curva dose-resposta, foi estudado a interferência do período de tratamento com a ouabaína na dose de 0,56 mg/kg, que tem sido utilizada em trabalhos anteriores (RODRIGUES-MASCARENHAS; DOS SANTOS; RUMJANEK, 2006; DE PAIVA et al., 2011). Os resultados apresentados no gráfico 2 indicam que houve um aumento do volume da pata dos animais estimulados com zimosan (1%) em todos os tempos avaliados (1 – 4 horas), em comparação com o grupo estimulado apenas com PBS. O pré-tratamento com ouabaína, por apenas um dia, não inibiu a formação do edema de pata induzido por zimosan nos tempos analisados. O pré-tratamento com a dexametasona, droga padrão, mostrou-se eficaz em atenuar a formação do edema de pata induzido por zimosan, se comparado ao grupo não tratado, em todos os tempos estudados.

Gráfico 2 – Efeito de um dia de tratamento com ouabaína no edema de pata induzido por zimosan

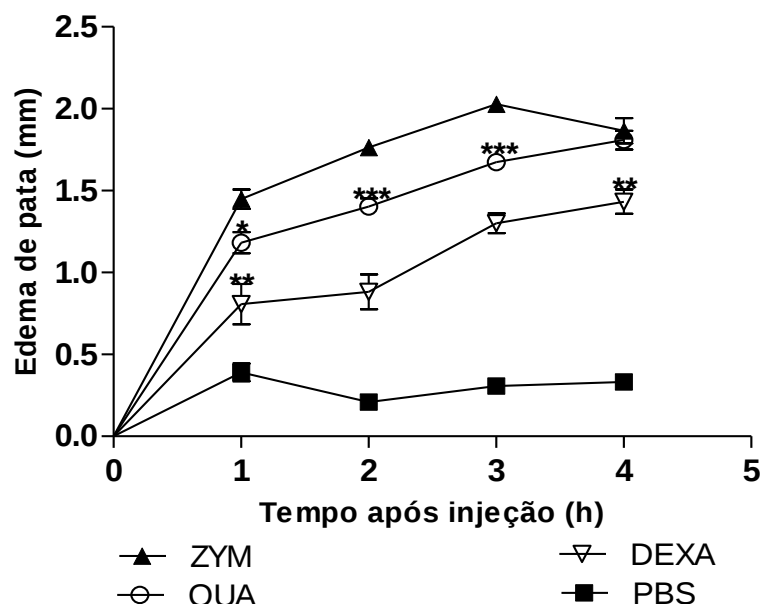


Os camundongos (n= 8) foram pré-tratados por um dia com a dose de 0,56 mg/kg de ouabaína (i.p). Uma hora após o tratamento os animais receberam injeção intraplantar de zimosan na pata esquerda e apenas PBS na pata direita, exceto o grupo PBS que recebeu apenas PBS em ambas as patas. A dexametasona (0,5 mg/kg - i.p) foi utilizada como grupo controle e administrada 1 horas antes do estímulo com o agente flogístico. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados pelo programa Graphpad Prism usando o teste t seguido do teste não pareado, onde todos os grupos foram comparados com o grupo controle zimosan onde, $**p < 0,01$ foi considerado significativo.

4.1.3 Avaliação do pré-tratamento com ouabaína durante dois dias consecutivos no modelo de edema de pata induzido por zimosan

Os resultados apresentados no gráfico 3 indicam que houve um aumento do volume da pata dos animais estimulados com zimosan (1%) em todos os tempos avaliados (1 – 4 horas), em comparação com o grupo estimulado apenas com PBS, e que o pré-tratamento com ouabaína, por dois dias consecutivos, apresentou uma redução no volume da pata em aproximadamente 20% no período de 1 a 3 horas. Entretanto, não houve diminuição do edema formado no período de 4 horas. O pré-tratamento com a dexametasona, droga controle, foi capaz de atenuar a formação do edema de pata induzido por zimosan, se comparado ao grupo não tratado, em todos os tempos analisados.

Gráfico 3 – Efeito do tratamento com ouabaína por dois dias consecutivos no edema de pata induzido por zimosan



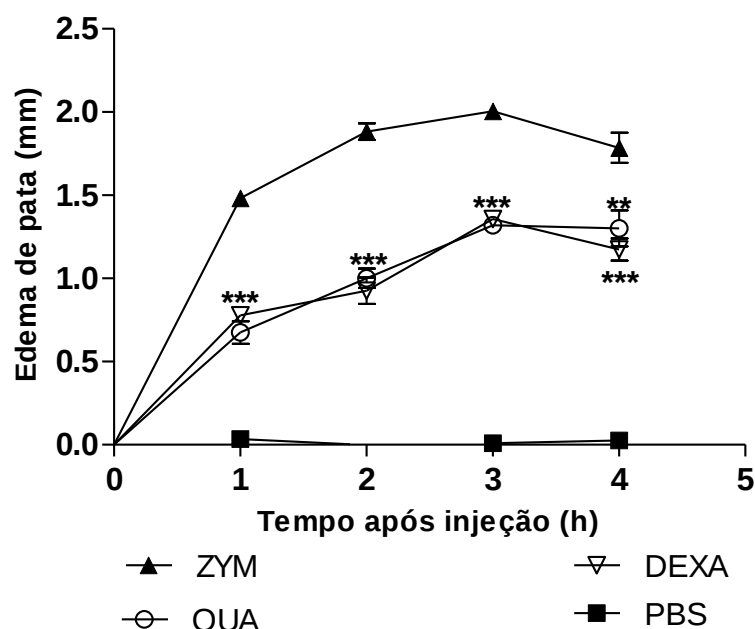
Os camundongos (n= 8) foram pré-tratados por dois dias consecutivos com a dose de 0,56 mg/kg de ouabaína (i.p). Uma hora após o tratamento os animais receberam injeção intraplantar de zimosan na pata esquerda e apenas PBS na pata direita, exceto o grupo PBS que recebeu apenas PBS em ambas as patas. A dexametasona (0,5 mg/kg - i.p) foi utilizada como grupo controle e administrada 1 horas antes do estímulo com o agente flogístico. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados pelo programa Graphpad Prism usando o teste t seguido do teste não pareado, onde todos os grupos foram comparados com o grupo controle zimosan onde, *p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001, foram considerados significativos.

4.1.4 Avaliação do pré-tratamento com ouabaína durante três dias consecutivos no modelo de edema de pata induzido por zimosan

Os resultados apresentados no gráfico 4 demonstram que houve um aumento do volume da pata dos animais estimulados com zimosan (1%) em todos os tempos avaliados (1 – 4 horas), em comparação com o grupo estimulado apenas com PBS, e que o pré-tratamento com ouabaína, por três dias consecutivos, reduziu o volume das patas em 54,4%; 47,1%; 34,7% e 26,9% em 1, 2, 3 e 4 horas respectivamente. O pré-tratamento com a dexametasona, droga padrão, mostrou-se eficaz em reduzir a formação do edema de pata induzido por zimosan, se comparado ao grupo não tratado, em todos os tempos estudados.

Este conjunto de dados evidenciam que a ouabaína apresenta uma atividade anti-inflamatória e que este efeito é melhor observado quando os animais são pré-tratados por 3 dias consecutivos na dose de 0,56 mg/kg.

Gráfico 4 – Efeito do tratamento com ouabaína por três dias consecutivos no edema de pata induzido por zimosan



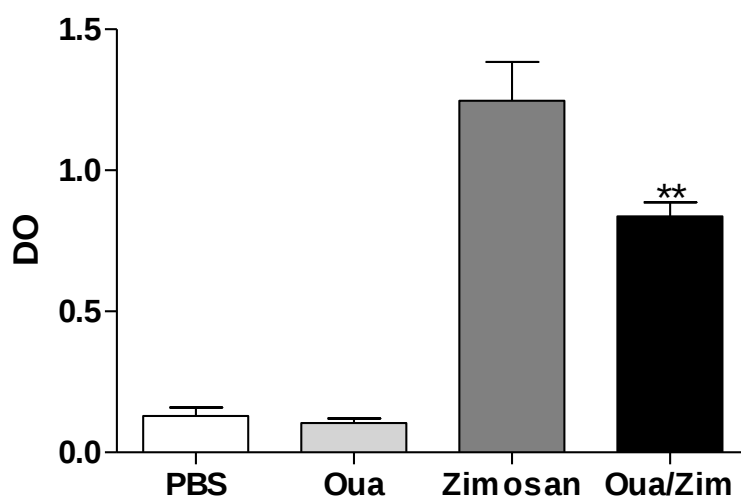
Os camundongos ($n = 8$) foram pré-tratados por três dias consecutivos com a dose de 0,56 mg/kg de ouabaína (i.p). Uma hora após o tratamento os animais receberam injeção intraplantar de zimosan na pata esquerda e apenas PBS na pata direita, exceto o grupo PBS que recebeu apenas PBS em ambas as patas. A dexametasona (0,5 mg/kg - i.p) foi utilizada como grupo controle e administrada 1 hora antes do estímulo com o agente flogístico. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados pelo programa Graphpad Prism usando o teste t seguido do teste não pareado, onde todos os grupos foram comparados com o grupo controle zimosan onde, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, foram considerados significativos.

4.1.5 Efeito da ouabaína no aumento da permeabilidade vascular induzida por zimosan

Durante a resposta inflamatória ocorre um aumento na permeabilidade microvascular, acarretando perda de proteínas plasmáticas e de fluido para o tecido, promovendo assim, a formação de eventos característicos da inflamação como edema, vermelhidão e dor (KUMAR et al., 2009).

No modelo de aumento na permeabilidade vascular induzida com zimosan (1 mg/mL) utilizando o corante azul de Evans (10 mg/mL i.v), foi evidenciado que, o estímulo com zimosan, aumentou a permeabilidade vascular em aproximadamente 90% quando comparado ao grupo tratado com o veículo (PBS). O pré-tratamento apenas com a ouabaína não alterou a permeabilidade vascular. Contudo, o pré-tratamento por três dias consecutivos com a ouabaína (0,56 mg/kg i.p) reduziu o aumento na permeabilidade vascular em 33% após a indução do estímulo inflamatório quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo (Gráfico 5).

Gráfico 5- Efeito do pré-tratamento com ouabaína sobre alterações na permeabilidade vascular induzida com zimosan



Camundongos Swiss ($n = 6$) foram pré-tratados com 0,56 mg/kg de ouabaína (i.p) ou solução PBS por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último dia de tratamento os animais foram estimulados com zimosan (i.p). Os resultados foram expressos como absorbância para o corante azul de Evans presente no exsudato peritoneal. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados pelo programa Graphpad Prism usando ANOVA seguido do pós teste de Tukey, onde todos os grupos foram comparados com o grupo controle zimosan e $**p < 0,01$ foi considerado significativo.

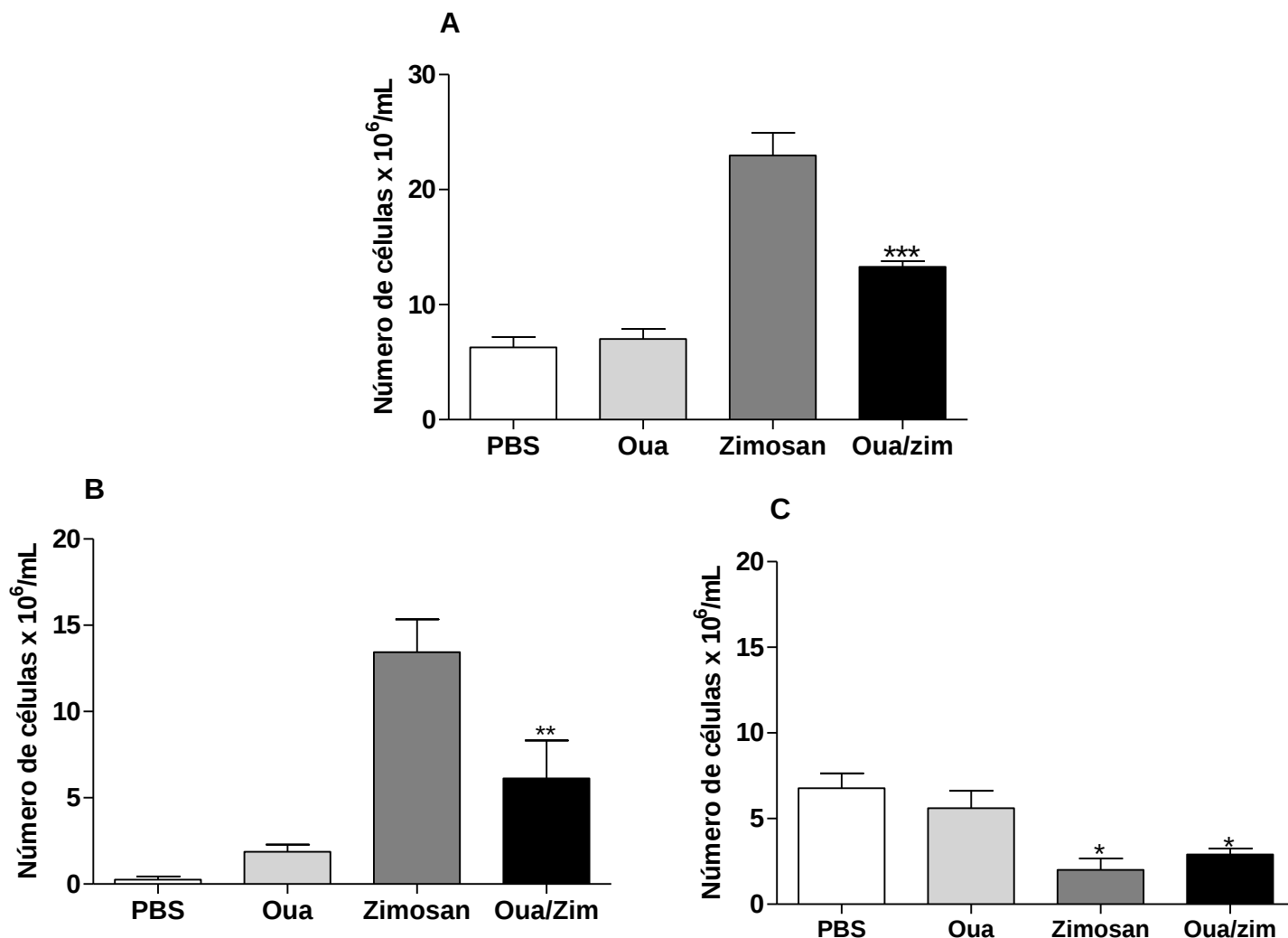
4.1.6 Efeito da ouabaína na migração celular induzida por zimosan

Além da atividade anti-edematogênica da ouabaína, foi também avaliada a sua capacidade em interferir na migração leucocitária para a região da inflamação, utilizando para tanto, o modelo de peritonite induzida por zimosan.

Na figura 11A analisamos que a injeção com zimosan aumentou o número de leucócitos totais na cavidade peritoneal em 70% quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo (PBS). O pré-tratamento apenas com ouabaína não interfere no número de leucócitos totais. Entretanto, o pré-tratamento com ouabaína promoveu uma redução de 42% no número de células totais quando comparado ao grupo zimosan.

Com relação aos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares que migraram para a cavidade peritoneal, 4 horas após o estímulo inflamatório, observamos que os PMN são as células predominantes no exsudado inflamatório (98%) (Figuras 11B e 11C) e que tratamento dos animais com ouabaína inibiu em 54% a migração destas células para o peritônio (Figura 11B). Por outro lado, é possível observar uma redução no número de células mononucleares nos animais estimulados com zimosan. O pré-tratamento com ouabaína não interferiu no número destas células quando comparado ao grupo zimosan (Figura 11C). Também é possível analisar que o tratamento apenas com ouabaína não interferiu no número de células PMN e mononucleares presentes no exsudato peritoneal (Figuras 11B e 11C).

Figura 11 – Efeito da ouabaína no número de leucócitos total e diferencial no modelo de peritonite induzida por zimosan



Camundongos Swiss (n = 8) foram tratados com 0,56 mg/kg de ouabaína (i.p) ou solução PBS por 3 dias consecutivos. Uma hora após o último dia de tratamento os animais foram estimulados com zimosan (i.p). Quatro horas após o desafio com zimosan, o exsudato do peritônio foi coletado, e o número e tipo de células que migraram determinado. **A**, o número de leucócitos totais. **B**, o número de células polimorfonucleares e **C** o número de células mononucleares. Cada coluna representa o número de células x 10⁶/mL. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e analisados pelo programa Graphpad Prism usando ANOVA seguido do teste de Tukey. Em **A** e **B** o grupo Oua/zimosan foi comparado com o grupo zimosan e, em **C**, o grupo zimosan e Oua/zimosan foi comparado ao grupo PBS; e *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 foi considerado significativo.

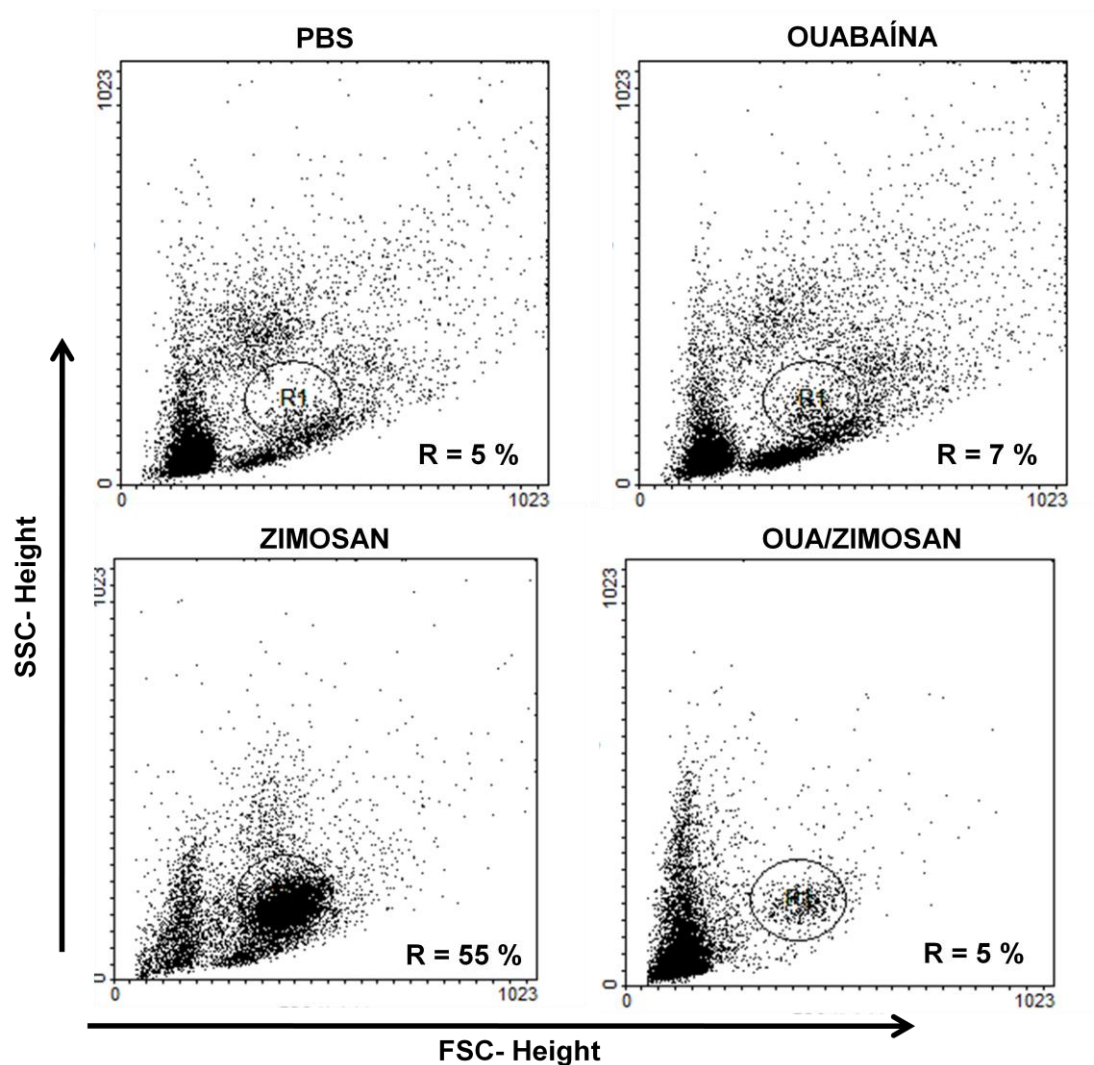
4.1.7 Análise das populações celulares por citometria de fluxo

O resultado anterior demonstra que a ouabaína foi capaz de reduzir o número de células PMN no modelo de peritonite induzida por zimosan. As células obtidas no lavado peritoneal também foram avaliadas por citometria de fluxo, e os parâmetros de tamanho e granulosidade foram estudados. Além disso, as sondas anti-GR-1 foram usadas para identificar os neutrófilos, anti-MAC-3 para identificar os macrófagos. As células marcadas com anti-GR-1 e anti-MAC-3 representam os monócitos.

Através da análise do tamanho e granulosidade das células, foi observado que o zimosan aumentou a proporção de células granulosas (Figura 12). Por outro lado, a ouabaína foi capaz de reduzir este efeito (Figura 12).

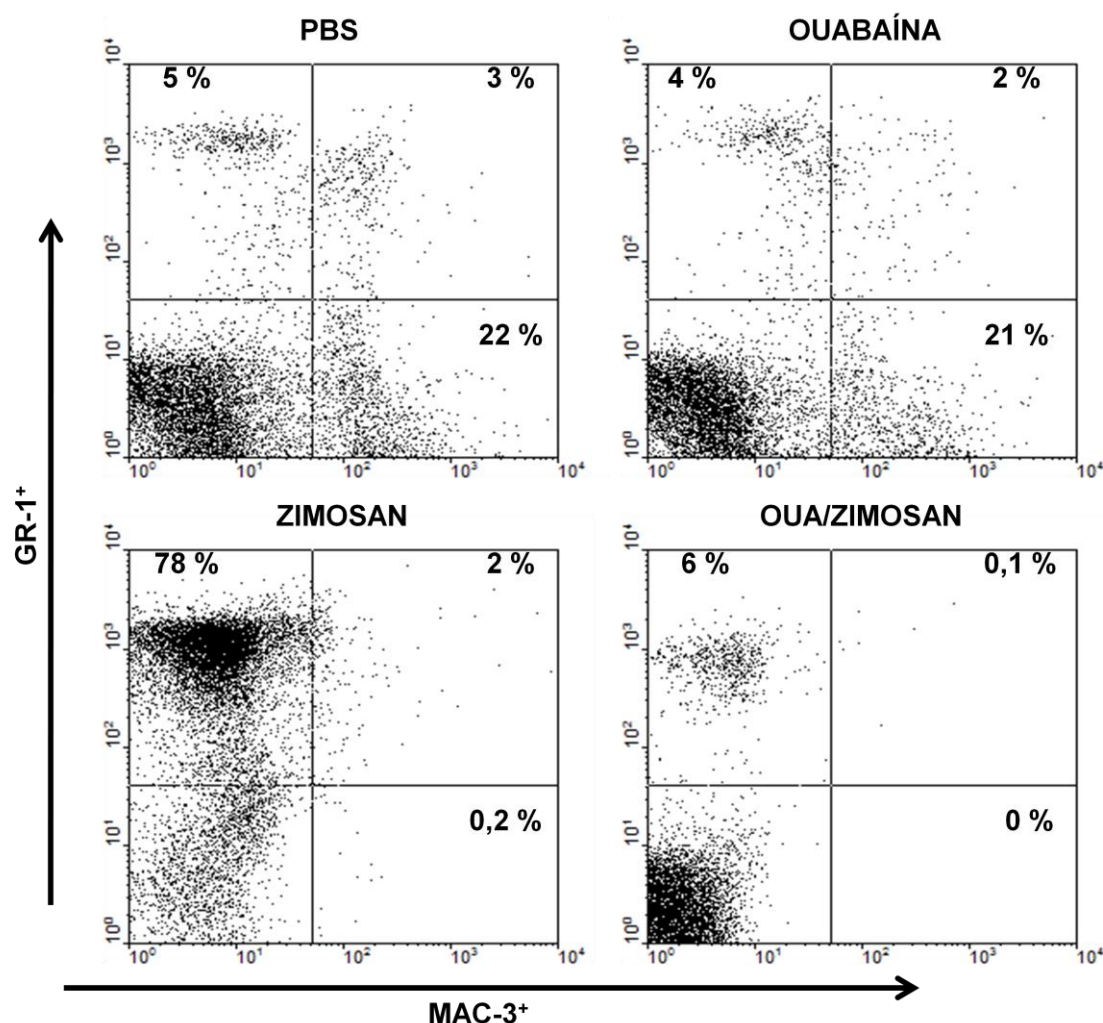
Nossos resultados demonstram ainda que, em condições fisiológicas, quando se analisa macrófagos e neutrófilos, há uma prevalência de macrófagos (22%) e que o estímulo com zimosan reduziu o número destas células (0,2%), estando de acordo com outros dados encontrados na literatura (KOLACZKOWSKA et al., 2010) (Figura 13). A ouabaína por si só, não interfere nas populações celulares estudadas presentes na cavidade peritoneal (Figura 13). Entretanto, transcorrido 4 horas do desafio com zimosan, foi possível observar um aumento no número de neutrófilos em 70 %, caracterizando um processo inflamatório (Figura 13). O pré-tratamento com ouabaína reverteu o número de neutrófilos em aproximadamente 60 % quando comparado ao grupo zimosan (Figura 13).

Figura 12 – Avaliação do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células presentes no lavado peritoneal



Foi realizada a análise por citometria de fluxo o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células obtidas do lavado peritoneal. Os números referentes as regiões delimitadas representam o percentual de células com maior granulosidade que correspondem, em sua maioria, aos neutrófilos. Os resultados foram obtidos utilizando 9 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9.

Figura 13 – Análise das subpopulações celulares presentes no lavado peritoneal



Foi realizada a análise por citometria de fluxo, das células obtidas do lavado peritoneal, utilizando para a marcação das moléculas de superfície as sondas, anti-GR-1 para neutrófilos e anti-MAC-3 para macrófagos. Os números representam a percentagem de neutrófilos (GR-1⁺), macrófagos (MAC3⁺) e monócitos (GR-1⁺ e MAC3⁺). Os resultados foram obtidos utilizando 9 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9.

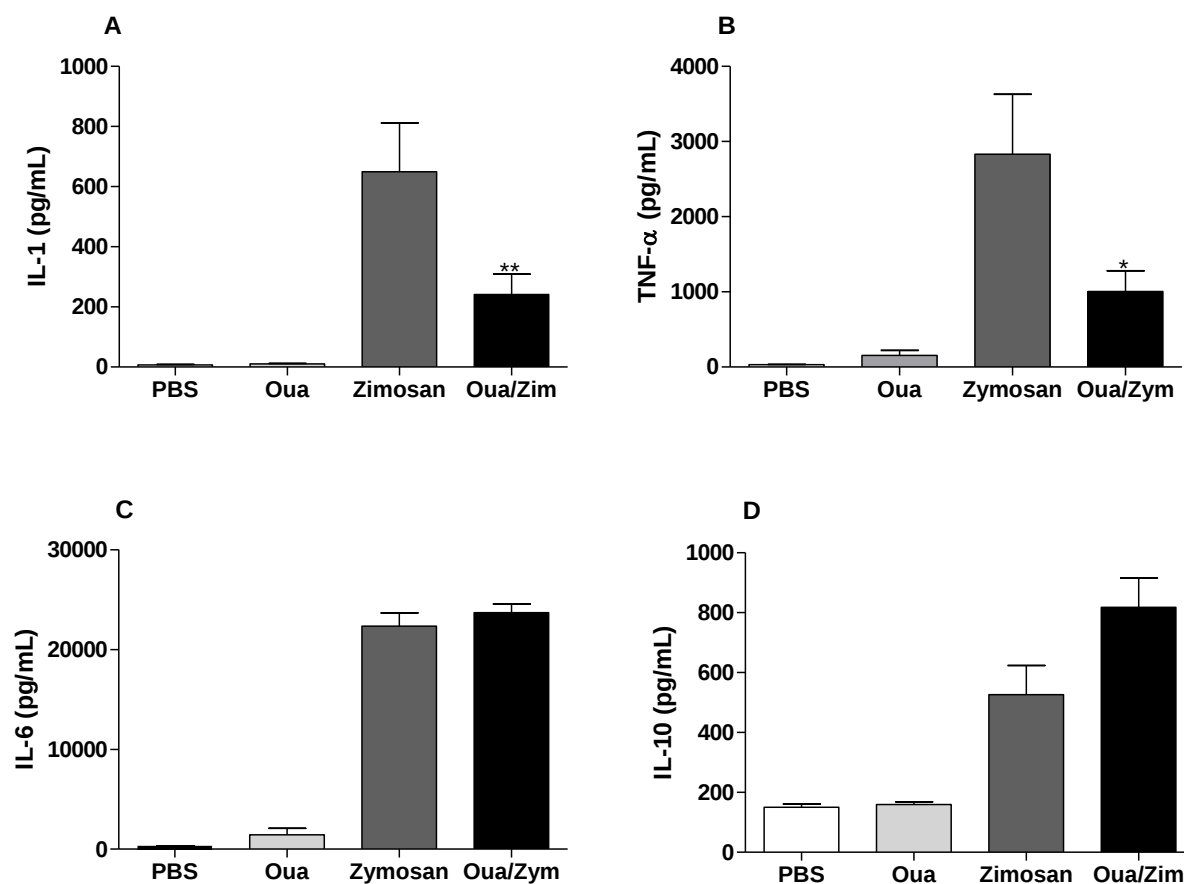
4.1.8 Efeito da ouabaína sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória

Nossos resultados desmontaram que a ouabaína é capaz de interferir na migração dos neutrófilos para a região da inflamação, e é conhecido que, vários mediadores, dentre eles as citocinas TNF- α , IL-1- β , IL-6 e IL-10 estão envolvidos no processo de migração e permanência destas células durante a inflamação. Portanto, os níveis dessas citocinas foram avaliados para verificar se a redução do influxo dos neutrófilos em função do tratamento com a ouabaína decorre da modulação desses mediadores.

Neste experimento, os animais estimulados com zimosan apresentaram um aumento nos níveis das citocinas estudadas, de acordo com dados encontrados na literatura (KOLACZKOWSKA et al., 2009). O pré-tratamento apenas com ouabaína não interferiu nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Entretanto, os animais pré-tratados com ouabaína e desafiados com zimosan apresentaram uma redução de forma significativa nos níveis de IL-1 β e TNF- α em, 63% e 64%, respectivamente (Figuras 14A e 14B). No entanto, nessa mesma condição, a ouabaína não interferiu nos níveis de IL-6 e IL-10, quando comparado ao grupo zimosan (Figuras 14C e 14D).

Por tanto, a redução na migração de células para a cavidade peritoneal induzida pelo tratamento com ouabaína, pode estar associada a redução nos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β .

Figura 14 – Efeito da ouabaína sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória



Camundongos Swiss (n = 6) foram tratados com 0,56 mg/kg de ouabaína ou veículo (PBS). Após 4 h, do estímulo com zimosan, o exsudato do peritônio foi coletado e centrifugado. Os níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram mensurados no sobrenadante do exsudato por ELISA. As barras representam a média dos níveis de citocinas de 6 animais $\pm$ e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de Tukey. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle zimosan onde, *p < 0,05 e **p < 0,01, foram considerados significativo.

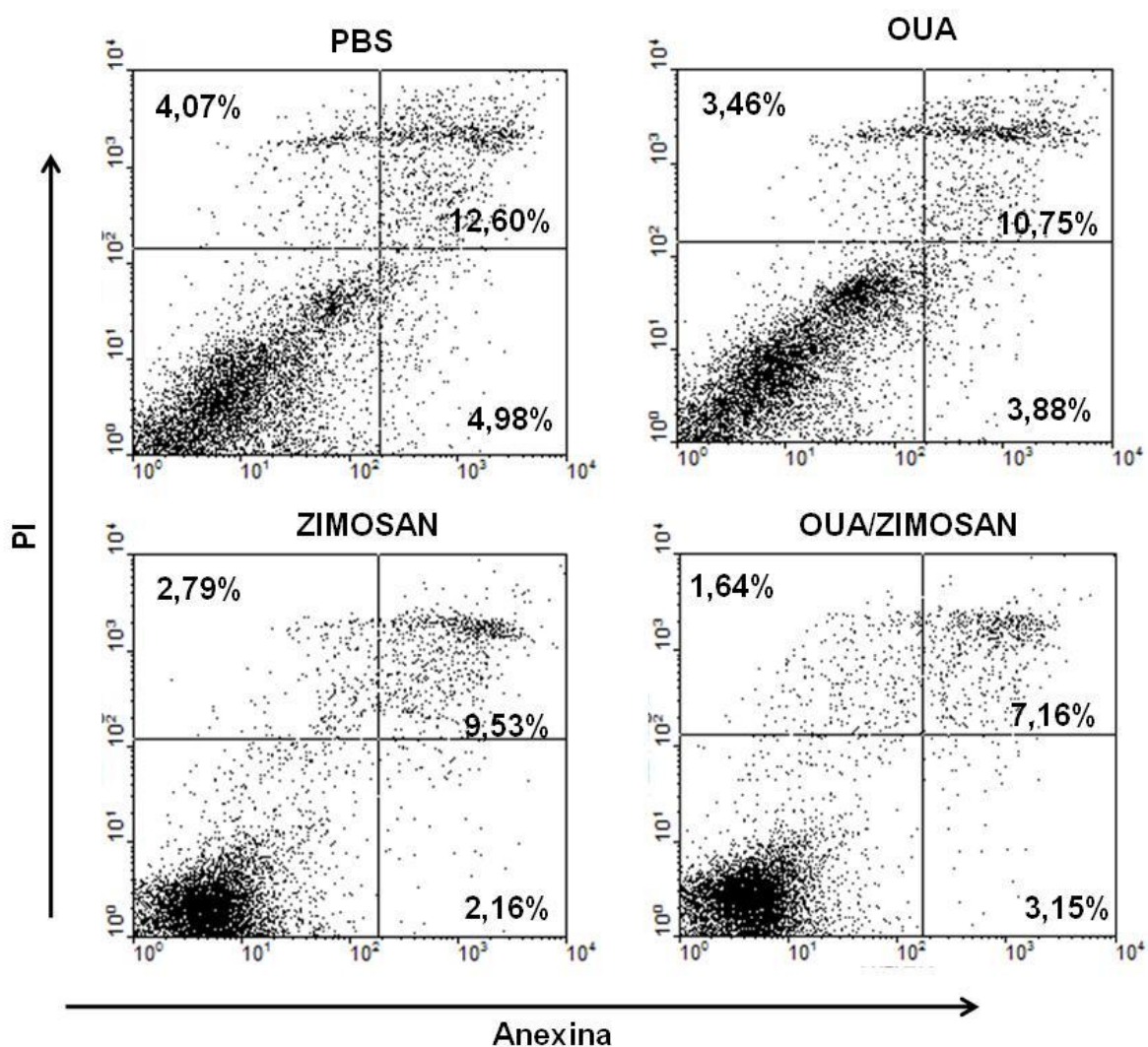
4.1.9 Efeito da ouabaína na viabilidade dos leucócitos presentes no lavado peritoneal

A peritonite induzida por zimosan representa um modelo de inflamação aguda transitória, ou seja, que se resolve entre 24 e 72 horas, e um evento importante durante este processo é a apoptose dos neutrófilos (KOLACZKOWSKA, et al., 2010). De acordo com o experimento anterior, após 4 horas da indução do estímulo inflamatório há uma predominância de células PMN (neutrófilos). Então, sabendo que a ouabaína apresenta uma atividade anti-inflamatória reduzindo o número de neutrófilos no foco inflamatório, analisamos sua participação na resolução da inflamação por meio da indução de apoptose dos neutrófilos.

Nossos resultados demonstram que fisiologicamente aproximadamente 18 % dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal estão em morte por apoptose, e que apenas o tratamento com ouabaína não interfere na morte dessas células (Figura 15). É possível evidenciar ainda, que não há uma diferença significativa na morte celular após 4 horas do estímulo inflamatório (Figura 15). Estes dados estão de acordo com a literatura, onde apenas transcorrido 6 horas da injeção com zimosan as células presentes no peritônio iniciam o processo de apoptose. Entretanto, o pré-tratamento com a ouabaína não antecipa a morte dos leucócitos inflamatórios, pois não há diferença significativa quando comparado ao grupo zimosan (Figura 15).

Diante desses dados, podemos inferir que a ouabaína não abrevia o tempo de apoptose dos neutrófilos inflamatórios, não contribuindo para uma antecipação no processo resolutivo da inflamação.

Figura 15 – Análise do efeito da ouabaína na viabilidade dos leucócitos presentes no lavado peritoneal



A viabilidade dos leucócitos presentes no lavado peritoneal foi avaliada por citometria de fluxo. As células obtidas do lavado peritoneal foram marcadas com anexina V e iodeto de propídeo para avaliar as células em apoptose e necrose respectivamente. Os números representam a percentagem de células em apoptose inicial (Anexina V⁺), apoptose tardia (Anexina V⁺ e PI⁺) e necrose (PI⁺). Os resultados foram obtidos utilizando 9 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI.

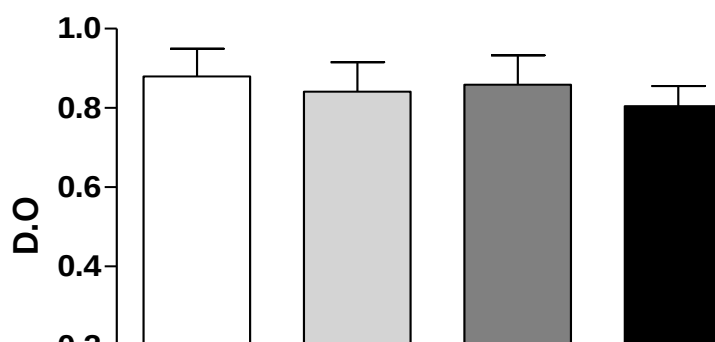
4.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório *in vitro* da ouabaína

4.2.1 Estudo da citotoxicidade da ouabaína em macrófagos peritoneais murino

Durante a resposta inflamatória os macrófagos produzem diversos mediadores, tais como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (NO) que contribuem para o controle da inflamação.

O ensaio do MTT foi realizado para determinar a citotoxicidade da ouabaína em cultura de macrófagos peritoneais murino. Os resultados deste ensaio estão expressos no gráfico 6, onde não houve redução da viabilidade das células tratadas com diferentes concentrações de ouabaína (10 nM, 100 nM e 1000 nM), quando comparadas aquelas tratadas apenas com meio de cultura RPMI.

Gráfico 6 – Efeito da ouabaína na viabilidade de macrófagos peritoneais murino

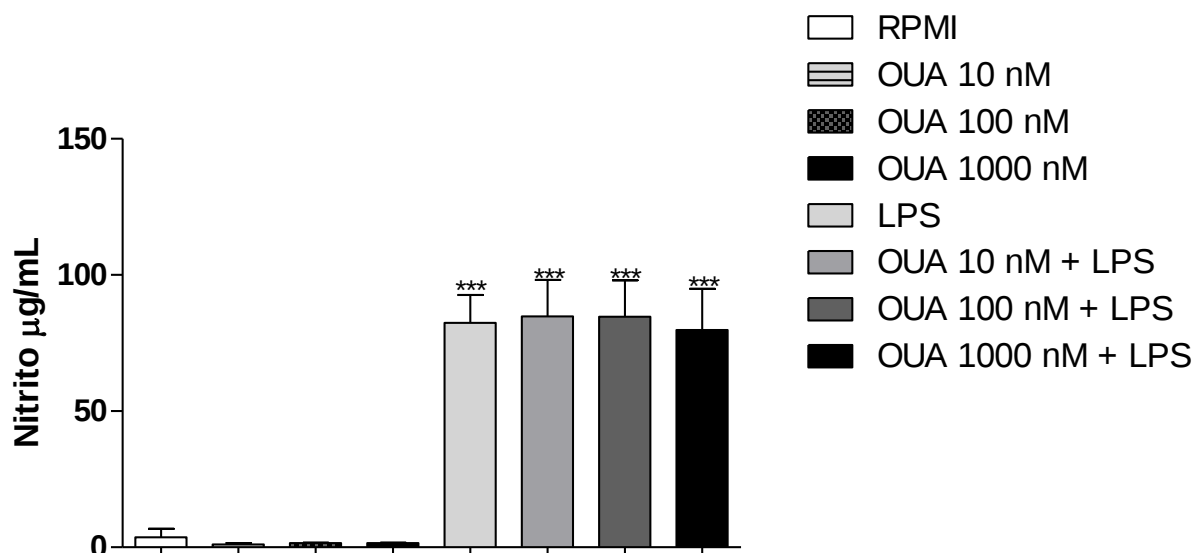


As células foram mantidas em cultura por 24h na presença ou ausência de diferentes concentrações de ouabaína. A viabilidade foi analisada pelo ensaio do MTT. Os resultados são expressos como média $\pm$ e.p.m e foram analisados usando o teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey. Os dados foram realizados em triplicata.

4.2.2 Efeito da ouabaína na produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais murino

O NO é um mediador do processo inflamatório produzido pelos macrófagos, e sua produção é uma forma de avaliar se a ouabaína interfere na funcionalidade destas células. Para tanto, foi analisada a concentração de nitrito presente nos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos peritoneais. Nossos dados demonstram que, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), um estimulador de macrófagos, aumentou a produção de NO, e que o pré-tratamento com ouabaína, em diferentes concentrações, não modula a produção de NO pelos macrófagos estimulados ou não com LPS (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Efeito da ouabaína na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais murino



Os macrófagos foram cultivados por 24 horas em meio RPMI completo na presença e ausência do estímulo (10 µg/mL de LPS) e de diferentes concentrações de ouabaína (10 nM, 100 nM e 1000 nM). A produção de NO foi determinada pelo método de Griess. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA e pós teste de Turkey e $p < 0,05$ foram considerados significativos quando comparados ao grupo de células estimuladas e não tratadas. Os resultados foram realizados em triplicata.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

O presente trabalho demonstrou que a ouabaína é capaz de modular diversos aspectos da resposta inflamatória aguda, incluindo formação do edema, alterações na permeabilidade vascular, migração celular, produção de citocinas.

Devido ao seu uso na clínica, o papel da ouabaína foi mais estudado em células cardíacas e renais, e pouco avaliado em outros tecidos; no entanto, vários trabalhos demonstram o papel imunomodulador da ouabaína (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2009). Nosso grupo tem evidenciado, que o tratamento por três dias consecutivos com a ouabaína na dose de 0,56 mg/kg apresenta uma atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva dependente de mediadores como a prostaglandina e bradicinina (DE VASCONCELOS et al., 2011). Neste intuito, para investigar se o efeito da ouabaína na inflamação ocorre de maneira dose-dependente e se o tempo de tratamento influenciaria em sua atividade anti-inflamatória, foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por zimosan, que tem sido amplamente utilizado na comunidade científica para melhor compreender a atividade fisiológica e farmacológica de determinadas drogas.

O zimosan é um componente polissacarídeo presente na parede de fungos *Saccharomyces cerevisiae*, sendo composto principalmente por β -glucana em combinação com as proteínas quitina, manana e lipídios. As células do sistema imunológico reconhecem o zimosan por meio dos receptores do tipo Toll 2 (TLR2) e dectina-1. A ativação destes receptores leva a produção de diversos fatores envolvidos na inflamação como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (REID; GOW; BROWN, 2009).

Neste modelo, fomos capazes de detectar que a melhor dose para se obter um efeito anti-inflamatório da ouabaína *in vivo*, é a dose de 0,56 mg/kg (Gráfico 1), este resultado está de acordo com estudos anteriores, no qual foi observado que essa dose, em associação com corticóides, como a hidrocortisona, é capaz de induzir uma involução tímica (RODRIGUES-MASCARENHAS; DOS SANTOS; RUMJANEK, 2006). Além disso, foi

observado que a atividade da ouabaína na inflamação depende do tempo de tratamento, pois apenas os animais que foram tratados por 3 dias consecutivos apresentaram uma redução significativa na formação do edema em todos os tempos estudados (Gráficos 2, 3 e 4). Estes achados estão em concordância com dados encontrados na literatura, onde foi evidenciado que o tratamento por 3 dias consecutivos com a ouabaína é capaz de interferir na maturação dos linfócitos B (DE PAIVA et al., 2011).

Sendo assim, este trabalho demonstrou que a ouabaína foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por zimosan em todos os tempos estudados. Para isso, foi necessário o tratamento dos animais com esse digitálico na dose de 0,56 mg/kg por 3 dias consecutivos. Fundamentado nestes achados, prosseguimos nossos estudos utilizando este protocolo de tratamento.

A formação do edema é resultado do extravasamento de proteínas plasmáticas induzida por aminas vasoativas e eicosanóides (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Quando o zimosan é administrado na cavidade peritoneal de camundongos, induz um aumento na permeabilidade vascular após 30 minutos, um dos os sinais primários da inflamação (DOHERTY et al., 1985; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Alguns estudos indicam que este aumento é decorrente da liberação de histamina pelos mastócitos (KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001b; a). No entanto, recentemente foi demonstrado, que o extravasamento vascular induzido por zimosan em camundongos deficientes de mastócitos reduz em apenas 20%, indicando que outras células e mediadores também participam deste evento. Esse estudo revelou a participação dos macrófagos residentes no aumento da permeabilidade vascular induzida por zimosan, decorrente da ação de mediadores, como as prostaglandinas $F_{1\alpha}$ ($PGF_{1\alpha}$) e PGE_2 , ambas produzidas por COX-1, e especialmente os leucotrienos (KOLACZKOWSKA et al., 2002).

Nossos dados evidenciaram que a ouabaína foi capaz de reduzir o aumento da permeabilidade vascular induzida por zimosan, confirmando assim, sua atividade anti-edematogênica observada anteriormente (Gráfico 5). É provável que essa atividade esteja relacionada com a sua capacidade de inibir

a ação da PGE_2 , pois já foi descrito por nosso grupo que a ouabaína inibiu o edema de pata induzido por PGE_2 (DE VASCONCELOS et al., 2011).

No entanto, alguns estudos tem demonstrado a participação da Na^+/K^+ -ATPase no desenvolvimento de doenças inflamatórias, como hipertensão, diabetes e inflamação pulmonar, nestes trabalhos foi evidenciado a participação de inibidores da Na^+/K^+ -ATPase, como a ouabaína, no aumento da expressão de COX-2 e consequente liberação de PGE_2 , além disso, a ouabaína promove uma estabilização do mRNA da COX-2, favorecendo seus efeitos pró-inflamatórios (GALLO et al., 2010; FENG et al., 2011; WENCESLAU et al., 2011). Entretanto, no nosso modelo de permeabilidade vascular induzido por zimosan, não foi observado aumento no extravasamento vascular significativo induzido pelo tratamento apenas com a ouabaína, quando comparamos com o grupo tratado apenas com PBS.

Ademais, nenhum desses estudos observou o envolvimento da ouabaína na superexpressão da enzima COX-1, que esta diretamente envolvida na produção de PGE_2 pelos macrófagos, mediador envolvido no aumento da permeabilidade vascular induzida por zimosan (GALLO et al., 2010; FENG et al., 2011; WENCESLAU et al., 2011).

Além disso, a redução na permeabilidade vascular pode ser devido a inibição da degranulação de mastócitos. De Vasconcelos e colaboradores (2011) observaram que a ouabaína foi capaz de inibir a formação de edema induzido por 48/80, um degranulador de mastócitos, em concordância com outros trabalhos (OKAZAKI et al., 1976). Contudo, este digitálico não interfere na ação da histamina, um dos principais mediadores liberados pelos mastócitos (KNOX; TATTERSFIELD; BRITTON, 1988; DE VASCONCELOS et al., 2011).

Mediante o exposto, podemos sugerir que a atividade da ouabaína no extravasamento vascular pode estar relacionada com a inibição da ação da PGE_2 em seus receptores, bem como uma possível inibição na expressão de COX-1, além de impedir a degranulação dos mastócitos, bem como na liberação de leucotrienos pelos macrófagos.

Durante o processo inflamatório ocorre o recrutamento de várias células, como os neutrófilos e os monócitos, do sangue para a região da inflamação. Estas células podem liberar moléculas inflamatórias, como citocinas,

quimiocinas, ROS, enzimas proteolíticas, que podem causar danos teciduais (SERHAN; SAVILL, 2005). Assim, a regulação do recrutamento destas células e sua depuração são processos críticos na inflamação (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006). Para verificar o efeito da ouabaína no processo de migração celular, desencadeado pelo processo inflamatório, foi utilizado o modelo de peritonite induzido por zimosan.

Durante a peritonite induzida por zimosan, os fagócitos englobam as partículas do patógeno e produzem substâncias antimicrobianas, como ROS e NO. Além disso, essas células são estimuladas a sintetizar e liberar numerosos mediadores inflamatórios, como aminas vasoativas, quimiocinas, citocinas e eicosanóides (DOHERTY et al., 1985; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Na inflamação induzida por zimosan ocorre um rápido influxo de células polimorfonucleares (PMNs) e a ativação da via alternativa do sistema complemento, promovendo a formação de anafilatoxinas oriundas do sistema complemento (C4a e C5a) com ação quimiotática para PMNs (KIMURA et al., 2008). Em adição, a proteína C5a induz direta e indiretamente a expressão da P-selectina em células endoteliais. O zimosan induz a produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α , capazes de promover a expressão de selectinas nas células endoteliais facilitando o mecanismo de transmigração de células para o sítio inflamatório, adicionalmente, também há a participação da PGE₂ e LTC₄ no influxo celular (FOREMAN et al., 1994; BISCHOFF; BRASEL, 1995; BYRUM et al., 1999).

Nossos resultados evidenciaram, que o tratamento com ouabaína reduziu a migração de neutrófilos para a região da inflamação, confirmando, portanto sua atividade anti-inflamatória (Figuras 11, 12 e 13). Além disso, o tratamento apenas com a ouabaína não interferiu no número de neutrófilos, indicando mais uma vez, que no modelo de peritonite a ouabaína sozinha não age com substância inflamatória. Estes dados corroboram com Carneiro e colaboradores (2010), onde também foi evidenciado que o tratamento com ouabaína inibiu a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por Concanavalina A (ConA), e que o tratamento apenas com ouabaína não interfere na transmigração destas células.

Em estudos com animais infectados com *Streptococcus pneumoniae*, uma bactéria Gram-positiva, foi observado que a digoxina, um glicosídeo cardíaco, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos, impedindo assim, o desenvolvimento da pneumonia pneumocócica no hospedeiro (ESPOSITO; POIRIER; CLARK, 1989), corroborando os nossos achados.

Os eventos de migração celular são mediados por citocinas, como a IL-8, uma quimiocina pertencente a família CXC, sendo um dos fatores quimiotático mais importantes para neutrófilos. A IL-8 apresenta alta afinidade para ambos receptores, o CXCR1 e CXCR2, que são co-expressos na membrana dos neutrófilos. Assim, a ligação da IL-8 nos receptores CXCR1/2 é um elemento importante na migração destas células para o foco inflamatório, além de induzir degranulação e liberação de ROS favorecendo as atividades microbidas destas células (MURPHY, 1997; PHAM, 2006; STILLIE et al., 2009).

A IL-8 ao se ligar em seus receptores CXCR1/2 são rapidamente internalizados, por um processo de endocitose, onde o receptor é reciclados retornando a superfície da célula, este processo cíclico de reciclagem do receptor para IL-8 é importante na via de sinalização desenvolvida por esta citocina em eventos inflamatórios (STILLIE et al., 2009).

Por tanto, o efeito inibitório da ouabaína na transmigração dos neutrófilos para a região inflamada, pode estar relacionado a sua interferência na via de sinalização da IL-8, visto que foi relatado anteriormente em estudos *in vitro*, que a ouabaína interfere no processo de reciclagem destes receptores (RAY; SAMANTA, 1997). Além disso, estudos com oleandrina, um glicosídeos cardiotônico, demonstrou que esta substância interfere na ação da IL-8 por causar *downregulation* nos receptores de IL-8, por alterar a fluidez da membrana celular (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006).

Adicionalmente, em estudos com células tumorais de pulmão humano, foi observado uma inibição na expressão da molécula de adesão ICAM-1 induzida por TNF- α e IL-1 β , na superfície das células tratadas com os glicosídeos cardíacos, ouabaína e odorosideo A (TAKADA et al., 2009).

Outra célula envolvida na inflamação são os macrófagos, após 2 horas do desafio com zimosan, o número de macrófagos peritoneais é diminuído

(LEITE et al., 2007; KOLACZKOWSKA et al., 2010). A diminuição no número de macrófagos é resultado do aumento da adesão dessas células à cavidade peritoneal, processo importante na ativação dos macrófagos. Este fenômeno é conhecido como reação de desaparecimento dos macrófagos (BARTH et al., 1995; CHADZINSKA et al., 1999). Na análise por imunofenotipagem por citometria de fluxo, observamos que o pré-tratamento com ouabaína, no período estudado, não interferiu no evento de desaparecimento dos macrófagos (Figura 13). Além disso, o tratamento apenas com ouabaína também não alterou a população de macrófagos peritoneais em relação ao grupo zimosan (Figura 13).

Podemos sugerir que a ouabaína é capaz de interferir no processo de migração celular para o foco inflamatório, reduzido o influxo de neutrófilos, por interferir, possivelmente, na expressão de moléculas de adesão, reduzindo a produção e citocinas pró-inflamatórias e na via de sinalização da IL-8, entretanto outros estudos devem ser realizados para o melhor entendimento deste efeito imunomodulador.

O recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório no modelo de peritonite induzido por zimosan envolve citocinas tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (KOLACZKOWSKA et al., 2010). Além disso, foi demonstrado recentemente no modelo de peritonite induzida por zimosan, bem como em outros modelos, que o TNF- α apresenta propriedades anti-inflamatórias, por induzir apoptose dos neutrófilos e aumentar a síntese de glicocorticóides, regulando assim, o término do processo inflamatório. Adicionalmente, durante a peritonite induzida por zimosan há um aumento na produção de IL-10, pelos macrófagos residentes, e a ausência desta citocina promove uma presença prolongada dos neutrófilos, ocasionando danos teciduais (KOLACZKOWSKA et al., 2007; KOLACZKOWSKA et al., 2009; NOTI et al., 2010). Assim, com a finalidade de melhor compreender os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória da ouabaína, bem como na sua capacidade de reduzir a migração de células para a região da lesão, analisamos o efeito do pré- tratamento com este digitálico na produção dessas citocinas.

Citocinas inflamatórias, a exemplo de TNF- α e IL-1, ativam o fator de transcrição NF- κ B, induzindo a expressão de vários genes inflamatórios, como

citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (TAKADA et al., 2009). Estudos recentes tem evidenciado que alguns glicosídeos cardiotônicos, incluindo digoxina, ouabaína e odorosideo A, são capazes de inibir a via de sinalização do TNF/NF- κ B, responsável pela produção de fatores pró-inflamatórios (YANG et al., 2005; TAKADA et al., 2009). Adicionalmente, a via da MAPK p38, que também esta envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias, é regulada pela ouabaína (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008; WANG et al., 2009).

Nossos dados demonstraram, que o tratamento com ouabaína foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β . Entretanto, não foi observado, alterações na produção de IL-6 e IL-10. Além disso, o tratamento apenas com ouabaína não modificou a produção das citocinas analisadas (Figura 14).

Utilizando um modelo diferente, Matsumori e colaboradores (1997) observaram que células mononucleares de sangue periférico (PBMC), quando tratadas apenas com ouabaína eram estimuladas a produzirem citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , TNF- α e IL-6. No entanto, quando as mesmas células eram estimuladas com LPS, o tratamento com ouabaína promovia uma inibição na produção de IL-6 e TNF- α . Além disso, neste mesmo trabalho foi avaliado o efeito *in vivo* da ouabaína em camundongos desafiados com LPS, onde este digitálico foi reduziu a letalidade induzida por LPS, além de diminuir os níveis circulantes de IL-6 e TNF- α , corroborando os nossos achados.

Apesar de Matsumori e colaboradores (1997) não terem evidenciado efeito da ouabaína na produção de IL-1 β , estudos recentes com células PBMC estimuladas com LPS, indicaram que digitálicos, incluindo a ouabaína, proscilaridina A, digoxina, digitoxina e lanatosideo C, reduziram a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por inibir a via de sinalização NF- κ B (SHAH et al., 2011). Adicionalmente, em cultura primária de astrócitos estimulados com LPS, a ouabaína foi capaz de inibir a liberação de IL-1 β , por estas células (FORSHAMMAR et al., 2011). Além disso, recentemente foi relatado que o zimosan em associação com ATP induz a produção de IL-1 β por ativar as proteínas NALP3 e ASC presentes no inflamassoma, promovendo o aumento na ativação de caspase-1 que ira clivar a pró-IL-1 β em sua forma ativa

(LAMKANFI; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2009), logo podemos sugerir o envolvimento da via de sinalização do inflamassoma na atividade anti-inflamatória da ouabaína, visto que neste e em outros trabalhos foi observado uma redução na produção de IL-1 β , e esta via de sinalização está diretamente relacionada a produção desta citocina.

Dessa forma, podemos sugerir que o efeito anti-inflamatório da ouabaína esta relacionado a inibição na produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, o que contribui para sua atividade na redução do influxo de células polimorfonucleares para o local da inflamação, visto que citocinas, como IL-1 β e TNF- α estão envolvidas na síntese e expressão de moléculas de adesão que são importantes para o processo de transmigração dos leucócitos para o local da lesão.

A peritonite induzida por zimosan representa um modelo de inflamação aguda transitória, ou seja, que normalmente se resolve entre 24 e 72 horas, sendo caracterizada pela liberação de citocinas, quimiocinas e ativação de agentes resolutivos, tais como, ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases, que promovem a biosíntese de derivados lipídicos. Adicionalmente, uma população transiente de neutrófilos que sofre apoptose espontânea em poucas horas é fagocitada por macrófagos da fase de resolução (Mr), e posterior repovoamento da cavidade peritoneal por linfócitos T e B. Este processo desencadeia uma rápida resolução da resposta inflamatória o que é importante para não ocasionar danos aos tecidos evitando o desenvolvimento de doenças auto-imunes (KOLACZKOWSKA et al., 2010; NAVARRO-XAVIER et al., 2010).

A indução de apoptose dos neutrófilos é fundamental para a resolução da inflamação, e acredita-se que a aceleração deste processo pode facilitar o processo resolutivo (MCGRATH et al., 2011). Sabendo que a ouabaína é capaz de induzir a morte por apoptose de células do sistema imunológico, como linfócitos e timócitos, analisamos seu efeito na indução de morte nos neutrófilos presentes na cavidade peritoneal de animais estimulados com zimosan.

Há duas vias principais que levam à morte por apoptose a via intrínseca e extrínseca (YERETSSIAN; LABBE; SALEH, 2008). A via extrínseca é iniciada pela estimulação da superfamília de receptores de morte para TNF, incluindo o TNFR. A ligação do TNF- α ao receptor TNFR1 induz uma sinalização

intracelular que envolve a associação das proteínas TRADDs ao receptor, levando a ativação da cascata da pró-caspase-8. A caspase-8 pode ativar a pró-caspase-3 ou diretamente induzir fragmentação do DNA levando a morte por apoptose (KOLACZKOWSKA et al., 2010).

Kolaczowska e colaboradores (2010) observaram no modelo de peritonite induzida por zimosan, um aumento na expressão da atividade da caspase-3 em neutrófilos e macrófagos logo nas primeiras horas da peritonite e esta morte é correlacionada ao aumento de TNF- α e NO e uma mudança de Bcl2 para Bax, 2 horas após a peritonite. Adicionalmente, após 4 horas de inflamação há uma maior expressão das caspases-8 e 9, porém a expressão da caspase-3, o executor da apoptose, só ocorre após 6 horas da peritonite. Esses dados sugerem que no período entre 4 e 6 horas na peritonite induzida por zimosan há uma forte indução de fatores pró-apoptóticos dependente da ação de TNF- α e NO.

Nossos resultados evidenciaram que a ouabaína não interferiu na morte por apoptose dos leucócitos inflamatórios (Figura 15), este dado pode estar associado a sua capacidade em reduzir a produção de TNF- α nesse modelo, citocina importante para a indução de apoptose nessas células. Além disso, é conhecido que os digitálicos inibem o acoplamento da proteína TRADD ao receptor TNFR1 o que levaria a inibição da morte por apoptose, por esta via de sinalização (YANG et al., 2005).

Com isto, podemos sugerir que a ouabaína não é capaz de acelerar o evento de apoptose dos leucócitos inflamatórios no modelo estudado, não interferindo, assim, nesta fase do processo resolutivo da inflamação no modelo avaliado.

O NO é um mediador que apresenta uma variedade de funções biológicas, tais como relaxamento vascular, agregação plaquetária, neurotransmissão, atividades tumoricida e microbicida, e imunossupressão. Este mediador também está associado a processos inflamatórios importantes, incluindo artrite reumatóide, diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, e choque séptico (NATHAN; XIE, 1994). O NO produzido por macrófagos ativados, desenvolve uma reação inflamatória por aumentar a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, espécies reativas de oxigênio, derivados do

ácido araquidônico e por sua capacidade em ativar a enzima COX-2 (DUDHGAONKAR et al., 2004). Entretanto, tem sido relatado recentemente, que o NO ativa uma população de células T regulatórias dependente de NO (Tregs-NO) que suprime a resposta inflamatória por induzir a liberação de IL-10 (NIEDBALA et al., 2007).

Sowa e colaboradores (1997) observaram que o tratamento de macrófagos peritoneais com ouabaína não interfere na produção de NO, entretanto, quando essas mesmas células eram estimuladas com LPS na presença de ouabaína, observava um efeito estimulador na produção de NO, este evento pode estar associado ao fato, do aumento do Ca^{2+} intracelular induzido pela ouabaína, estimula a atividade da enzima iNOS, importante na produção deste mediador. Adicionalmente, em estudos com miócitos, foi observado que a ouabaína aumentou a produção de NO por estimular a atividade da iNOS (GAN et al., 2011).

Fundamentado nos indícios de que o NO é um mediador capaz de modular o processo inflamatório, positivamente e negativamente, analisamos o efeito de diferentes concentrações de ouabaína (10 nM, 100 nM e 1000 nM) na produção deste mediador, em macrófagos peritoneais murino estimulados com LPS. As concentrações usadas neste trabalho foram escolhidas uma vez que há evidências que baixas concentrações de ouabaína regulam vários eventos em células pertencentes ao sistema imunológico, como nos timócitos e monócitos (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008; VALENTE et al., 2009).

Demonstramos que o tratamento de macrófagos peritoneais com ouabaína não alterou a produção de NO, em concordância com dados encontrados na literatura (SOWA; PRZEWLOCKI, 1997). Entretanto, também não foi observado um aumento na produção de NO em células estimuladas com LPS e tratadas com ouabaína (10 nM, 100 nM e 1000 nM). Esta contradição pode ser devido a diferença de concentração usada de ouabaína nos dois estudos, visto que, Sowa et al. (1997) e Gan et al. (2011) utilizaram uma concentração 1000 vezes maior de ouabaína, do que a usada nesse trabalho (Gráfico 7).

Com esses achados, até agora, podemos sugerir que a ouabaína está desenvolvendo sua atividade anti-inflamatória independente da via do NO, no entanto, é necessário a realização de novos protocolos para confirmação dessa hipótese.

Este conjunto de dados sugere que a ouabaína possui um papel fisiológico modulador da resposta inflamatória, interferindo negativamente em eventos que envolvem o aumento da permeabilidade vascular, a migração de células para o sítio inflamado e a produção de citocinas.

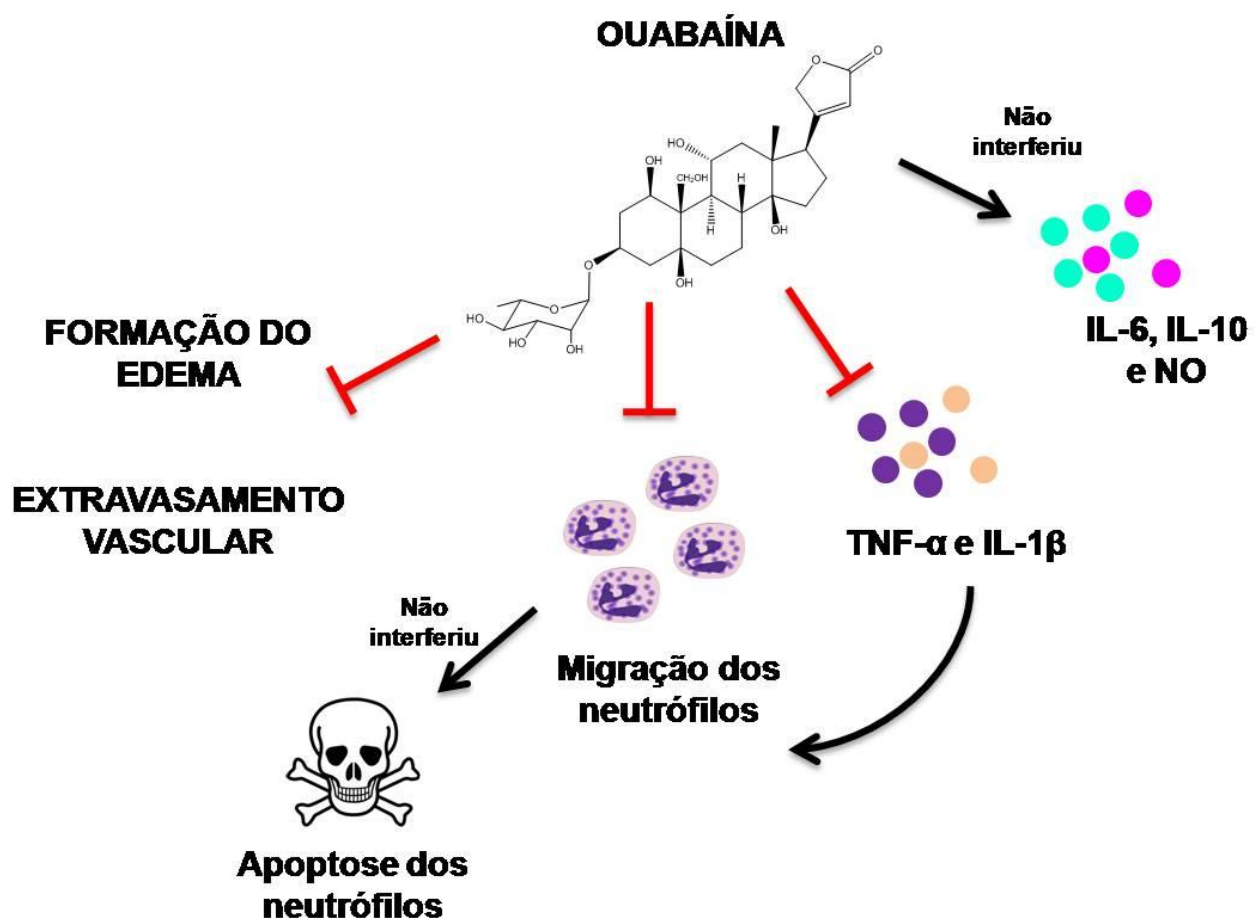
6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite concluir que:

- A ouabaína apresenta uma atividade anti-inflamatória dependente da dose e dos dias de tratamento;
- No modelo de edema de pata induzido por zimosan a ouabaína reduziu a formação do edema em animais pré-tratados por 3 dias consecutivos na dose de 0,56 mg/kg
- A ouabaína atenuou o aumento da permeabilidade vascular induzida por zimosan;
- No modelo de peritonite induzida por zimosan a ouabaína reduziu a migração de células PMN para o foco inflamatório;
- A ouabaína não antecipou o processo de apoptose dos neutrófilos no modelo de peritonite induzido por zimosan, não interferindo nesta fase resolutive da inflamação;
- A ouabaína atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , porém não interferiu nos níveis de IL-6 e IL-10;
- Em cultura macrófagos peritoneais as concentrações estudadas de ouabaína (10 nM, 100 nM e 1000 nM) não apresentaram citotoxicidade;
- As concentrações estudadas de ouabaína em cultura de macrófagos peritoneais não alteraram a produção de NO;

Figura 16 – Esquema representando o efeito da ouabaína no processo inflamatório obtidos neste trabalho



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Current Opinion Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 351-69, 2009.

ARIEL, A.; FREDMAN, G.; SUN, Y. P.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T. E.; LUSTER, A. D.; SERHAN, C. N. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. **Nature Immunology**, v. 7, n. 11, p. 1209-16, 2006.

ATARASHI, K.; NISHIMURA, J.; SHIMA, T.; UMESAKI, Y.; YAMAMOTO, M.; ONOUE, M.; YAGITA, H.; ISHII, N.; EVANS, R.; HONDA, K.; TAKEDA, K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 808-12, 2008.

BAGROV, A. Y.; FEDOROVA, O. V.; DMITRIEVA, R. I.; HOWALD, W. N.; HUNTER, A. P.; KUZNETSOVA, E. A.; SHPEN, V. M. Characterization of a urinary bufodienolide Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **Hypertension**, v. 31, n. 5, p. 1097-103, 1998.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 4, n. 7, p. 378-92, 2008.

BARTH, M. W.; HENDRZAK, J. A.; MELNICOFF, M. J.; MORAHAN, P. S. Review of the macrophage disappearance reaction. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, n. 3, p. 361-7, 1995.

BARTUNKOVA, J.; MALY, P.; SMETANA, K., JR.; SEDIVA, A.; KLUBAL, R.; MAYEROVA, D.; SEDLACEK, A.; SPLICHALOVA, V. Reduced phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes in alpha(1,3) fucosyltransferase VII-deficient mice. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 108, n. 6, p. 409-16, 2000.

BAZZONI, F.; TAMASSIA, N.; ROSSATO, M.; CASSATELLA, M. A. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 9, p. 2360-8, 2010.

BECK, I. M.; VANDEN BERGHE, W.; VERMEULEN, L.; YAMAMOTO, K. R.; HAEGEMAN, G.; DE BOSSCHER, K. Crosstalk in inflammation: the interplay of

glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 7, p. 830-82, 2009.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733-9, 2008.

BISCHOFF, J.; BRASEL, C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor-alpha. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, n. 1, p. 174-80, 1995.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 6 Pt 1, p. C1367-87, 1993.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-70, 2010.

BORTNER, C. D.; HUGHES, F. M., JR.; CIDLOWSKI, J. A. A primary role for K^{+} and Na^{+} efflux in the activation of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32436-42, 1997.

BOURKE, E.; CASSETTI, A.; VILLA, A.; FADLON, E.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A. IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 5999-6005, 2003.

BOURS, M. J.; SWENNEN, E. L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BOWDEN, G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 23-35, 2004.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-60, 2008.

BRANDAU, S.; JAKOB, M.; HEMEDA, H.; BRUDEREK, K.; JANESCHIK, S.; BOOTZ, F.; LANG, S. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. **The Journal of Pathology**, v. 88, n. 5, p. 1005-15, 2010.

BRUIN, A. M.; LIBREGTS, S. F.; VALKHOF, M.; BOON, L.; TOUW, I. P.; NOLTE, M. A. Interferon-gamma induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. **Blood**, 2011 (*in press*)

BYRUM, R. S.; GOULET, J. L.; SNOUWAERT, J. N.; GRIFFITHS, R. J.; KOLLER, B. H. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 12, p. 6810-9, 1999.

CAMPESE, V. M.; YE, S.; ZHONG, H. Downregulation of neuronal nitric oxide synthase and interleukin-1 β mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. **Hypertension**, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 519-24, 2002.

CARREIRO, L.T. Efeito modulador da ouabaína no sistema imunológico. 2010. 73p. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa-PB, 2010.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2068-101, 1994.

CASTARDO, J. C.; PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J.; GUIMARAES, C. L.; MONACHE, F. D.; FILHO, V. C.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405-11, 2008.

CHADZINSKA, M.; KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Morphine modulation of peritoneal inflammation in Atlantic salmon and CB6 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 5, p. 590-6, 1999.

CHAUSSABEL, D.; PASCUAL, V.; BANCHEREAU, J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. **BMC Biology**, v. 8, p. 84, 2010.

CHEN, Y.; CORRIDEN, R.; INOUE, Y.; YIP, L.; HASHIGUCHI, N.; ZINKERNAGEL, A.; NIZET, V.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1792-5, 2006.

CHEN, Y.; YAO, Y.; SUMI, Y.; LI, A.; TO, U. K.; ELKHAL, A.; INOUE, Y.; WOEHRLE, T.; ZHANG, Q.; HAUSER, C.; JUNGER, W. G. Purinergic

signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. **Science Signaling**, v. 3, n. 125, p. ra45, 2010.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 479-89, 2010.

DE MORAES, V. L.; OLEJ, B.; DE LA ROCQUE, L.; RUMJANEK, V. M. Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 12, p. 2425-9, 1989.

DE PAIVA, L. S.; COSTA, K. M.; CANTO, F. B.; CABRAL, V. R.; FUCS, R.; NOBREGA, A.; RUMJANEK, V. M. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, n. 9, p. 1038-43, 2011.

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

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

DE WARDENER, H. E. The hypothalamus and hypertension. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1599-658, 2001.

DE WARDENER, H. E.; MILLS, I. H.; CLAPHAM, W. F.; HAYTER, C. J. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. **Clinical Science**, v. 21, p. 249-58, 1961.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-89, 1985.

DUDHGAONKAR, S. P.; KUMAR, D.; NAIK, A.; DEVI, A. R.; BAWANKULE, D. U.; TANDAN, S. K. Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2-3, p. 117-22, 2004.

ECHEVARRIA-LIMA, J.; RUMJANEK, V. M. Effect of Ouabain on the immunesystem. **Current Hypertension Reviews**. v. 2 p.83-95, 2006

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

EL-MALLAKH, R. S.; HARRISON, L. T.; LI, R.; CHANGARIS, D. G.; LEVY, R. S. An animal model for mania: preliminary results. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 955-62, 1995.

EL ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171-83, 2006.

ELGHOZI, J. L.; LE QUAN-BUI, K. H.; DEVYNCK, M. A.; MEYER, P. Nomifensine antagonizes the ouabain-induced increase in dopamine metabolites in cerebrospinal fluid of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 279-82, 1983.

ESPOSITO, A. L.; POIRIER, W. J.; CLARK, C. A. The cardiac glycoside digoxin disrupts host defense in experimental pneumococcal pneumonia by impairing neutrophil mobilization. **American Review of Respiratory Disease**, v. 140, n. 6, p. 1590-4, 1989.

FENG, S.; CHEN, W.; CAO, D.; BIAN, J.; GONG, F. Y.; CHENG, W.; CHENG, S.; XU, Q.; HUA, Z. C.; YIN, W. 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, n. 1, p. 109-24, 2011.

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

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 3877-83, 2006.

FIELDING, C. A.; MCLOUGHLIN, R. M.; MCLEOD, L.; COLMONT, C. S.; NAJDOVSKA, M.; GRAIL, D.; ERNST, M.; JONES, S. A.; TOPLEY, N.

JENKINS, B. J. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2189-95, 2008.

FIMBEL, S. M.; MONTGOMERY, J. E.; BURKET, C. T.; HYDE, D. R. Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 7, p. 1712-24, 2007.

FOREMAN, K. E.; VAPORCIYAN, A. A.; BONISH, B. K.; JONES, M. L.; JOHNSON, K. J.; GLOVSKY, M. M.; EDDY, S. M.; WARD, P. A. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1147-55, 1994.

FORSHAMMAR, J.; BLOCK, L.; LUNDBORG, C.; BIBER, B.; HANSSON, E. Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31586-97, 2011.

FRIDLENDER, Z. G.; SUN, J.; KIM, S.; KAPOOR, V.; CHENG, G.; LING, L.; WORTHEN, G. S.; ALBELDA, S. M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-94, 2009.

GABOR, A.; LEENEN, F. H. Mechanisms in the PVN mediating local and central sodium-induced hypertension in Wistar rats. **American Journal of Physiology**, v. 296, n. 3, p. R618-30, 2009.

GALLO, L. C.; DAVEL, A. P.; XAVIER, F. E.; ROSSONI, L. V. Time-dependent increases in ouabain-sensitive Na⁺, K⁺ -ATPase activity in aortas from diabetic rats: The role of prostanoids and protein kinase C. **Life Sciences**, v. 87, n. 9-10, p. 302-8, 2010.

GAN, X. T.; HUNTER, J. C.; HUANG, C.; XUE, J.; RAJAPUROHITAM, V.; JAVADOV, S.; KARMAZYN, M. Ouabain increases iNOS-dependent nitric oxide generation which contributes to the hypertrophic effect of the glycoside: possible role of peroxynitrite formation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2011.

GARCIA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M. J.; GONZALEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, n. 2-3, p. 221-9, 2007.

GARVY, B. A.; TELFORD, W. G.; KING, L. E.; FRAKER, P. J. Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. **Immunology**, v. 79, n. 2, p. 270-7, 1993.

GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. **Cardiovascular Research**, v. 32, n. 4, p. 720-32, 1996.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S81-96, 2002.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-16, 2004.

GODSON, C.; MITCHELL, S.; HARVEY, K.; PETASIS, N. A.; HOGG, N.; BRADY, H. R. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 1663-7, 2000.

GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**, v. 17, n. 11, p. 977-86, 1995.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-64, 2005.

GOTO, A.; YAMADA, K.; ISHII, M.; SUGIMOTO, T. Digitalis-like activity in human plasma: relation to blood pressure and sodium balance. **American Journal of Medicine**, v. 89, n. 4, p. 420-6, 1990.

GOTO, A.; YAMADA, K.; YAGI, N.; YOSHIOKA, M.; SUGIMOTO, T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. **Pharmacology Reviews**, v. 44, n. 3, p. 377-99, 1992.

GRASSI, G. Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 13, n. 5, p. 513-9, 2004.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DUCHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 14, p. 6259-63, 1991.

HAMLYN, J. M.; LAREDO, J.; SHAH, J. R.; LU, Z. R.; HAMILTON, B. P. 11-hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: multiple implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 685-93, 2003.

HAUX, J.; KLEPP, O.; SPIGSET, O.; TRETLI, S. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. **BMC Cancer**, v. 1, p. 11, 2001.

HAWORTH, O.; BUCKLEY, C. D. Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States America**, v. 104, n. 52, p. 20647-8, 2007.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344-62, 2008.

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; MULLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **The Biochemical Journal**, v. 374, n. Pt 1, p. 1-20, 2003.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Eicosanoids in inflammation. **Annals of Clinical Research**, v. 16, n. 5-6, p. 287-99, 1984.

HUYNH, M. L.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 1, p. 41-50, 2002.

IHENETU, K.; ESPINOSA, R.; DE LEON, R.; PLANAS, G.; PEREZ-PINERO, A.; WALDBESER, L. Digoxin and digoxin-like immunoreactive factors (DLIF) modulate the release of pro-inflammatory cytokines. **Inflammation Research**, v. 57, n. 11, p. 519-23, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291-5, 2010.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 12, p. 1786-800, 2009.

KAHNER, B. N.; SHANKAR, H.; MURUGAPPAN, S.; PRASAD, G. L.; KUNAPULI, S. P. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 11, p. 2317-26, 2006.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 253-62, 2005.

KASSIOTIS, G.; KOLLIAS, G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 4, p. 427-34, 2001.

KIMURA, Y.; MIWA, T.; ZHOU, L.; SONG, W. C. Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 732-40, 2008.

KLUNE, J. R.; DHUPAR, R.; CARDINAL, J.; BILLIAR, T. R.; TSUNG, A. HMGB1: endogenous danger signaling. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 7-8, p. 476-84, 2008.

KNOX, A. J.; TATTERSFIELD, A. E.; BRITTON, J. R. The effect of inhaled ouabain on bronchial reactivity to histamine in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 758-60, 1988.

KOLACZKOWSKA, E.; GOLDYS, A.; KOZAKIEWICZ, E.; LELITO, M.; PLYTYCZ, B.; VAN ROOIJEN, N.; ARNOLD, B. Resident peritoneal macrophages and mast cells are important cellular sites of COX-1 and COX-2 activity during acute peritoneal inflammation. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**, v. 57, n. 6, p. 459-66, 2009.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B.; ARNOLD, B. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492-504, 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; LELITO, M.; KOZAKIEWICZ, E.; VAN ROOIJEN, N.; PLYTYCZ, B.; ARNOLD, B. Resident peritoneal leukocytes are important sources of MMP-9 during zymosan peritonitis: superior contribution of macrophages over mast cells. **Immunology Letters**, v. 113, n. 2, p. 99-106, 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Critical role of mast cells in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in mice. **Inflammation Research**, v. 50, n. 8, p. 415-21, 2001a.

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

KOLACZKOWSKA, E.; SHAHZIDI, S.; SELJELID, R.; VAN ROOIJEN, N.; PLYTYCZ, B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. **Inflammation**, v. 26, n. 2, p. 61-71, 2002.

KUHR, F.; LOWRY, J.; ZHANG, Y.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R. A. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 145-54, 2010.

KUMAR, P.; SHEN, Q.; PIVETTI, C. D.; LEE, E. S.; WU, M. H.; YUAN, S. Y. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. e19, 2009.

LA SALA, A.; SEBASTIANI, S.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; IDZKO, M.; NORGAEUER, J.; GIROLOMONI, G. Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1715-22, 2002.

LACHMANN, H. J.; QUARTIER, P.; SO, A.; HAWKINS, P. N. The emerging role of interleukin-1beta in autoinflammatory diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 2, p. 314-24, 2011.

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

LAMKANFI, M.; MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T. D. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20574-81, 2009.

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

LANGENBACH, R.; MORHAM, S. G.; TIANO, H. F.; LOFTIN, C. D.; GHANAYEM, B. I.; CHULADA, P. C.; MAHLER, J. F.; LEE, C. A.; GOULDING, E. H.; KLUCKMAN, K. D.; KIM, H. S.; SMITHIES, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 483-92, 1995.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 1211-20, 2009.

LASKIN, D. L.; SUNIL, V. R.; GARDNER, C. R.; LASKIN, J. D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 267-88, 2011.

LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 28-33, 2010.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-95, 2002.

LAZAROWSKI, E. R.; BOUCHER, R. C.; HARDEN, T. K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 785-95, 2003.

LAZARTIGUES, E. Inflammation and neurogenic hypertension: a new role for the circumventricular organs? **Circulation Research**, v. 107, n. 2, p. 166-7, 2010.

LEHMANN, I. T.; BOBROVSKAYA, L.; GORDON, S. L.; DUNKLEY, P. R.; DICKSON, P. W. Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17644-51, 2006.

LEITE, D. F.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C.; CALIXTO, J. B.; RUMJANEK, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 630-7, 2007.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-89, 2007.

LI, R.; EL-MALLAKH, R. S.; HARRISON, L.; CHANGARIS, D. G.; LEVY, R. S. Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes. Toward an animal model for manic depression. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 31, n. 1, p. 65-72, 1997.

LICHTSTEIN, D.; GATI, I.; SAMUELOV, S.; BERSON, D.; ROZENMAN, Y.; LANDAU, L.; DEUTSCH, J. Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses. **European Journal of Biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 261-8, 1993.

LINGREL, J. B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 395-412, 2010.

LIU, D.; GAO, L.; ROY, S. K.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Role of oxidant stress on AT1 receptor expression in neurons of rabbits with heart failure and in cultured neurons. **Circulation Research**, v. 103, n. 2, p. 186-93, 2008.

LUCATTELLI, M.; CICKO, S.; MULLER, T.; LOMMATZSCH, M.; DE CUNTO, G.; CARDINI, S.; SUNDAS, W.; GRIMM, M.; ZEISER, R.; DURK, T.; ZISSEL, G.; SORICHTER, S.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; VIRCHOW, J. C.; LUNGARELLA, G.; IDZKO, M. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 423-9, 2011.

MACKAY, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 988-98, 2008.

MADERNA, P.; GODSON, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1639, n. 3, p. 141-51, 2003.

MAHTANI, K. R.; BROOK, M.; DEAN, J. L.; SULLY, G.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A. R. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. **Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 19, p. 6461-9, 2001.

MAJAI, G.; PETROVSKI, G.; FESUS, L. Inflammation and the apopto-phagocytic system. **Immunology Letters**, v. 104, n. 1-2, p. 94-101, 2006.

MAJNO, G.; JORIS, I. Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. New York: **Oxford University Press**, 2 ed, 2004.

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

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

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-31, 2011.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-55, 2002.

MARQUES-DA-SILVA, C.; BURNSTOCK, G.; OJCIUS, D. M.; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

MCGRATH, E. E.; MARRIOTT, H. M.; LAWRIE, A.; FRANCIS, S. E.; SABROE, I.; RENSHAW, S. A.; DOCKRELL, D. H.; WHYTE, M. K. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates inflammatory neutrophil apoptosis and

enhances resolution of inflammation. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 5, p. 855-65, 2011.

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

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 1, p. 279-367, 2006.

MOMMSEN, P.; BARKHAUSEN, T.; HILDEBRAND, F.; ZECKEY, C.; KRETTEK, C.; VAN GRIENSVEN, M. Regulation of L-selectin expression by trauma-relevant cytokines. **Pathology, Research and Practice**, v. 207, n. 3, p. 142-7, 2011.

MORHAM, S. G.; LANGENBACH, R.; LOFTIN, C. D.; TIANO, H. F.; VOULOUMANOS, N.; JENNETTE, J. C.; MAHLER, J. F.; KLUCKMAN, K. D.; LEDFORD, A.; LEE, C. A.; SMITHIES, O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 473-82, 1995.

MURPHY, P. M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Seminars in Hematology**, v. 34, n. 4, p. 311-8, 1997.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; HANDA, O.; ISHIKAWA, T.; NAKAGAWA, S.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIDA, N.; MINAMI, M.; KITA, M.; IMANISHI, J.; YOSHIKAWA, T. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 5, p. 560-9, 2003.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

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

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

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915-8, 1994.

NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C.; MUROS DE FUENTES, M.; GARCIA-PEREZ, J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327-40, 2011.

NAVARRO-XAVIER, R. A.; NEWSON, J.; SILVEIRA, V. L.; FARROW, S. N.; GILROY, D. W.; BYSTROM, J. A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1516-25, 2010.

NEWMAN, R. A.; YANG, P.; PAWLUS, A. D.; BLOCK, K. I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Molecular Interventions**, v. 8, n. 1, p. 36-49, 2008.

NICHOLS, J. R.; MALDONADO, H. S. Comparison of the inhibitory effect of ouabain and dihydroouabain on the Na(+)-K⁺ ATPase from frog skin. **General Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 349-52, 1993.

NIEDEBALA, W.; CAI, B.; LIU, H.; PITMAN, N.; CHANG, L.; LIEW, F. Y. Nitric oxide induces CD4⁺CD25⁺ Foxp3 regulatory T cells from CD4⁺CD25⁺ T cells via p53, IL-2, and OX40. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States America**, v. 104, n. 39, p. 15478-83, 2007.

NOTI, M.; CORAZZA, N.; MUELLER, C.; BERGER, B.; BRUNNER, T. TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 5, p. 1057-66, 2010.

OKAZAKI, T.; ILEA, V. S.; OKAZAKI, A.; WICHER, K.; REISMAN, R. E.; ARBESMAN, C. E. Inhibition of antigen-induced histamine release by ouabain. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 57, n. 5, p. 454-62, 1976.

OLEJ, B.; DE LA ROCQUE, L.; CASTILHO, F. P.; MEDIANO, I. F.; CAMPOS, M. M.; RUMJANEK, V. M. Effect of ouabain on lymphokine-activated killer cells. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 16, n. 9, p. 769-74, 1994.

OLEJ, B.; DOS SANTOS, N. F.; LEAL, L.; RUMJANEK, V. M. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. **Bioscience Reports**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1998.

PAMNANI, M. B.; BUGGY, J.; HUOT, S. J.; HADDY, F. J. Studies on the role of a humoral sodium-transport inhibitor and the anteroventral third ventricle

(AV3V) in experimental low-renin hypertension. **Clinical Science**, v. 61 Suppl 7, p. 57s-60s, 1981.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B. E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-83, 2001.

PELLETIER, M.; MAGGI, L.; MICHELETTI, A.; LAZZERI, E.; TAMASSIA, N.; COSTANTINI, C.; COSMI, L.; LUNARDI, C.; ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S.; CASSATELLA, M. A. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 335-43, 2010.

PELLETIER, M.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 6, p. 1163-70, 2010.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541-50, 2006.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926-35, 2008.

PUGA, I.; COLS, M.; BARRA, C. M.; HE, B.; CASSIS, L.; GENTILE, M.; COMERMA, L.; CHORNY, A.; SHAN, M.; XU, W.; MAGRI, G.; KNOWLES, D. M.; TAM, W.; CHIU, A.; BUSSEL, J. B.; SERRANO, S.; LORENTE, J. A.; BELLOSILLO, B.; LLORETA, J.; JUANPERE, N.; ALAMEDA, F.; BARO, T.; DE HEREDIA, C. D.; TORAN, N.; CATALA, A.; TORREBADELL, M.; FORTUNY, C.; CUSI, V.; CARRERAS, C.; DIAZ, G. A.; BLANDER, J. M.; FARBER, C. M.; SILVESTRI, G.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; CALVILLO, M.; DUFOUR, C.; NOTARANGELO, L. D.; LOUGARIS, V.; PLEBANI, A.; CASANOVA, J. L.; GANAL, S. C.; DIEFENBACH, A.; AROSTEGUI, J. I.; JUAN, M.; YAGUE, J.; MAHLAOU, N.; DONADIEU, J.; CHEN, K.; CERUTTI, A. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. **Nature Immunology**, 2011.

PULINA, M. V.; ZULIAN, A.; BERRA-ROMANI, R.; BESKINA, O.; MAZZOCCO-SPEZZIA, A.; BARYSHNIKOV, S. G.; PAPPARELLA, I.; HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; GOLOVINA, V. A. Upregulation of Na⁺ and Ca²⁺ transporters in arterial smooth muscle from ouabain-induced hypertensive rats.

American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, v. 298, n. 1, p. H263-74, 2010.

QAZZAZ, H. M.; CAO, Z.; BOLANOWSKI, D. D.; CLARK, B. J.; VALDES, R., JR. De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612-20, 2004.

QUASTEL, M. R.; KAPLAN, J. G. Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin in vitro. **Nature**, v. 219, n. 5150, p. 198-200, 1968.

RAJAKARIAR, R.; YAQOOB, M. M.; GILROY, D. W. COX-2 in inflammation and resolution. **Molecular Intervention**, v. 6, n. 4, p. 199-207, 2006.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 119-45, 2009.

RAY, E.; SAMANTA, A. K. Receptor-mediated endocytosis of IL-8: a fluorescent microscopic evidence and implication of the process in ligand-induced biological response in human neutrophils. **Cytokine**, v. 9, n. 8, p. 587-96, 1997.

REID, D. M.; GOW, N. A.; BROWN, G. D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 30-7, 2009.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H., 3RD; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-10, 1998.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

ROBERTS, R. J.; REPASS, R.; EL-MALLAKH, R. S. Effect of dopamine on intracellular sodium: a common pathway for pharmacological mechanism of action in bipolar illness. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 181-7, 2010.

ROBSON, S. C.; KACZMAREK, E.; SIEGEL, J. B.; CANDINAS, D.; KOZIAK, K.; MILLAN, M.; HANCOCK, W. W.; BACH, F. H. Loss of ATP diphosphohydrolase

activity with endothelial cell activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 1, p. 153-63, 1997.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 409-30, 2006.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Reviews Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DE OLIVEIRA, A. S.; AMOEDO, N. D.; OTTILIA R. AFFONSO-MITIDIERI; RUMJANEK, F. D; RUMJANEK, V. M. Modulation of the immune system by ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 153-163, 2009.

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

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, n. 2, p. 159-69, 2006.

RODRIGUES MASCARENHAS, S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERNANDES DOS SANTOS, N.; RUMJANEK, V. M. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca^{2+} entry. **Life Sciences**, v. 73, n. 8, p. 1037-51, 2003.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 1, p. 61-5, 2010.

ROSSONI, L. V.; DOS SANTOS, L.; BARKER, L. A.; VASSALLO, D. V. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 105-16, 2003.

ROTHWARF, D. M.; KARIN, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. **Science Signaling**, v. 1999, n. 5, p. RE1, 1999.

RULAND, J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 709-14, 2011.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 37-49, 2010.

SCHNEIDER, R.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; LEHMANN, W. D.; KIRCH, U.; ANTOLOVIC, R.; SCHONER, W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 784-92, 1998.

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

SCHONER, W.; BAUER, N.; MULLER-EHMSSEN, J.; KRAMER, U.; HAMBARCHIAN, N.; SCHWINGER, R.; MOELLER, H.; KOST, H.; WEITKAMP, C.; SCHWEITZER, T.; KIRCH, U.; NEU, H.; GRUNBAUM, E. G. Ouabain as a mammalian hormone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 678-84, 2003.

SCHONFELD, W.; WEILAND, J.; LINDIG, C.; MASNYK, M.; KABAT, M. M.; KUREK, A.; WICHA, J.; REPKE, K. R. The lead structure in cardiac glycosides is 5 beta, 14 beta-androstane-3 beta 14-diol. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 329, n. 4, p. 414-26, 1985.

SCHWAB, J. M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 869-74, 2007.

SCHWAB, J. M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 414-20, 2006.

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

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 101-37, 2007.

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

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

SERHAN, C. N.; YANG, R.; MARTINOD, K.; KASUGA, K.; PILLAI, P. S.; PORTER, T. F.; OH, S. F.; SPITE, M. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 15-23, 2009.

SHAH, V. O.; FERGUSON, J.; HUNSAKER, L. A.; DECK, L. M.; VANDER JAGT, D. L. Cardiac glycosides Inhibit LPS-induced activation of pro-inflammatory cytokines in whole blood through an NF- κ B-dependent mechanism. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.4, p. 11-19, 2011.

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

SIRINATHSINGHJI, D. J.; HEAVENS, R. P.; SIKDAR, S. K. In vivo studies on the dopamine re-uptake mechanism in the striatum of the rat: effects of benztropine, sodium and ouabain. **Brain Research**, v. 438, n. 1-2, p. 399-403, 1988.

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

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427-39, 2010.

SOWA, G.; PRZEWLOCKI, R. Ouabain enhances the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by rat peritoneal macrophages. **Immunopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 95-100, 1997.

STILLIE, R.; FAROOQ, S. M.; GORDON, J. R.; STADNYK, A. W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 3, p. 529-43, 2009.

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

TAKADA, Y.; MATSUO, K.; OGURA, H.; BAI, L.; TOKI, A.; WANG, L.; ANDO, M.; KATAOKA, T. Odoricide A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NF-kappaB-inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1157-66, 2009.

TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 10, p. 866-73, 1995.

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

URADE, Y.; HAYAISHI, O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 259-71, 2000.

VALENTE, R. C.; NASCIMENTO, C. R.; ARAUJO, E. G.; RUMJANEK, V. M. 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, n. 4, p. 228-36, 2009.

VON ANDRIAN, U. H.; HANSELL, P.; CHAMBERS, J. D.; BERGER, E. M.; TORRES FILHO, I.; BUTCHER, E. C.; ARFORS, K. E. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. **American Journal of Physiology**, v. 263, n. 4 Pt 2, p. H1034-44, 1992.

WANG, Z.; ZHENG, M.; LI, Z.; LI, R.; JIA, L.; XIONG, X.; SOUTHALL, N.; WANG, S.; XIA, M.; AUSTIN, C. P.; ZHENG, W.; XIE, Z.; SUN, Y. Cardiac

glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. **Cancer Research**, v. 69, n. 16, p. 6556-64, 2009.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 7, p. 790-804, 2004.

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

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

WENCESLAU, C. F.; DAVEL, A. P.; XAVIER, F. E.; ROSSONI, L. V. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 48, n. 4, p. 316-26, 2011.

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

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-6, 2000.

WU, K. Acupuncture in a rehabilitation setting: Wu visits Wuhan. **Acupuncture in Medicine**, v. 21, n. 1-2, p. 52-4, 2003.

XAVIER, F. E.; ROSSONI, L. V.; ALONSO, M. J.; BALFAGON, G.; VASSALLO, D. V.; SALAICES, M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 215-25, 2004.

YANG, Q.; HUANG, W.; JOZWIK, C.; LIN, Y.; GLASMAN, M.; CAO HUY, H.; SRIVASTAVA, M.; ESPOSITO, D.; GILLETTE, W.; HARTLEY, J.; POLLARD, H. B. Cardiac glycosides inhibit TNF-alpha/NF-kappaB signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States America**, v. 102, n. 27, p. 9631-6, 2005.

YERETSSIAN, G.; LABBE, K.; SALEH, M. Molecular regulation of inflammation and cell death. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 380-90, 2008.

YONEKAWA, K.; HARLAN, J. M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 2, p. 129-40, 2005.

YU, H. S.; KIM, S. H.; PARK, H. G.; KIM, Y. S.; AHN, Y. M. Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: a rat model for mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 888-94, 2010.

YU, H. S.; KIM, S. H.; PARK, H. G.; KIM, Y. S.; AHN, Y. M. Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates tyrosine hydroxylase through extracellular signal-regulated kinase in rat striatum. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 6, p. 779-86, 2011.

YUAN, S. Y. Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability. **Microcirculation**, v. 7, n. 6 Pt 1, p. 395-403, 2000.

ZEISER, R.; PENACK, O.; HOLLER, E.; IDZKO, M. Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 9, p. 833-45, 2011.

ZHANG, Z. H.; YU, Y.; KANG, Y. M.; WEI, S. G.; FELDER, R. B. Aldosterone acts centrally to increase brain renin-angiotensin system activity and oxidative stress in normal rats. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 2, p. H1067-74, 2008.

ZHENG, L.; FISHER, G.; MILLER, R. E.; PESCHON, J.; LYNCH, D. H.; LENARDO, M. J. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. **Nature**, v. 377, n. 6547, p. 348-51, 1995.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4-5, p. 299-309, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA).



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 28 de abril de 2011

CEPA N°. 0504/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS

Orientando(a) : JACQUELINE AVES LEITE

Departamento/Setor: LTF

**Ref.: ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA OUABAÍNA NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO.**

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.

Número de animais: 240 camundongos swiss albinos fêmeas

Período: 05/2011 até 02/2012

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB



ANEXO B – Artigo com parte dos resultados desta dissertação publicado na revista científica *Mediators of Inflammation* (WebQualis CAPES: **B1**; Fator de impacto: **2,059**; Online ISSN: **1466-1861**).